

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

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DA ANATOMIA
FOLIAR DE *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex
DC.) J. MATTOS**

TESE DE DOUTORADO

Aline Ferreira Paim

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DA ANATOMIA FOLIAR
DE *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.)
J. MATTOS**

Aline Ferreira Paim

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 **Doutora em Engenharia Florestal.**

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

Paim, Aline Ferreira
Micropropagação e análise da anatomia foliar de
Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC.) J. Mattos. /
Aline Ferreira Paim.-2014.
184 p.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Ipê-amarelo 2. Taxa de multiplicação 3. Senescência
foliar I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Aline Ferreira Paim. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: alinepaimal@yahoo.com.br

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

A Comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DA ANATOMIA FOLIAR DE
Handroanthus chrysotrichus (MART. ex DC.) J. MATTOS**

elaborada por
Aline Ferreira Paim

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Berta Maria Heinzmann, Dr^a. (UFSM)

Candida Elisa Manfio, Dr^a. (UNICRUZ)

Caroline Borges Bevilacqua, Dr^a. (UFSM)

Rejane Flores, Dr^a. (IFFARROUPILHA)

Santa Maria, 25 de julho de 2014.

***“Crescer custa, demora, esfolha, mas compensa.
É uma vitória secreta, sem testemunhas.
O adversário somos nós mesmos.”***

Martha Medeiros

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao meu anjo da guarda e aos espíritos de luz que estiveram sempre comigo me protegendo e iluminando o meu caminho.

À minha mãe Ana, pelo amor e apoio incondicionais. Por todo o carinho e sacrifício que sempre dedicou a mim e meus irmãos. Pelas risadas e lágrimas compartilhadas em momentos em que só dividimos com quem realmente amamos. Muito obrigada é pouco, nunca haverão palavras para descrever o meu amor e respeito pela mãe, mulher e melhor amiga.

À minha avó Ana Carolina e ao meu avô Jango (*in memoriam*), por todo amor, doçura, carinho e orações. Obrigada, por entender o meu afastamento, por perdoar os dias em que não estive presente para apreciar as flores do teu jardim junto a ti, para colher contigo as frutas no pé. Obrigada por estar comigo e por sempre acreditar que tudo daria certo.

À minha hermana e melhor amiga Naiara, pela alegria, pela força, pelo incentivo, pela cumplicidade e, principalmente, pelo amor partilhado em cada pedacinho da infância e em cada momento do presente. Crescemos juntas e viveremos uma vida inteira juntas.

Ao meu irmão Guilherme, pelo carinho dos seus abraços apertados que tiram meus pés do chão, por ser meu técnico em informática particular e por estar sempre comigo.

Ao Lourenço, pelo amor e carinho, pelos momentos de alegria e cumplicidade todos esses anos. E por acreditar nos meus sonhos.

À minha orientadora, Professora Lia Rejane Silveira Reiniger, pelas oportunidades a mim oferecidas, pela orientação durante todos esses anos, pela paciência, pela incansável vontade de ensinar, pela ajuda em todos os momentos e por acreditar e confiar em mim. Agradeço, principalmente, o teu carinho e a tua amizade. Levarei sempre comigo o teu exemplo de caráter e humanidade.

Aos meus amigos especiais, Enrique León e Juliana Lorensi, por todos os momentos inesquecíveis vividos ao lado de vocês. Ao Enrique, meu melhor amigo paraguaio, pelas risadas e choros compartilhados, por todo incentivo, pelo carinho, pela torcida, por estar sempre ao meu lado e pela amizade.

À colega e amiga muito querida, Aline Ritter Curti, por todos esses anos de amizade, por estar sempre comigo, por toda ajuda, pelas conquistas alcançadas juntas, pela cumplicidade, pelo carinho e amor.

Ao amigo querido Jardel Boscardin, por todo apoio e incentivo, pelas conversas e palavras de bondade que sempre me transmitiram paz, pelas risadas, pelo imenso carinho, pela amizade e por acreditar que tudo daria certo.

Aos colegas de laboratório, Iana, Charlene, Karol, Silvia, Carla, Leonardo, Caetano, Saulo, Débora, Clarissa, Jaqueline, Júlio, Matheus e Gabriel, por toda ajuda na execução dos ensaios deste estudo, pelos momentos de alegria e descontração, pela amizade e carinho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, por todas as oportunidades oferecidas e pelo conhecimento compartilhado.

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

Aos professores e amigos, Diego Pascoal Golle, Candida Elisa Manfio e Rejane Flores por toda ajuda e amizade.

À Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), ao Laboratório de Histotécnica e ao técnico Henrique Beutler, pelo trabalho realizado.

À toda equipe do Laboratório de Fitopatologia da UFSM, especialmente, a professora Marlove Muniz, a funcionária Maria e a colega e amiga Clair, por todo o auxílio, boa vontade e carinho.

Aos amigos de sempre, Camila Zanetti, Kelen Soares, Clair Walker, Michelle Dullius, Gabriele Krug, Mábia Maria, Lívia Vasconcelos, Cerlene Machado, Lislei Schünke Ivânio Folmer e Bruna Brum, pelo incentivo, carinho e amizade.

E finalmente, agradeço imensamente a todas as pessoas que torceram por mim, que acreditaram que tudo daria certo e com suas energias positivas contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

Muito obrigada!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DA ANATOMIA FOLIAR DE *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

AUTORA: ALINE FERREIRA PAIM

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Data e local da defesa: Santa Maria, 25 de julho de 2014.

Handroanthus chrysotrichus é uma espécie florestal nativa do Brasil, que apresenta diversos aspectos importantes tanto sob o ponto de vista econômico, pela produção de produtos madeiráveis, como, também, ecologicamente, uma vez que é indicada para a recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente. As sementes desta espécie apresentam problemas referentes à perda da viabilidade quando submetidas ao armazenamento. Sendo assim, a micropropagação emerge como uma alternativa de propagação para a espécie. No entanto, algumas características inerentes às plantas cultivadas *in vitro* podem promover alterações fisiológicas e anatômicas nos tecidos mantidos nessas condições. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar aspectos relacionados à micropropagação e à anatomia foliar de *H. chrysotrichus*. Primeiramente, foram realizados testes de sanidade e germinação nas sementes provenientes de diferentes lotes desta espécie. Já para a multiplicação *in vitro* de explantes de *H. chrysotrichus* foram testadas diferentes fontes e concentrações de citocininas combinadas ou não à auxina, bem como a influência da execução de sucessivos subcultivos nas taxas de multiplicação. Também foram avaliados aspectos relacionados à senescência foliar de brotações desta espécie conservadas *in vitro* em meio nutritivo WPM. Em relação ao enraizamento *in vitro*, testaram-se diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico - AIB combinadas à presença ou ausência de vermiculita no meio nutritivo ½WPM e, posteriormente, avaliou-se a aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas. Por fim, foi realizado o ensaio visando comparar a anatomia foliar de plantas de *H. chrysotrichus* cultivadas *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizadas. Os lotes de sementes de *H. chrysotrichus* apresentaram diferenças na qualidade sanitária e capacidade geminativa das sementes. Na multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*, o uso de citocininas foi considerado dispensável. Foram obtidas elevadas taxas de multiplicação *in vitro* em *H. chrysotrichus*, quando considerada a formação *in vitro* de gemas. Quanto à senescência foliar, a espécie demonstrou grande potencial, podendo permanecer longos períodos no mesmo meio nutritivo. Houve rizogênese *in vitro* em mais de 50% das brotações cultivadas na presença de vermiculita, independentemente das concentrações de AIB. Não foi possível promover a aclimatização das plantas micropropagadas de maneira satisfatória, sendo que apenas 7,12% das mudas sobreviveram. Foram verificadas diferenças na anatomia foliar de plantas desenvolvidas *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizadas. Os resultados obtidos poderão contribuir com informações a respeito de *H. chrysotrichus* quanto a aspectos relacionados ao seu cultivo *in vitro* e anatomia foliar dos tecidos cultivados em diferentes ambientes.

Palavras-chave: Ipê-amarelo. Taxa de multiplicação. Senescência foliar.

ABSTRACT

Doctor Thesis
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

***Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos MICROPROPAGATION AND LEAF ANATOMY ANALYSIS**

AUTHOR: ALINE FERREIRA PAIM
ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Date and Place of defense: Santa Maria, RS, July 25th, 2014.

Handroanthus chrysotrichus is a Brazilian native forest species which presents several important aspects both under the economic and ecological points of view, because its ability to provide timber products as well as for being indicated for degraded and permanent preservation areas recovery. Its seeds present problems concerning loss of viability when subjected to storage. This way, micropropagation emerges as an alternative for the species propagation. However, some characteristics inherent in *in vitro* grown plants may promote physiological and anatomic changes in tissues under that condition. Thus, the aim of this study was to evaluate aspects related to micropropagation and leaf anatomy of *H. chrysotrichus*. Firstly, health and germination tests were applied to seeds from different lots of that species. As for *in vitro* multiplication of *H. chrysotrichus* explants, different sources and concentrations of cytokines combined or not with auxin were tested, as well as the influence of successive subculture execution on multiplication rates. Aspects concerning leaf senescence of sprouts maintained *in vitro* in Woody Plant Medium (WPM) were also assessed. Concerning rooting *in vitro*, different concentrations of 3-Indolebutyric acid (IBA) combined with the presence or absence of vermiculite in ½ WPM were tested and, later, the *ex vitro* acclimatization of plants micropropagated was assessed. Finally, the test was conducted in order to compare the leaf anatomy of *H. chrysotrichus* plants grown *in vivo*, *in vitro* and acclimatized. The seed lots of *H. chrysotrichus* showed differences in health quality and geminal capacity of the seeds. As for *in vitro* multiplication of *H. chrysotrichus*, the use of cytokinins was not considered necessary. High rates of *in vitro* multiplication were obtained, when considered *in vitro* formation of buds. As for leaf senescence, the species showed great potential, remaining long periods in the same nutrient medium. There was rooting *in vitro* in more than 50% of the shoots cultivated in the presence of vermiculite, regardless IBA concentration. It was not possible to satisfactorily promote the acclimatization of micropropagated plants, as only 7.12% of the seedlings survived. Differences in leaf anatomy of plants grown *in vivo*, *in vitro* or acclimatized were verified. The results can contribute with information about *H. chrysotrichus*, concerning aspects related to its *in vitro* culture and leaf anatomy of the tissues grown in different environments.

Keywords: Ipe. Multiplication rate. Leaf senescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α - Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Em A) Aspecto da oxidação fenólica na base dos segmentos apicais caulinares; em B) Formação *in vitro* de raízes. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.73
- Figura 2 – Calogênese em segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescidos das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Em A) Aspecto geral dos explantes submetidos ao cultivo *in vitro*; em B) Brotação com formação calogênica basal. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.75
- Figura 3 – Formação de brotações em segmento nodal de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA ($0,05\mu\text{M}$). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.93
- Figura 4 – Porcentagem média de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazurin - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou $10\mu\text{M}$) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.114
- Figura 5 – Número médio de brotos por explante formados a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou $10\mu\text{M}$) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.115
- Figura 6 – Número médio de gemas por explante formadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes

- fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 117
- Figura 7 – Número médio de folhas por explante formadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 118
- Figura 8 – Número médio de entrenós por explante formados a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 120
- Figura 9 – Número médio de ápices por explante formados a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 121
- Figura 10 – Porcentagem média de sobrevivência de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84,102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 130
- Figura 11 – Número médio de folhas por explante em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84,102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 131
- Figura 12 – Número médio de folhas com sinal de senescência em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84,102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 132
- Figura 13 – Aspectos gerais de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivadas *in vitro* após 50 dias em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, sem subcultivo ou transferência para meio nutritivo fresco. Em A) Brotações com folhas sem sinal de senescência; em B) Brotações apresentando folhas

- com sinais de senescência e aspecto clorótico. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.....132
- Figura 14 – Porcentagem média de rizogênese *in vitro* (formação de raízes primárias e secundárias) em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84,102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 134
- Figura 15 – Formação de raízes secundárias iniciais em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivadas *in vitro* após 100 dias em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, na ausência de fitoreguladores. Barra= 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 136
- Figura 16 – Porcentagem média de calogênese em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84,102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 137
- Figura 17 – Porcentagem média de clorose foliar em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84,102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 138
- Figura 18 – Porcentagem média de oxidação fenólica em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84,102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 139
- Figura 19 – Porcentagem média de calogênese em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido das diferentes concentrações de AIB (0; 5; 10 ou 20 μ M) independentemente da presença ou ausência de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 149
- Figura 20 – Formação de raízes adventícias em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), subcultivadas *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de vermiculita, após 25 dias de cultivo *in vitro*. A) Formação *in vitro* de raízes primárias; B) Formação *in vitro* de raízes secundárias iniciais. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 153
- Figura 21 – Secções transversais da nervura central dos tecidos foliares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados *in vivo* , *in vitro* ou aclimatizado. A) Aspecto geral da nervura central dos tecidos foliares de plantas germinadas *in vivo* (~90 dias); B) Em detalhe a nervura central dos tecidos foliares de plantas germinadas *in vivo*; C) Aspecto geral da nervura central de

plantas germinadas *in vitro* (~60 dias); D) Em detalhe nervura central de plantas germinadas *in vitro*; E) Aspecto geral da nervura dos tecidos foliares de plantas aclimatizadas (~40 dias); F) Aspecto geral da nervura central de brotações cultivadas *in vitro* (~120 dias). Barra em A; C, E corresponde a 10µm e em B, D, F a 40µm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 162

Figura 22 – Secções transversais da lâmina foliar dos tecidos foliares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizados. A) Lâminas foliares de tecidos provenientes dos ensaios de multiplicação *in vitro*, após 40 dias de cultivo; B) Lâmina foliar de tecidos provenientes dos ensaios de enraizamento *in vitro*, após 40 dias de cultivo; C) Lâmina foliar de tecidos cultivados em meio nutritivo WPM, após 120 dias de cultivo *in vitro*; D) Lâmina foliar de tecidos cultivados em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), após 60 dias de cultivo *in vitro*; E) Lâmina foliar e presença de tricoma glandular em tecidos aclimatizados *ex vitro*, após 40 dias; F) Lâmina foliar de tecidos aclimatizados *ex vitro*, após 40 dias. Barra=40µm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 164

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Resumo da metodologia utilizada na execução dos ensaios realizados para a multiplicação *in vitro* de explantes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.55
- Quadro 2 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ – WPM, na ausência de fitorreguladores, subsequente a dois subcultivos anteriores e cultivo inicial, totalizando 90 dias, na presença de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Ácido α -Naftaleno Acético – ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.85
- Quadro 3 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo MS, na ausência de fitorreguladores, subsequente a três subcultivos anteriores e cultivo inicial, totalizando 120 dias de cultivo *in vitro*, sendo que 90 dias na presença de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Ácido α -Naftaleno Acético – ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.87
- Quadro 4 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ – WPM, na ausência de fitorreguladores, subsequente a um subcultivo anterior e cultivo inicial, totalizando 60 dias de cultivo na presença de Cinetina (CIN) e Ácido α -Naftaleno Acético – ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.100
- Quadro 5 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ – WPM, na ausência de fitorreguladores, subsequente ao cultivo inicial, totalizando 30 dias de cultivo na presença de diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 123

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados nos lotes 2011 e 2013 de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo) avaliados aos sete dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.47
- Tabela 2 – Médias de porcentagem de germinação de sementes dos lotes 2011 e 2013 de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo) avaliados aos sete, 14, 21 ou 28 dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.50
- Tabela 3 – Médias de porcentagem de enraizamento e oxidação fenólica em segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) independente das concentrações de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.....71
- Tabela 4 – Médias de porcentagem de calogênese em segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescidos das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.74
- Tabela 5 – Média de número de brotos por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Nafatleno - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013. .76
- Tabela 6 – Média de número de ápices por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013.77
- Tabela 7 – Porcentagem média de oxidação fenólica em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) independente das concentrações de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013.79

- Tabela 8 – Porcentagem média de sobrevivência, estabelecimento e número de brotos por explante (NB/E) em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) independente das concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 80
- Tabela 9 – Número médio de gemas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 81
- Tabela 10 – Número médio de folhas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 82
- Tabela 11 – Número médio de ápices por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 83
- Tabela 12 – Porcentagem média de calogênese em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, acrescido das diferentes concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM) independentemente das concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 84
- Tabela 13 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de explantes (segmentos apicais caulinares ou segmentos nodais) de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados e subcultivados *in vitro* em meios nutritivos (½WPM, WPM ou MS), na presença ou ausência de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013..... 88
- Tabela 14 – Porcentagem média de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA a

- 0,05µM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.91
- Tabela 15 – Número médio de brotos por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA a 0,05µM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.92
- Tabela 16 – Número médio de ápices por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA a 0,05µM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.94
- Tabela 17 – Médias de porcentagem de calogênese em segmentos apicais caulinares ou segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA a 0,05µM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.95
- Tabela 18 – Médias de porcentagem de enraizamento e oxidação fenólica em segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA a 0,05µM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.96
- Tabela 19 – Médias de porcentagem de calogênese em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA a 0,05µM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.99
- Tabela 20 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de explantes (segmentos apicais caulinares ou segmentos nodais) de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados e subcultivados *in vitro* em meios nutritivos (½WPM ou WPM), acrescidos ou não das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.101
- Tabela 21 – Médias de número de folhas por explante (NF/E), número de entrenós por explante (NET/E), calogênese (CALO%) e oxidação fenólica (OF%) em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de

- cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, acrescido das diferentes concentrações de Ácido α -Naftaleno Acético (0 ou 0,05 μ M) independente das concentrações de Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 103
- Tabela 22 – Médias de porcentagem de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 105
- Tabela 23 – Médias de números de brotos por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 106
- Tabela 24 – Médias de número de gemas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 107
- Tabela 25 – Médias de número de folhas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 108
- Tabela 26 – Médias de números de ápices por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 109
- Tabela 27 – Médias de porcentagem de calogênese *in vitro* em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) independente das concentrações de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 110
- Tabela 28 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados e subcultivados *in vitro* em meios nutritivos ('Woody Plant Medium' – WPM ou MS), acrescidos das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou

- 2µM) combinadas as concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014..... 111
- Tabela 29 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados, durante 30 dias, e subcultivados *in vitro*, por 30 dias adicionais, em meios nutritivos (WPM ou MS), na presença ou não de citocininas (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10µM) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 124
- Tabela 30 – Médias de sobrevivência *in vitro* (%) de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), na presença ou ausência de vermiculita independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 147
- Tabela 31 – Médias de porcentagem de oxidação fenólica em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), na presença ou ausência de vermiculita independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014. 151

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 A espécie – <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	33
2.2 Micropropagação de espécies lenhosas	35
2.3 Anatomia vegetal de espécies arbóreas	39
3 CAPÍTULO I QUALIDADE SANITÁRIA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	43
3.1 Objetivo	43
3.2 Material e métodos	43
3.2.1 Qualidade sanitária de sementes	43
3.2.2 Teste de germinação de sementes	45
3.2.3 Análise estatística	46
3.3 Resultados e discussão	46
3.3.1 Qualidade sanitária de sementes	46
3.3.2 Teste de germinação de sementes	49
3.4 Conclusões	52
4 CAPÍTULO II MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	53
4.1 Objetivo	53
4.2 Material e métodos	56
4.2.1 Desinfestação superficial das sementes e obtenção dos explantes	56
4.2.2 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) combinadas à presença ou ausência de Ácido α -Naftaleno Acético (ANA) na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	57
4.2.3 Subcultivo 1: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	58
4.2.4 Subcultivo 2: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	59
4.2.5 Subcultivo 3: Multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM	60
4.2.6 Subcultivo 4: Multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo MS	61
4.2.7 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de Cinetina (CIN) e tipos de explantes na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	62
4.2.8 Subcultivo 1: Efeito de diferentes concentrações de CIN na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	63
4.2.9 Subcultivo 2: Multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM	64
4.2.10 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina (2-iP) combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM	65

4.2.11 Subcultivo: Efeito de diferentes concentrações de 2-iP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo MS.....	66
4.2.12 Cultivo inicial: Efeito de diferentes fontes e concentrações de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	67
4.2.13 Subcultivo: Multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM.....	68
4.2.14 Condições de cultivo.....	69
4.2.15 Análise estatística.....	69
4.3 Resultados e discussão	70
4.3.1 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações 6-Benzilaminopurina (BAP) combinadas à presença ou ausência de Ácido α -Naftaleno Acético (ANA) na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	70
4.3.2 Subcultivo 1: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	75
4.3.3 Subcultivo 2: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	79
4.3.4 Subcultivo 3: Multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM.....	84
4.3.5 Subcultivo 4: Multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo MS.....	86
4.3.6 Taxas de multiplicação <i>in vitro</i> para o cultivo inicial e subcultivos.....	88
4.3.7 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de Cinetina (CIN) e tipos de explantes na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	91
4.3.8 Subcultivo 1 Efeito de diferentes concentrações de CIN na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	97
4.3.9 Subcultivo 2: Multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM.....	100
4.3.10 Taxas de multiplicação <i>in vitro</i> para o cultivo inicial e subcultivos.....	101
4.3.11 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de 2-iP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM.....	103
4.3.12 Subcultivo: Efeito de diferentes concentrações de 2-iP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo MS.....	104
4.3.13 Taxas de multiplicação <i>in vitro</i> para o cultivo inicial e subcultivo.....	111
4.3.14 Cultivo inicial: Efeito de diferentes fontes e concentrações de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	112
4.3.15 Subcultivo: Multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em meio nutritivo WPM.....	122
4.3.16 Taxas de multiplicação <i>in vitro</i> para o cultivo inicial e subcultivo.....	124
4.4 Conclusões	125
5 CAPÍTULO III ASPECTOS RELACIONADOS À SENESCÊNCIA FOLIAR EM BROTAÇÕES DE <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos CULTIVADAS IN VITRO	127
5.1 Objetivo	127
5.2 Material e métodos	127

5.2.1 Avaliação da senescência foliar em brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos cultivadas <i>in vitro</i>	127
5.3 Resultados e discussão	128
5.4 Conclusões	139
6 CAPÍTULO IV RIZOGÊNESE <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO <i>EX VITRO</i> DE BROTAÇÕES DE <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC) J. Mattos	141
6.1 Objetivo	141
6.2 Material e métodos	141
6.2.1 Efeito de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na rizogênese <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	141
6.2.2 Cultivo inicial: Efeito de AIB combinado à presença ou ausência de vermiculita na rizogênese <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	142
6.2.3 Subcultivo: Rizogênese <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	143
6.2.4 Aclimatização <i>ex vitro</i> de brotações micropropagadas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	143
6.2.5 Condições de cultivo	144
6.2.6 Análise estatística	144
6.3 Resultados e discussão	145
6.3.1 Cultivo inicial: Efeito de AIB na rizogênese <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	145
6.3.2 Efeito de AIB combinado à presença ou ausência de vermiculita na rizogênese <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	147
6.3.3 Subcultivo: Rizogênese <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	151
6.3.4 Aclimatização <i>ex vitro</i> de plantas micropropagadas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	153
6.4 Conclusões	154
7 CAPÍTULO V ANATOMIA FOLIAR DE BROTAÇÕES DE <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos MICROPROPAGADAS	157
7.1 Objetivo	157
7.2 Material e métodos	157
7.3 Resultados e discussão	159
7.4 Conclusões	165
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	167
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um território privilegiado quanto aos recursos naturais que possui. O território brasileiro abriga em torno de 20% do número total de espécies do planeta e apresenta a mais diversa flora do mundo, possuindo mais de 55 mil espécies descritas (22% do total mundial) (BRASIL, 2014). No entanto, apesar da rica biodiversidade, grande parte das atividades agrícolas e florestais estão baseadas em espécies exóticas. Sendo assim, o Ministério do Meio Ambiente aponta para a necessidade de intensificação dos investimentos na busca de melhor aproveitamento da diversidade natural que o país dispõe. A exemplo disso, Projeto Plantas do Futuro, que está sendo desenvolvido para todas as regiões do território nacional, visa a correta identificação e divulgação de informações sobre as espécies da flora local, de importância econômica ou potencial, para ampliar sua utilização nas suas regiões de origem (CORADIN et al., 2010). Dentre as diversas espécies nativas que são citadas neste projeto, para a região sul, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos está incluída, destacando-se a sua importância paisagística e ornamental, sendo indicada para a utilização na arborização urbana (BORGO et al., 2011). Adicionalmente, esta espécie apresenta inúmeras características de importância econômica e silvicultural, sendo que sua madeira pode ser utilizada para serraria, laminação e indústria moveleira (SOUZA et al., 2005). Também é registrada sua relevância quanto aos aspectos ecológicos, podendo ser usada na recomposição de matas ciliares, recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente (CARVALHO, 2008).

De maneira geral, espécies do gênero *Handroanthus* têm sido propagadas, basicamente, por sementes (FERREIRA et al., 2004). Porém, apesar de *H. chrysotrichus* produzir grande quantidade de sementes, estas apresentam curta longevidade natural, podendo perder a viabilidade durante o armazenamento, limitando, assim, sua utilização em viveiros para a produção de mudas (SOUZA et al., 2005). Dessa forma, a propagação vegetativa *in vitro* constitui-se em uma alternativa de cultivo para a espécie.

A cultura de tecidos vegetais, por meio da micropropagação, tem sido utilizada em muitas espécies lenhosas que apresentam algum problema relacionado

à propagação pela via seminal, que, incluem, além de perda de viabilidade quando armazenadas, as sementes podem apresentar dormência tegumentar, baixa porcentagem de germinação, dificuldades para coleta, ocorrência de anos com baixa produção, dentre outros fatores. Nesse sentido, a propagação vegetativa *in vitro* tem contribuído de maneira significativa na produção e conservação *in vitro* de muitas espécies florestais (OLIVEIRA et al., 2013).

A micropropagação apresenta inúmeras vantagens, como, por exemplo, a propagação em larga escala, a produção de plantas com alta qualidade fisiológica e sanitária, a utilização de pequena quantidade de tecido vegetal, a produção em espaço e período de tempo reduzidos (ULISSES et al., 2010). Por outro lado, as plantas micropropagadas podem apresentar algumas limitações durante o cultivo *in vitro*, tais como recalcitrância aos estímulos a que são submetidas, oxidação fenólica dos tecidos, senescência foliar, dificuldades de enraizamento *in vitro* e aclimatização das mudas desenvolvidas *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013; XAVIER et al., 2013; BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010). Adicionalmente, espécies mantidas sob condições *in vitro* estão sujeitas a sofrer alterações de natureza morfológica, fisiológica e anatômica, as quais, também, podem influenciar o desenvolvimento *in vitro*, bem como o processo de aclimatização das plantas micropropagadas e, conseqüentemente, podendo diminuir as taxas de sobrevivência *ex vitro* (ABBADÉ et al., 2009; DOSSEAU et al., 2008).

Em decorrência dos aspectos mencionados, e aliados à escassez de informações a respeito de *H. chrysotrichus*, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar aspectos relacionados à micropropagação e à anatomia foliar de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos. Dessa maneira, o trabalho está organizado em cinco capítulos, que serão apresentados na sequência descrita a seguir:

- No capítulo I, foi avaliada a qualidade sanitária e a capacidade germinativa de dois lotes de sementes de *H. chrysotrichus*.
- No capítulo II, foram realizados diversos ensaios para avaliar a multiplicação *in vitro* de explantes de *H. chrysotrichus*, submetidos a diferentes fontes e concentrações de citocininas combinadas ou não à auxina, bem como a influência da realização de subcultivos sucessivos em relação às taxas de multiplicação *in vitro*.

- No capítulo III, foi avaliada a senescência foliar de brotações de *H. chrysotrichus* conservadas *in vitro*.
- No capítulo IV, foi analisada a rizogênese *in vitro* de brotações de *H. chrysotrichus*, por meio da realização de ensaios, nos quais avaliaram-se o efeito de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) combinado a presença ou ausência de vermiculita no meio nutritivo, bem como a posterior aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas.
- No capítulo V, foi avaliada comparativamente a anatomia foliar de brotações de *H. chrysotrichus* mantidas *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A espécie – *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC.) J. Mattos é uma espécie florestal que ocorre naturalmente no Brasil (CARVALHO, 2008), assim como em outros países da América do Sul, África, Madagascar e Ásia (OLMSTEAD et al., 2009). Popularmente é conhecida como ipê-amarelo e faz parte da família Bignoniaceae. Na literatura, há divergências quanto ao número exato de gêneros e espécies pertencentes a esta família. Contudo, a maioria dos estudos apontam que há em torno de 100 gêneros e cerca de 800 espécies, as quais estão divididas, atualmente, em oito tribos, a saber: Bignonieae, Catalpeae, Colleae, Crescentieae, Jacarandaeae, Oroxyleae, Tourrettieae e Tecomae (OLMSTEAD et al., 2009; SOUZA; LORENZI, 2008). O Brasil é considerado o centro de diversidade desta família, sendo que, aqui, ocorrem três tribos (Bignonieae, Crescentieae e Tecomeae), 32 gêneros e mais de 300 espécies, além da ocorrência de alguns táxons endêmicos (CHAGAS JÚNIOR et al., 2010; SOUZA; LORENZI, 2008; SILVA; QUEIROZ, 2003). No Rio Grande do Sul pode ser encontrada de Torres até a bacia do Rio dos Sinos (CARVALHO, 2008; BACKES; IRGANG, 2002).

A espécie *H. chrysotrichus* pertence à tribo Tecomeae, que é considerada a segunda maior da família e, em território brasileiro, ocorrem cerca de nove gêneros, sendo os mais diversos *Tabebuia* e *Jacaranda* (PEREIRA; MANSANO, 2008; GENTRY, 1992). O gênero *Tabebuia*, nos últimos anos, passou por estudos moleculares e filogenéticos que indicaram ser polifilético e, dessa maneira, após a revisão, houve a divisão em três novos gêneros (*Tabebuia*, *Roseodendron* e *Handroanthus*). Em decorrência disso *Tabebuia chrysotricha* como era denominada a espécie, passou a ser *Handroanthus chrysotrichus*, conforme a nova classificação taxonômica (OLMSTEAD et al., 2009; GROSE; OLMSTEAD, 2007).

Trata-se de uma espécie com importância econômica, pois sua madeira é muito dura, flexível e resistente ao apodrecimento e ao ataque de fungos e cupins, podendo ser usada para fins nobres, como serraria, laminação, indústria moveleira,

entre outros usos (CARVALHO, 2008). No aspecto ecológico, também é notada sua relevância, pois costuma povoar as beiras dos rios, sendo, portanto, indicada para recomposição de matas ciliares, áreas degradadas e de preservação permanente (LORENZI, 2008). Além disso, pode ser amplamente utilizada na arborização urbana e em projetos paisagísticos de parques e jardins, em função de sua beleza e porte (WIELEWSKI et al., 2002; WIELEWSKI, 2001). Adicionalmente, também, já foi verificada, em algumas espécies do gênero *Handroanthus*, as atividades bactericida (PARK et al., 2005), fungicida (PORTILLO et al., 2005), antifúngica (NUÑES et al., 2004) e antitumoral (CHENNA et al., 2001).

Handroanthus chrysotrichus é considerada uma espécie caducifolia, sendo sua folhagem renovada anualmente. Floresce no período de julho a outubro e os frutos atingem sua maturidade fisiológica entre os meses de outubro a dezembro, produzindo grande quantidade de sementes (CARVALHO 2008; LORENZI, 2008; LORENZI, 1992). De maneira geral, as espécies do gênero *Handroanthus* produzem sementes leves, aladas, com pequenas reservas, e que podem perder a viabilidade durante o período de armazenamento (MORI, 2010; LIMA et al., 2008; CABRAL et al., 2003; DEGAN et al., 2001; KAGEYAMA; MÁRQUEZ, 1981). Essa perda de vigor das sementes é bastante frequente em espécies arbóreas, podendo ser comumente observada em muitas nativas do Brasil, tais como *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo) (MARTINS, 2012; MORI, 2010), *Jacaranda micranta* Cham. (jacarandá), *Myrocarpus frondosus* Allemão (cabreúva), *Psidium cattleianum* Sabine (araçá) (WIELEWICKI et al., 2006), entre outras. Além disso, podem ocorrer anos com baixa ou nenhuma produção de sementes, o que limita a dispersão natural dessas espécies, bem como sua utilização em viveiros para reflorestamento e comércio de mudas (SOUZA et al., 2005).

Tendo em vista essas limitações em relação à propagação via sementes, a micropropagação emerge como uma importante alternativa de propagação para essas espécies, além de representar a possibilidade de multiplicação em qualquer época do ano, em espaço de tempo relativamente curto, quando comparado ao ciclo normal de uma espécie florestal. Em estudo anterior, que tinha como objetivo avaliar o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*, foram obtidos resultados promissores quanto ao seu desenvolvimento *in vitro* (PAIM, 2011). Contudo, ainda, são escassos os estudos no que se refere à micropropagação propriamente dita da espécie, fazendo-se necessário ampliar as pesquisas

relacionadas ao desenvolvimento de técnicas eficientes para sua propagação vegetativa, de modo a obter mudas com alta qualidade fisiológica e sanitária.

2.2 Micropropagação de espécies lenhosas

A micropropagação de espécies florestais nativas do Brasil apresenta enorme potencial de aplicação na multiplicação e conservação de genótipos de interesse (OLIVEIRA et al., 2013). A propagação vegetativa *in vitro*, que é uma das técnicas da cultura de tecidos, tem permitido obter avanços no melhoramento de plantas por meio da propagação clonal de genótipos superiores, livres de doenças e independente de fatores sazonais (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010; SARTORETTO et al., 2008). Esta técnica está baseada na teoria da totipotência celular, a qual estabelece que todas as células vivas são capazes de regenerar um organismo inteiro, desde que sejam fornecidas as condições adequadas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De maneira geral, a micropropagação apresenta uma sequência de ações para o desenvolvimento *in vitro* de uma cultura. O primeiro estágio envolve a seleção, desinfestação e introdução de explantes em meio nutritivo em condições assépticas, caracterizando o estabelecimento *in vitro* da cultura. Já no segundo estágio ocorre o processo de multiplicação *in vitro* do material vegetal, por meio de sucessivas subculturas em meio nutritivo apropriado para este fim. O terceiro estágio envolve a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e, posterior transplante para substrato ou solo, sendo este processo denominado aclimatização (CARVALHO et al., 2009; DUTRA et al., 2009; GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998).

O sucesso de um sistema de micropropagação envolve uma série de fatores que devem ser controlados, dentre eles estão antecedentes genéticos, tipos de tecidos ou explantes, componentes nutricionais, fitorreguladores e ambientes de cultivo (GIRI et al., 2004). Além disso, diversas outras variáveis podem estar associadas à micropropagação das espécies lenhosas. Dentre estas estão a recalitrância ao cultivo *in vitro*, a contaminação por microrganismos, a oxidação fenólica, a hiperhidricidade ou vitrificação, a senescência foliar e a variação

somaclonal. Muitos desses fatores estão intimamente relacionados, fazendo com que, algumas vezes, um desencadeie o outro.

A recalcitrância *in vitro* está relacionada à dificuldade que algumas espécies apresentam em responder aos estímulos fornecidos (BERTOZZO; MACHADO, 2010), casos que são frequentes em espécies florestais nativas (XAVIER et al., 2013). Estes autores ressaltaram, ainda, a contaminação por microrganismos, seja ela exógena ou endógena, considerando este outro grave problema que, muitas vezes, limita o estabelecimento *in vitro* de muitas espécies. Aliado a estes aspectos, a oxidação fenólica é um fenômeno que, também, pode acarretar em prejuízo aos cultivos *in vitro*. Esta é responsável pelo escurecimento na base dos explantes e pode ser desencadeada no processo de senescência ou por injúria dos tecidos (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010; BARRUETO CID, 2005). Do mesmo modo, a vitrificação, que é caracterizada como uma desordem fisiológica e morfológica (KEVERS et al., 2004), conferindo aos explantes um aspecto vítreo, folhas quebradiças e translúcidas, pode afetar a propagação *in vitro* de espécies lenhosas. As causas atribuídas para sua ocorrência são, especialmente, a alta concentração de citocininas e a alta umidade relativa nos frascos de cultivo (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010; ZIV, 1991). A senescência foliar, assim como a vitrificação, também é considerada um desarranjo metabólico que pode ser influenciado por diversos fatores, entretanto, é um processo natural relacionado ao ciclo de vida dos tecidos. Pode ser estimulada pela liberação de etileno pelos tecidos vegetais cultivados *in vitro* e, de modo geral, está associada à perda de clorofila, perda de coloração e aumento da respiração (BARRIA, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004). Além dos fatores já mencionados, outro fenômeno que pode ocorrer na cultura de tecidos vegetais é a variação somaclonal, que, por sua vez, pode ser de origem genética ou epigenética (CORDEIRO, 2010). Diversas causas podem estar associadas ao surgimento de variantes somaclonais nos tecidos mantidos em condições *in vitro*, algumas delas podem estar associadas às altas taxas de multiplicação e ao estresse provocado ao material vegetal pela execução de sucessivos subcultivos (RIBEIRO, 2012). Em função da sua complexidade, os mecanismos exatos relacionados à variação somaclonal, que se verifica durante a cultura de tecidos, ainda não são totalmente compreendidos (CALVETE et al., 2009). Adicionalmente, há poucos relatos de ocorrência deste fenômeno no cultivo *in vitro* de espécies florestais.

De maneira geral, os aspectos elencados anteriormente podem ocorrer em qualquer fase do cultivo *in vitro* de espécies vegetais. E, muitas vezes, estão relacionados à presença de fitorreguladores que são acrescidos aos meios nutritivos. As citocininas, por exemplo, são cotidianamente utilizadas durante a fase de multiplicação *in vitro*, do mesmo modo que as auxinas são, frequentemente, usadas na indução de raízes *in vitro*. No entanto, um dos principais desafios dos cultivos *in vitro* baseia-se na escolha correta dos fitorreguladores, bem como da concentração adequada para induzir o desenvolvimento *in vitro* de explantes de espécies arbóreas para a etapa requerida (OLIVEIRA et al., 2013).

Em relação à fase de multiplicação *in vitro*, as citocininas mais utilizadas nos cultivos de espécies florestais têm sido 6-Benzilaminopurina (BAP), 2-Isopenteniladenina (2-iP), Cinetina (CIN) e Zeatina (ZEA) (OLIVEIRA et al., 2013). Além destas, Thidiazuron (TDZ), que é um composto a base de uréia e pode agir como citocinina na indução de brotos adventícios e gemas axilares em plantas arbóreas, também, tem sido utilizado nesta fase de cultivo. As citocininas pertencem, de maneira geral, a um grupo de substâncias que promovem a divisão celular, podendo atuar na quebra da dominância apical (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010; BARRUETO CID, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O uso dessas citocininas podem, de maneira geral, potencializar a formação *in vitro* de brotos. Desse modo, algumas expressões tem sido utilizadas para estimar as taxas de multiplicação *in vitro*, como a proposta por Erig; Schuch (2002) para *Malus prunifolia* Wild, Borkh (macieira cv. Marubakaido), a qual é determinada dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explantes no momento do estabelecimento do ensaio. Outras expressões já foram usadas para espécies agrícolas, em que a taxa de multiplicação foi calculada por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical (PEREIRA; FORTES, 2004) ou, ainda, pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes conforme realizado por Santiago (2011) para cultivares de batata. Essas estimativas podem fornecer o potencial de propagação do material vegetal cultivado *in vitro*, bem como, a capacidade de desenvolvimento e crescimento deste material (SANTIAGO, 2011).

Quanto à rizogênese *in vitro*, as auxinas são os principais fitorreguladores relacionados à indução de raízes durante cultivo, sendo que, frequentemente, as mais usadas são Ácido α -Naftalenoacético (ANA), Ácido 2,4 Diclofenoxiacético (2,4-

D), Ácido 3-Indolbutírico (AIB) e Ácido Indolacético (AIA). O efeito das auxinas no crescimento e na morfogênese das plantas são múltiplos e complexos, estando intimamente relacionados ao alongamento, divisão e diferenciação celular (HINOJOSA, 2005).

Outra fase de extrema importância na micropropagação de espécies é a aclimatização das plantas desenvolvidas *in vitro*. Trata-se de uma fase intermediária que visa fornecer condições adequadas para promover a adaptação das plantas micropropagadas às novas condições *ex vitro* (WENDLLING et al., 2006). É uma fase crítica para muitas espécies lenhosas cultivadas *in vitro*, pois boa parte das plantas desenvolvidas nesse ambiente apresentam desordens fisiológicas e/ou anatômicas, as quais podem reduzir a sobrevivência das mudas submetidas ao novo ambiente. Dessa forma, faz-se necessário promover um processo gradual de aclimatização para evitar a perda de mudas (ROCHA, 2009).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos visando obter informações sobre a micropropagação de diversas espécies florestais lenhosas, nativas dos biomas brasileiros, bem como a caracterização e a superação de eventuais problemas que podem apresentar quando cultivadas *in vitro*. Muitos esforços têm sido realizados para elucidar os aspectos relacionados à micropropagação destas espécies, como já relatado em muitos estudos, como, por exemplo, aqueles envolvendo *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. (caixeta) (MANTOVANI et al., 1999), *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (aroeira) (ANDRADE et al., 2000), *Acca sellowiana* (Berg) Burret (goiabeira-serrana) (OLTRAMARI et al., 2000), *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo) (MANTOVANI et al., 2001), *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá) (CORDEIRO et al., 2004), *Eugenia pyriformis* Cambess (uvaia) (NASCIMENTO et al., 2008; SILVA et al., 2003), *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (peroba-rosa) (RIBAS et al., 2005; 2003), *Caryocar brasiliense* Camb. (pequizeiro) (SANTOS et al. 2006), *Cedrella fissilis* Vell. (cedro) (AMARAL, 2006), *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (canjerana) (ROCHA et al., 2007), *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) (SOARES et al., 2007), *Tectona grandis* L. F. (teca) (FERMINO JÚNIOR et al., 2009), entre outros. Nosso Grupo de Pesquisa tem se dedicado a estudar algumas espécies florestais lenhosas, como *Mimosa scabrella* Benth. (bracatinga) (ROSA, 2009), *Luehea divaricata* Mart e Zuch (açoita-cavalo) (LÉON, 2014; 2010; FLÔRES et al., 2007), *Peltophorum dubium* (canafístula) (CURTI; REINIGER, 2014; CURTI 2014; 2011; CANDIDO, 2013; FLÔRES et al.,

2011; BASSAN et al., 2006), e *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato) (GOLLE et al, 2013; GOLLE et al., 2012; PAIM, 2011; GOLLE, 2010).

Em relação à *H. chrysotrichus* poucos estudos direcionados a sua micropropagação foram desenvolvidos (PAIM, 2011). Os conhecimentos quanto o desenvolvimento *in vitro* desta espécie ainda são considerados incipientes, havendo a necessidade de realizarem-se pesquisas relacionadas a sua propagação *in vitro* e, desse modo, contribuindo, também, com o incremento de informações relativas às espécies florestais nativas do Brasil.

2.3 Anatomia vegetal de espécies arbóreas

Os estudos sobre a anatomia foliar têm contribuído para o entendimento das estratégias adaptativas que muitas espécies apresentam ao longo do tempo e, também, quando são submetidas a diferentes ambientes, como, por exemplo, às condições *in vitro*. Além disso, esses estudos podem auxiliar na compreensão de aspectos relacionados à morfogênese, fisiologia, ecologia e evolução das espécies vegetais. É possível, ainda, por meio de estudos anatômicos, esclarecer alguns aspectos relacionados à taxonomia, já que há uma certa confusão de classificação entre espécies com características muito semelhantes, como é o caso de, por exemplo, aquelas dos gêneros *Tabebuia* e *Handroanthus*, além de poder ampliar o conhecimento sobre alguns outros táxons.

Tendo em vista essas questões, estudos anatômicos têm sido desenvolvidos com espécies da família Bignoniaceae, visando fornecer informações que auxiliem na compreensão de aspectos histológicos e morfológicos, bem como na identificação correta de diversas espécies florestais, incluindo espécies pertencentes a esta família. Já foram realizados estudos anatômicos para *Tabebuia avellaneda* Lor. ex Griseb e *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (SOUZA; OLIVEIRA, 2004); *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (DOSSEAU et al., 2008); *Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand. (ABBADE et al., 2009); *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex A. DC.) Mattos, *Handroanthus heptaphyllus* (Vell) Mattos, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, *Handroanthus ochraceus* (Cham.) Mattos, *Handroanthus roseo-albus* (Ridl.) Mattos, *Handroanthus serratifolius* (Vahl.) S.O. Grose e *Tabebuia*

aurea (Silva Manso) Benth e Hook. f. ex S. Moore (SILVA et al., 2009). Os estudos realizados indicaram que características anatômicas foliares podem apresentar valor diagnóstico para os ipês, sendo citadas para lâmina foliar características como estratificação da epiderme, tipo de mesofilo, a presença de parênquima paravenal, o tecido presente na margem da lâmina foliar e a posição dos estômatos em relação às demais células epidérmicas (SILVA et al., 2009). Por outro lado, esses autores indicaram que alguns caracteres são considerados conservativos em *Handroanthus*, dentre os quais incluem-se tricomas de variadas formas na lâmina foliar, presença de estômatos na face abaxial e epiderme cuticularizada (SILVA et al., 2009).

A comparação entre estruturas anatômicas de tecidos cultivados *in vitro* e *ex vitro*, como já mencionado anteriormente, pode fornecer informações importantes relacionadas à compreensão de algumas estratégias adaptativas que as plantas micropropagadas tendem a desenvolver, uma vez que estão submetidas a condições diferentes daquelas encontradas na natureza. Muitas vezes, as mudas advindas dos cultivos *in vitro* estão expostas a um microambiente único, organizado para gerar estresse mínimo, mas com condições favoráveis à multiplicação (HAZARIKA, 2006), podendo, assim, sofrer alterações de caráter morfológico, fisiológico e anatômico durante esse período (CALVETE et al., 2002). Dessa maneira, as plantas desenvolvidas no ambiente *in vitro* podem apresentar algumas características peculiares, como baixa diferenciação dos tecidos foliares, o que pode estar associado à plasticidade fenotípica desses tecidos, aliada à elevada umidade relativa, às baixas trocas gasosas com o ambiente externo e à baixa irradiância no ambiente *in vitro* (RODRIGUES, 2009). Além disso, os tecidos vegetais mantidos sob condições *in vitro* podem apresentar cutícula pouco desenvolvida (CALVETE et al., 2002), comprometimento na funcionalidade dos estômatos, abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida capacidade de sustentação (menor quantidade de colênquima e esclerênquima) (ABBADE et al., 2009), entre outras alterações menos frequentemente citadas. Outro aspecto relevante que, também, pode estar associado às alterações anatômicas e funcionais dos tecidos vegetais, refere-se à disponibilidade de radiação, a qual pode interferir, de modo geral, no padrão de crescimento e na produção das plantas.

Em um estudo com duas espécies do gênero *Vitis* (videira), foi realizada a caracterização da anatomia foliar em diferentes sistemas de condução. Esse tipo de estudo é bastante relevante, tendo em vista que, as oscilações nos níveis de

luminosidade podem causar variações no mesofilo das folhas podendo alterar (elevar ou reduzir) potencialmente a capacidade fotossintética e a produção de frutos para essas espécies (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2010). As questões abordadas neste estudo podem ser relacionadas com as situações dos cultivos *in vitro* e do processo de aclimatização, ao passo que, o aumento da incidência luminosa nas plantas pode proporcionar várias alterações, como aumento na espessura da folha, na massa foliar específica, no desenvolvimento da epiderme e do parênquima e, no número total de células das folhas (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2010).

Em decorrência dessas alterações estruturais nos tecidos das plantas cultivadas *in vitro*, as quais podem comprometer o processo de adaptação para as condições *ex vitro* (aclimatização), faz-se necessário aliar os estudos de anatomia vegetal e micropropagação. Podendo-se, assim, obter maior controle sob as condições de cultivo, tentando-se maximizar o estabelecimento das plantas cultivadas *in vitro* quando da transferência para a condição *ex vitro*, e, dessa maneira, diminuir eventuais perdas de material vegetal.

3 CAPÍTULO I

QUALIDADE SANITÁRIA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex. DC.) J. Mattos

Para a realização dos ensaios foram utilizados dois lotes de sementes, sendo o primeiro (Lote 2011) adquirido em outubro de 2012 enquanto o segundo (Lote 2013) foi obtido em novembro de 2013. Na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), as sementes permaneceram armazenadas em sacos de papel em refrigerador tipo 'frost free' à temperatura de 8-10°C, até sua utilização nos ensaios, realizados no período compreendido entre outubro de 2012 e novembro de 2013.

3.1 Objetivo

Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade sanitária e a capacidade germinativa de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos provenientes de dois lotes de sementes.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Qualidade sanitária de sementes

O ensaio visando à caracterização da qualidade sanitária de sementes de *H chrysotrichus* foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM.

A avaliação da qualidade sanitária dos dois lotes de sementes adquiridos (Lote 2011 e Lote 2013) foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado.

Os tratamentos consistiram dos dois lotes de sementes, os quais foram avaliados em relação à incidência de gêneros fúngicos associados às sementes de *H. chrysotrichus*. Foram inoculadas, em papel filtro, 25 sementes em cada uma das quatro repetições realizadas para cada lote de sementes, assim totalizando 200 sementes (100 sementes para cada lote).

Para a avaliação da qualidade sanitária de sementes foi utilizado o teste do papel filtro, também, denominado de “blotter test”, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009). As sementes foram acondicionadas em caixas plásticas tipo *Gerbox*, as quais foram previamente desinfestadas com o auxílio de algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Na sequência, foram colocadas duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água estéril. As sementes foram inoculadas com o auxílio de pinças desinfestadas com algodão embebido em solução de NaOCl a 1% (v/v) e, na sequência, em solução de etanol a 70% (v/v). Após a inoculação das sementes, as caixas plásticas foram fechadas e inseridas em sacos plásticos para conservar melhor a umidade. Em seguida, as caixas foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A avaliação foi realizada aos sete dias, identificando-se a incidência de cada gênero fúngico junto às sementes, por meio da observação em microscópio estereoscópio e, quando necessário, em microscópio óptico, visando determinar a porcentagem de ocorrência dos gêneros fúngicos associados aos lotes de sementes testados. A análise em microscópio estereoscópio foi realizada quando as estruturas de reprodução dos fungos estavam bem desenvolvidas e, naqueles casos que apresentaram maior dificuldade de identificação foi realizada a confecção de lâminas provisórias, por meio da retirada de pequenas amostras do micélio com estruturas de reprodução com o auxílio de agulhas, fita adesiva e/ou pinças. Após, as lâminas, foram então, analisadas em microscópio óptico. A identificação dos gêneros fúngicos, também, foi auxiliada pela consulta em literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

3.2.2 Teste de germinação de sementes

O teste de germinação de sementes de *H. chrysotrichus* foi realizado no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia da UFSM. Foram utilizados dois lotes de sementes (Lote 2011 e Lote 2013) para a realização do teste de germinação de sementes, em ensaio conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo que a comparação entre os dois lotes de sementes de *H. chrysotrichus*, quanto à porcentagem de germinação das sementes, constituíram os tratamentos. Foram realizadas oito repetições com 25 sementes para cada lote, totalizando 400 sementes (200 sementes para cada lote).

O ensaio foi executado conforme as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), sendo realizada, inicialmente, a desinfestação das caixas plásticas tipo *Gerbox*, com o auxílio de algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, foram colocadas duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água estéril. Previamente à inoculação das sementes, foi realizada a sua desinfestação superficial por meio da imersão em etanol a 70% (v/v) durante 30s, logo após as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de cálcio $[Ca(OCl)_2]$ a 3% (p/v) por 10min e, na sequência, passaram por um enxague triplo em água estéril. As sementes foram inoculadas com o auxílio de peças desinfestadas com algodão embebido em solução de NaOCl a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Posteriormente à inoculação das sementes, as caixas plásticas foram fechadas e colocadas dentro de sacos plásticos para manter melhor a umidade. Na sequência, as caixas foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de $25^{\circ}C \pm 3$, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de $20 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias, sendo verificado, a cada avaliação, o número de sementes que germinaram. Foram consideradas germinadas àquelas sementes que romperam o tegumento e emitiram radícula.

3.2.3 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 médias das 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 F ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2006). A precisão do experimento foi medida através da acurácia seletiva (AS) calculada por $\sqrt{1-1/F_{cal}}$, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos (STORCK et al., 2010).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Qualidade sanitária de sementes

Houve diferença significativa entre os lotes de sementes avaliados em relação à incidência de dois gêneros fúngicos identificados nas sementes de *H. chrysotrichus*: *Alternaria* sp. ($p=0,0009$) e *Curvularia* sp. ($p=0,0000$). A precisão do ensaio foi estimada pela acurácia seletiva, cujos valores calculados foram considerados muito altos, permitindo depositar confiança nos resultados obtidos (Tabela 1).

Já em relação aos demais gêneros fúngicos observados nas sementes de *H. chrysotrichus*, não houve efeito significativo dos lotes testados. Entretanto, foi possível observar elevada porcentagem média de ocorrência de alguns gêneros de fungos, como no caso de *Rhizopus* sp., que apresentou média geral de 48,5% de ocorrência nas sementes, seguido dos gêneros *Eppiccocum* sp. (30%), *Phoma* sp.

(24%), *Aspergillus* sp. (20,5%), *Rhizoctonia* sp. (16,5%), *Fusarium* sp. (14%), *Botrytis* sp. (2%) e *Penicillium* sp. (0,5%).

Tabela 1 – Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados nos lotes 2011 e 2013 de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo) avaliados aos sete dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Lote	Gênero Fúngico (%)	
	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
2011	63,00 b*	0,00 a
2013	7,00 a	41,00 b
Média (%)	35,0	20,5
AS**	0,98	0,99

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. **AS (Acurácia Seletiva) = $\sqrt{1 - (1 / Fc)}$, em que Fc= valor de F calculado. AS $\geq 0,9$ = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e $\leq 0,5$ = baixa.

A maior porcentagem média de incidência de gêneros de fungos junto às sementes foi verificada no lote 2011 para o gênero *Alternaria* sp. (63%), enquanto que, para o lote 2013, a porcentagem média do mesmo gênero fúngico foi menor, estando presente em 7% das sementes avaliadas. No entanto, este último lote apresentou alta incidência do gênero *Curvularia* sp. (41%), o qual esteve ausente no lote 2011. Resultado que, também, foi observado para outros gêneros, como no caso de *Penicillium* sp, que apenas foi encontrado no lote 2011, enquanto que *Botrytis* sp., ocorreu somente nas sementes avaliadas do lote 2013. Além disso, também, foi possível observar, que no lote 2013 houve maior incidência de gêneros fúngicos associados às sementes de *H. chrysotrichus*, sendo observada a ocorrência de nove gêneros diferentes e, oito para o lote 2011. Esta resposta pode ser decorrente de que alguns fungos associados às sementes dessa espécie, podem não ter resistido ao período de armazenamento a que o lote 2011 foi submetido, ou ainda, que o lote 2013 pode ter apresentado, qualitativamente, maior número de gêneros de fungos nas sementes devido a aspectos relacionados à forma em que as sementes foram coletadas. Na literatura, há relatos de que a contaminação de sementes de espécies florestais pode estar relacionada, dentre

outros fatores, com a forma que as sementes foram coletadas e/ou armazenadas (FANTINEL et al., 2013; FERREIRA, 1989).

De maneira semelhante ao observado no presente estudo, em outro teste de sanidade, foi verificada a incidência de oito diferentes gêneros fúngicos associados às sementes de *H. chrysotrichus* após sete dias de inoculação, sendo cinco destes considerados potencialmente fitopatogênicos (*Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Cladosporium* sp., *Phoma* sp. e *Phomopsis* sp.) e, ainda, outros dois gêneros classificados como saprófitos (*Epicoccum* sp. e *Aspergillus* sp.) (FANTINEL et al., 2013). Outra pesquisa apontou a ocorrência de nove gêneros de fungos identificados nas sementes de *H. chrysotrichus*, os quais foram: *Cladosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Epicoccum* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Chaetomium* sp. e *Rhizoctonia* sp., sendo que *Alternaria alternata* foi o fungo mais frequente e que apresentou a maior incidência nas duas amostras testadas (MACIEL et al., 2012).

No presente estudo, o gênero *Alternaria* sp., também foi o que obteve maior porcentagem média de incidência nas sementes de *H. chrysotrichus* para um dos lotes avaliados (lote 2011). A presença deste gênero fúngico associado às sementes de algumas espécies florestais pode acarretar na redução na taxa de germinação das sementes, queda do vigor de plântulas e deterioração do endosperma, sendo evidenciado pelo escurecimento das sementes (WETZEL, 2004).

Em outro estudo realizado objetivando, também, a caracterização sanitária de sementes de *H. chrysotrichus* foi observado que 47,75% das sementes analisadas estavam contaminadas por fungos potencialmente patogênicos como *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Phoma* sp. e *Fusarium* sp., apresentando este último, a maior frequência de ocorrência (38,25%) nas sementes avaliadas (WIELEWSKI et al., 2002). Seguindo a mesma tendência, no teste do papel filtro realizado com *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson. (ipê-amarelo) e *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl. (ipê-rosa), foi constatado que, os gêneros fúngicos mais frequentes e em maior incidência, associados às sementes destas espécies foram *Cladosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Epicoccum* sp., *Phoma* sp., *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Trichothecium* sp., *Phomopsis* sp., *Dreschlera* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp. (BOTELHO et al., 2008). De maneira semelhante, foram detectados os gêneros fúngicos *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. junto às sementes de *T. serratifolia* (SOUZA et al., 2004).

Muitos gêneros de fungos já tiveram sua incidência relatada junto às sementes de essências florestais, entre os mais comumente citados estão os gêneros *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. (SANTOS et al., 2000). Conforme estes autores, diversos gêneros de fungos já foram identificados em sementes de várias espécies do gênero *Tabebuia*, tais como *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Claietomium* spp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Diplodia* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., entre outros. Alguns desses gêneros podem desempenhar papel fitopatogênico e, além de influenciar muitas vezes, negativamente, a germinação das sementes, podem ser transmitidos para as plântulas. Já existem relatos que determinadas espécies de fungos, como *Alternaria alternata*, podem ser transmitidos das sementes para as plântulas de *H. chrysotrichus*, podendo causar necrose em folíolos e diminuição no tamanho das raízes das plântulas (FANTINEL et al., 2013). Ao avaliar a transmissão de fungos em sementes de *Cedrella fissilis* Vellozo (cedro), foi verificado que os gêneros *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp., também podem causar danos nas raízes e posterior tombamento das plântulas originadas (LAZAROTTO et al., 2012).

3.3.2 Teste de germinação de sementes

No presente estudo houve diferença significativa entre os lotes de sementes avaliados em todas as quatro avaliações realizadas (com valores de “p” de 0,0000 para a primeira e a segunda avaliação; 0,0052 para a terceira, e 0,0014 para a quarta avaliação). O resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias de porcentagem de germinação de sementes dos lotes 2011 e 2013 de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo) avaliados aos sete, 14, 21 ou 28 dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Lote	Germinação (%)			
	Período de avaliação			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
2011	0,00 b*	22,00 b	40,00 b	45,50 b
2013	41,50 a	55,50 a	60,00 a	66,50 a
Média (%)	20,75	38,75	50,00	56,00
AS**	0,99	0,99	0,95	0,96

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **AS (Acurácia Seletiva) = $\sqrt{1 - (1/Fc)}$, em que Fc= valor de F calculado. AS $\geq 0,9$ = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e $\leq 0,5$ = baixa.

O lote de sementes 2013, em todos os períodos de avaliação realizados, apresentou as melhores porcentagens de germinação, tendo, já aos sete dias, mais de 40% das sementes emergido a radícula e, atingindo, na última avaliação, uma porcentagem média de 66,50% de sementes germinadas. Já para o lote 2011, a germinação das sementes teve início somente aos 14 dias após sua inoculação no papel filtro, quando alcançou 22% de sementes germinadas e, ao final do período de avaliação, obteve-se uma porcentagem média de germinação de 45,5%, a qual foi inferior àquela obtida pelo lote 2013. No entanto, é preciso considerar que as sementes pertencentes ao lote 2011 podem não ter apresentado o mesmo desempenho, quando comparadas àquelas do lote 2013, por estarem armazenadas durante um período mais longo (aproximadamente dois anos). Possivelmente, o tempo de armazenamento e as condições a que as sementes foram submetidas podem ter influenciado na germinação destas. Adicionalmente, outro aspecto que, também, pode estar relacionado à porcentagem de germinação inferior do lote 2011 é a contaminação fúngica presente nas sementes desse lote, tendo sido observado 63% de incidência do gênero *Alternaria* sp. nas sementes. Este gênero fúngico é considerado potencialmente fitopatogênico e pode estar associado à redução no percentual germinativo e, conseqüentemente, à perda da viabilidade e longevidade das sementes de algumas espécies florestais (WETZEL, 2004).

Adicionalmente aos aspectos supracitados, estudos indicam que a germinação de sementes pode variar de acordo com sua herança genética e sua

qualidade sanitária, características que podem interferir nas taxas de germinação (FANTINEL et al., 2013). Além disso, como pode ser percebido no presente estudo, o percentual germinativo pode ser distinto entre sementes da mesma espécie, mas que pertencem a lotes diferentes, o que pode ser decorrente do local de coleta, bem como das formas e tempo de armazenamento (OLIVEIRA et al., 2008). Outras causas, que, também, podem ser sugeridas como relacionadas à diminuição na germinabilidade das sementes de diversas espécies arbóreas, incluem: o envelhecimento natural das sementes, que pode alterar os processos metabólicos, fisiológicos e bioquímicos das mesmas (FERREIRA et al., 2004); as variações na temperatura e no teor de umidade das sementes armazenadas (DEGAN et al., 2001); a quantidade de substâncias de reserva armazenadas nas sementes (KAGEYAMA; MÁRQUEZ, 1981), bem como a sua composição química (DEGAN et al., 2001).

De maneira geral, as sementes de *H. chrysotrichus* são consideradas ortodoxas, classe de sementes que inclui aquelas que permanecem viáveis sob baixas taxas de umidade e temperatura por um longo período de armazenamento (CARVALHO et al., 2006; WIELEWICKI et al., 2006; DEGAN et al., 2001). Entretanto, algumas pesquisas apontaram que é possível haver uma considerável perda de viabilidade de sementes pertencentes a este gênero, durante o armazenamento (LIMA et al., 2008; CABRAL et al., 2003; DEGAN et al., 2001; KAGEYAMA; MÁRQUEZ, 1981), o que coloca em dúvida a classificação das sementes de *H. chrysotrichus*.

Este aspecto foi verificado por meio de estudo realizado com várias espécies florestais, sendo que *Aspidosperma pyrifolium* (Mart.) (pereiro) e *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl (ipê-roxo) perderam completamente sua germinabilidade após 15 meses de armazenamento (LIMA et al., 2008). Já em *Tabebuia chrysotricha* (ipê-amarelo), foi observado um pequeno descréscimo entre as avaliações realizadas durante o teste de germinação, com as sementes armazenadas após 30 dias obtendo 66% de germinação, enquanto que, após 60 dias atingiram 44% e, depois de 90 dias, 46% (OLIVEIRA et al., 2008). No teste de germinação para *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo), após 28 dias de inoculação foi verificada uma porcentagem média de 40% de germinação independentemente dos teores de água das sementes (15,6; 11,5; 8,1; ou 4,3%) (MARTINS et al., 2012).

Embora essa redução no percentual germinativo das sementes seja comum durante o armazenamento, o contrário também pode ser constatado, como no caso das sementes de *Tabebuia aurea* Benth. & Hook. (ipê-amarelo), as quais apresentaram 99% de germinação, após estarem armazenadas durante 360 dias em sacos de papel kraft e em geladeira à temperatura de 13°C (NEVES et al., 2014). Em outro estudo com a mesma espécie, também foi observada elevada taxa de germinação das sementes armazenadas por dois meses, sendo superior a 80% após 14 dias de inoculação (PACHECO et al., 2008). Ainda para *T. aurea* foi verificado, após dois meses de armazenamento, elevada porcentagem média de germinação, variando entre 80 a 99%, independentemente das temperaturas (20; 25; 30; 35 ou 40°C) ou das embalagens testadas (papel; algodão ou plástico) e na ausência de luminosidade (CABRAL et al., 2003).

3.4 Conclusões

Os dois lotes apresentam alta contaminação fúngica junto às sementes sendo *Alternaria* sp. o gênero fúngico mais incidente nas sementes de *Handroanthus chrysotrichus* do lote 2011, enquanto para o lote 2013 a maior infestação é pelo gênero *Curvularia* sp.

Há maior incidência de gêneros fúngicos associados às sementes de *H. chrysotrichus* pertencentes ao lote 2013.

O lote 2013 de sementes de *H. chrysotrichus* apresenta melhor potencial germinativo nas condições testadas.

A contaminação fúngica presente nas sementes de *H. chrysotrichus* pode ter influenciado a redução das taxas de germinação, especialmente no que diz respeito ao lote 2011, que foi armazenado por um período de tempo maior que o lote 2013.

4 CAPÍTULO II

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, em Santa Maria, RS. A metodologia está apresentada resumidamente no Quadro 1, a seguir, com o objetivo de facilitar a análise dos resultados visto que há 12 ensaios incluídos. Porém, também está detalhadamente descrita nas páginas que se seguem.

4.1 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes fontes e concentrações de citocininas, bem como a influência da realização de subcultivos sucessivos na multiplicação *in vitro* de explantes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos.

Metodologia	Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>							
	Cultivo inicial: BAP / ANA	Subcultivo 1: BAP / ANA	Subcultivo 2: BAP / ANA	Subcultivo 3	Subcultivo 4	Cultivo inicial: CIN	Subcultivo 1: CIN	Subcultivo 2
<i>Delineamento experimental</i>	DIC ¹	DIC	DIC	-	-	DIC	DIC	-
<i>Arranjo fatorial</i>	Bifatorial	Bifatorial	Bifatorial	-	-	Bifatorial	Unifatorial	-
<i>Tratamentos</i>	BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) x ANA (0 ou 0,05µM)	BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) x ANA (0 ou 0,05µM)	BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) x ANA (0 ou 0,05µM)	-	-	CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM) x tipos de explantes	CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM)	-
<i>Total de tratamentos</i>	8	8	8	-	-	8	4	-
<i>Nº de Repetições</i>	5	5	10	76	81	8	8	61
<i>Explante (s)</i>	Segmentos apicais caulinares	Segmentos nodais	Segmentos nodais	Segmentos nodais	Segmentos nodais	Segmentos apicais caulinares ou nodais	Segmentos nodais	Segmentos nodais
<i>Meio nutritivo</i>	½WPM ²	WPM ³	WPM	WPM	MS ⁴	½WPM	½WPM	WPM
<i>Avaliação</i>	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias
<i>Variáveis analisadas</i>	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. %Rizogênese %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Rizogênese %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Rizogênese %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. %Rizogênese %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. %Rizogênese %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Rizogênese %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação
<i>Análise estatística</i>	Tukey	Tukey	Tukey	-	-	Tukey	Tukey	-

(conclusão)

Metodologia	Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>			
	<i>Cultivo inicial:</i> 2-iP / ANA	<i>Subcultivo:</i> 2-iP / ANA	<i>Cultivo inicial:</i> Citocininas	<i>Subcultivo:</i> Citocininas
<i>Delineamento experimental</i>	DIC	DIC	DIC	-
<i>Arranjo fatorial</i>	Bifatorial	Bifatorial	Bifatorial	-
<i>Tratamentos</i>	2-iP (0; 1; 1,5 ou 2µM) x ANA (0 ou 0,05µM)	2-iP (0; 1; 1,5 ou 2µM) x ANA (0 ou 0,05µM)	Citocininas (2-iP; BAP, CIN ou TDZ) x Concentrações (0; 2,5; 5 ou 10µM)	-
<i>Total de tratamentos</i>	8	8	16	-
<i>Nº de Repetições</i>	10	14	8	92
<i>Explante (s)</i>	Segmentos nodais	Segmentos nodais	Segmentos nodais	Segmentos nodais
<i>Meio nutritivo</i>	WPM	MS	WPM	WPM
<i>Avaliação</i>	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias
<i>Variáveis analisadas</i>	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação	%Sobrevivência %Estabelecimento Nº brotos/expl. Nº gemas/expl. Nº folhas/expl. Nº ápices/expl. Nº entrenós/expl. %Calogênese %Oxidação fenólica Taxa de multiplicação
<i>Análise estatística</i>	Tukey	Scott-Knott	Regressão polinomial	Regressão polinomial

Quadro 1 – Resumo da metodologia utilizada na execução dos ensaios realizados para a multiplicação *in vitro* de explantes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

¹ Delineamento inteiramente casualizado; ² Meio nutritivo desenvolvido por Lloyd e McCown (1981), conhecido, também, como Woody Plant Medium, cuja concentração de sais foi reduzida à metade; ⁴ Meio nutritivo desenvolvido por Lloyd e McCown (1981) na composição original de sais; ⁴ Meio nutritivo desenvolvido por Murashige e Skoog (1962).

4.2 Material e métodos

4.2.1 Desinfestação superficial das sementes e obtenção dos explantes

Inicialmente, foi realizada a desinfestação superficial das sementes de *H. chrysotrichus*. As sementes foram desaladas e logo colocadas em contato com o fungicida Captan® (Dicarboximida) durante 24h. Após este período, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à imersão em solução de etanol a 70% (v/v) durante 30s, sendo, em seguida, submersas em solução de hipoclorito de cálcio [Ca(OCl)₂] a 3% (p/v), durante 15min, e após, as sementes passaram por três enxágues com água estéril. A desinfestação superficial descrita foi realizada para o primeiro lote de sementes adquirido (Lote 2011). Enquanto que, para o segundo lote de sementes (Lote 2013), devido à alta contaminação verificada durante o teste de germinação *in vitro* das sementes, foi necessária, além dos procedimentos anteriormente citados, a adição de solução de agente desinfestante hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) durante 15min, previamente à imersão das sementes à solução de hipoclorito de cálcio.

Visando à germinação *in vitro*, foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, três a quatro sementes em cada frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL do meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM). Esta composição de meio nutritivo foi considerada mais adequada para a germinação, conforme verificado em estudos anteriores (dados não publicados), sendo acrescida de 30g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

As plântulas foram utilizadas nos ensaios em torno de 15 a 20 dias após sua emergência.

4.2.2 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) combinadas à presença ou ausência de Ácido α -Naftaleno Acético (ANA) na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus*

O presente ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, sendo que os tratamentos consistiram das diferentes concentrações de BAP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinados a 0 ou 0,05 μ M de ANA, totalizando oito tratamentos, com cinco repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes. Utilizaram-se, como explantes, segmentos apicais caulinares, isolados de plântulas germinadas *in vitro*, conforme descrito no item 4.2.1.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos apicais caulinares foram inoculados em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), sendo acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, além da combinação dos diferentes fitorreguladores, BAP e/ou ANA, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de gemas por explante, número de folhas por explante, porcentagem de rizogênese, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Adicionalmente, foi calculada a taxa média de multiplicação para o presente cultivo, a qual foi determinada por meio de duas maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁, de acordo com Pereira; Fortes (2004) e b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (neste caso, uma gema), designada TX₂, conforme proposto por Erig; Schuch (2002).

4.2.3 Subcultivo 1: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus*

Este ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, sendo que os tratamentos foram constituídos das diferentes concentrações de BAP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinados a 0 ou 0,05 μ M de ANA, totalizando oito tratamentos, com cinco repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes. Utilizaram-se, como explantes, segmentos nodais isolados de brotações cultivadas no ensaio descrito no item 4.2.2 (cultivo inicial).

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, além da combinação dos diferentes fitorreguladores, BAP e/ou ANA, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, em seguida, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, sendo que as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Para este ensaio foi igualmente calculada a taxa média de multiplicação, a qual foi estimada de três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), designada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, chamada TX₃, como mencionada por Santiago (2011).

4.2.4 Subcultivo 2: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus*

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, sendo que os tratamentos consistiram das diferentes concentrações de BAP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinados a 0 ou 0,05 μ M de ANA, totalizando oito tratamentos, com 10 repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes. Utilizaram-se, como explantes, segmentos nodais isolados de brotações subcultivadas no ensaio descrito no item 4.2.3 (Subcultivo 1).

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, além da combinação dos diferentes fitorreguladores, BAP e/ou ANA, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Além dessas variáveis, foi determinada a taxa média de multiplicação de duas maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004) e b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), designada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002). A taxa TX₃ não foi calculada para esse ensaio devido a não realização da avaliação referente ao número de entrenós por explante.

4.2.5 Subcultivo 3: Multiplicação *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

Este subcultivo foi realizado objetivando avaliar a multiplicação em meio nutritivo fresco, na ausência de fitorreguladores, das brotações desenvolvidas no subcultivo 2. Para tanto, a partir das brotações foram excisados, em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais, os quais foram utilizados como explantes. Na sequência, os segmentos nodais foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo WPM, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar. Foram inoculados 228 explantes distribuídos em 76 frascos, sendo utilizados três explantes por frasco. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem de rizogênese, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Adicionalmente, foi estimada a taxa média de multiplicação, a qual foi determinada de três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), designada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, chamada TX₃ (SANTIAGO, 2011).

4.2.6 Subcultivo 4: Multiplicação *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo MS

O presente subcultivo, também, foi realizado visando avaliar a multiplicação de brotações originadas no subcultivo 3, em meio nutritivo fresco e na ausência de fitorreguladores. Com esse fim, em câmara de fluxo laminar, foram inoculados segmentos nodais, os quais foram isolados das brotações e utilizados como explantes, em frascos de vidro com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar. Foram inoculados, no total, 273 explantes distribuídos em 81 frascos, sendo utilizados três explantes por frasco. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, sendo que as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Também, foi calculada a taxa média de multiplicação *in vitro*, sendo esta estimada de três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), designada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, chamada TX₃ como mencionada por Santiago (2011).

4.2.7 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de Cinetina (CIN) e tipos de explantes na multiplicação *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus*

Este ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, em que os níveis do fator “A” consistiram das diferentes concentrações de CIN (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) e aqueles do fator “B”, dos tipos de explantes (segmento apical caulinar ou segmento nodal), totalizando oito tratamentos, com oito repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes. Os explantes utilizados neste ensaio foram isolados de plântulas germinadas *in vitro*, conforme descrito no item 4.2.1.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos apicais caulinares e nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, além das diferentes concentrações de CIN, conforme o tratamento, combinada a uma concentração fixa de ANA (0,05 μ M). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explante com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), porcentagem de rizogênese, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Foi calculada, também, a taxa média de multiplicação utilizando-se duas maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004) e b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de implantação do ensaio (uma gema para os segmentos apicais caulinares e duas gemas para os segmentos nodais), designada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002). A taxa

TX₃ não foi calculada no presente ensaio devido a não contabilização do número de entrenós por explante durante a avaliação.

4.2.8 Subcultivo 1: Efeito de diferentes concentrações de CIN na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus*

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, sendo que os tratamentos consistiram das diferentes concentrações de CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM), totalizando quatro tratamentos, com oito repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e contendo três explantes. Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais isolados de brotações cultivadas no ensaio descrito no item 4.2.7 (cultivo inicial).

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, além das diferentes concentrações de CIN, conforme o tratamento, combinada a uma concentração fixa de ANA (0,05µM). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), porcentagem de rizogênese, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). A taxa média de multiplicação foi, também, determinada para este ensaio, utilizando-se duas maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004) e b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no

momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), designada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002). A taxa TX₃ não foi calculada para esse ensaio devido a não realização da avaliação em relação ao número de entrenós por explante.

4.2.9 Subcultivo 2: Multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

Para realizar o presente subcultivo, das brotações desenvolvidas durante o subcultivo 1, foram isolados os segmentos nodais, os quais foram subcultivados em meio nutritivo fresco, visando à multiplicação desse material vegetal. Com essa finalidade, os explantes foram inoculados em meio nutritivo fresco e na ausência de fitorreguladores. Assim, em câmara de fluxo laminar, foram inoculados os segmentos nodais em frascos de vidro com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo WPM, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar. No total foram inoculados 183 explantes em 61 frascos, tendo cada cada frasco comportado três explantes. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e em seguida, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem rizogênese, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica. Adicionalmente, foi estimada a taxa média de multiplicação, a qual foi determinada de três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, denominada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), definida TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c)

pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, designada TX₃ (SANTIAGO, 2011).

4.2.10 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina (2-iP) combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

O presente ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, sendo que os tratamentos consistiram das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina (2-iP) (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinados a 0 ou 0,05µM de ANA, totalizando oito tratamentos, com 10 repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes. Utilizaram-se, como explantes, segmentos nodais isolados de plântulas germinadas *in vitro*, conforme descrito no item 4.2.1.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, além da combinação dos diferentes fitoreguladores, 2-iP e/ou ANA. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Para este ensaio, também, foi estimada a taxa média de multiplicação, sendo esta calculada por meio de três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, chamada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número

inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), denominada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, designada TX₃ (SANTIAGO, 2011).

4.2.11 Subcultivo: Efeito de diferentes concentrações de 2-iP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo MS

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, em que os tratamentos foram constituídos das diferentes concentrações de 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinados a 0 ou 0,05µM de ANA, totalizando oito tratamentos, com 14 repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes. Utilizaram-se, como explantes, segmentos nodais isolados de plântulas cultivadas no ensaio descrito anteriormente, item 4.2.10 (cultivo inicial).

Em câmara de fluxo laminar, foram inoculados os segmentos nodais em meio nutritivo MS, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, sendo que as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Adicionalmente, foi calculada a taxa média de multiplicação, sendo determinada de três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, chamada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no

momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), denominada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, designada TX₃ (SANTIAGO, 2011).

4.2.12 Cultivo inicial: Efeito de diferentes fontes e concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus*

O presente ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x4, em que os níveis do fator “A” referiram-se às fontes de citocininas (2-iP, BAP, CIN ou Thidiazuron –TDZ) e, aqueles do fator “B”, as diferentes concentrações (0; 2,5; 5 ou 10µM), totalizando 16 tratamentos com oito repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e dois explantes. Utilizaram-se, como explantes, segmentos nodais isolados de plântulas germinadas *in vitro*, conforme descrito no item 4.2.1.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM, contendo 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 7g L⁻¹ de ágar e 1g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), o qual foi adicionado visando controlar a oxidação fenólica, acrescido das diferentes fontes e/ou concentrações de citocininas, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, sendo que as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem de calogênese e de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes). Para o presente ensaio, também, foi estimada a taxa média de multiplicação, sendo que foram utilizadas três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do

período de cultivo, excluindo-se a gema apical, chamada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), denominada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, designada TX₃ (SANTIAGO, 2011).

4.2.13 Subcultivo: Multiplicação *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

Neste subcultivo, das brotações desenvolvidas durante o cultivo inicial (item 4.2.12) foram isolados os segmentos nodais, os quais foram subcultivados em meio nutritivo fresco sem fitorregulares, visando avaliar a multiplicação *in vitro* do material vegetal. Dessa maneira, em câmara de fluxo laminar, foram inoculados os segmentos nodais em frascos de vidro com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo WPM, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 7g L⁻¹ de ágar e 1g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), o qual foi adicionado ao meio nutritivo objetivando controlar a oxidação fenólica. Foram inoculados 276 explantes em 92 frascos, cada frasco continha três explantes. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento dos explantes (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de brotos por explante, número de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante (desenvolvimento inicial das gemas axilares pré-existentes no explante), número de entrenós por explante, porcentagem de calogênese, de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes) e de clorose foliar (amarelecimento das folhas). Além das variáveis avaliadas, foi calculada a taxa média de multiplicação, sendo esta estimada de três maneiras: a) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical, chamada TX₁ (PEREIRA; FORTES, 2004); b) dividindo-se o

número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do ensaio (duas gemas), denominada TX₂ (ERIG; SCHUCH, 2002) e c) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes, designada TX₃ (SANTIAGO, 2011).

4.2.14 Condições de cultivo

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C±3, fotoperíodo de 16h, e intensidade luminosa de 20μmol m⁻² s⁻¹, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

4.2.15 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 médias das 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 Tukey ou Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, para os tratamentos qualitativos. Enquanto que, para os tratamentos quantitativos, foi realizada a análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2006). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{N}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações 6-Benzilaminopurina (BAP) combinadas à presença ou ausência de Ácido α -Naftaleno Acético (ANA) na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus*

Não houve efeito significativo dos fatores principais e nem da interação para sobrevivência, estabelecimento *in vitro*, número de gemas por explante e número de folhas por explante. Apesar de os tratamentos não terem apresentado efeito, observaram-se elevadas médias gerais de sobrevivência (96,70%; IV=4,83%) e estabelecimento (95,87%; IV=5,44%) dos segmentos apicais caulinares de *H. chrysotrichus*. Em relação ao o número de gemas por explante e ao número de folhas por explante, as médias obtidas foram 7,62 gemas por explante (IV=12,17%) e 5,87 folhas por explante (IV=10,52%), as quais podem ser consideradas satisfatórias para a cultura de tecidos de espécies arbóreas, com base em resultados observados em outros estudos (SOARES et al., 2011; MÁXIMO et al., 2010; MORALES et al., 1999).

Em estudo previamente realizado com *H. chrysotrichus*, em que foram testados segmentos apicais caulinares e epicótilos cultivados em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, $\frac{1}{2}$ WPM ou $\frac{1}{2}$ MS), foi verificado que segmentos apicais caulinares apresentaram as melhores médias de sobrevivência (98,35%) e estabelecimento (88,40%) quando comparados aos epicótilos, cujas médias, para essas variáveis, foram 44,95% e 29,95% respectivamente (PAIM, 2011). Neste mesmo estudo foram obtidas 4,25 folhas por explante, média inferior à obtida no presente ensaio.

Durante o cultivo *in vitro* de segmentos apicais caulinares de outra espécie florestal, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert (canafístula), em que foram testadas diferentes concentrações de sais do meio nutritivo MS (50, 75, 100, 125 ou 150%), foram obtidas elevadas médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* (98%) aos 60 dias de cultivo (FLÔRES et al., 2011). Já para número de folhas, foram observadas 2,8 folhas na diluição do meio MS a 75%. De maneira similar, no

estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato) cultivados em meio ½MS, resultaram 2,8 folhas por explante, aos 60 dias de cultivo (GOLLE et al., 2012). Já, em relação ao número de gemas por explante, no cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo de *Citrus aurantium* L. (laranja-azedo), foram obtidas 2,37 gemas por explante, aos 70 dias de cultivo, em meio MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) suplementado com BAP a 8,88µM (SILVA et al., 2008). Para a regeneração *in vitro* de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo), foram observadas 58,6% de gemas axilares induzidas em segmentos nodais inoculados em meio nutritivo WPM acrescido de 4,44µM de BAP (MANTOVANI et al., 2001).

Quanto ao o enraizamento ($p=0,0000$) e à oxidação fenólica ($p=0,0287$) houve efeito significativo das concentrações da citocinina BAP adicionada ao meio nutritivo. Os resultados obtidos para estas variáveis estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Médias de porcentagem de enraizamento e oxidação fenólica em segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), acrescido de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) independente das concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

BAP (µM)	Enraizamento (%)	Oxidação Fenólica (%)
0,0	56,8 a*	66,70 a*
1,0	0,00 b	96,70 b
1,5	0,00 b	86,70 a b
2,0	0,00 b	96,70 b
Média	14,2	86,7
IV**	51,37	12,46

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Foi obtida uma média de 56,8% de enraizamento em segmentos apicais caulinares de *H. chrysotrichus* na ausência de fitorreguladores (Figura 1B). Este resultado indica que a espécie é promissora nesta etapa, o que vem a ser relevante

em se tratando de espécies lenhosas, as quais de modo geral, apresentam dificuldade na rizogênese *in vitro*. Esse resultado também foi observado, em um estudo com *E. involucrata* (cerejeira-do-mato), sendo alcançada uma média de 17,5% de enraizamento no cultivo dos explantes (segmentos apicais caulinares e nodais) em meio ½MS aos 60 dias (GOLLE et al., 2012). Em discos foliares de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. (caixeta), ocorreu intensa rizogênese quando os fitorreguladores adicionados ao meio nutritivo WPM, BAP (0; 0,04; 0,44; 4,44 ou 44,44µM) e ANA (0; 0,05; 0,54; 5,40 ou 54,00µM), estavam em suas concentrações mais reduzidas, após 30 dias de cultivo *in vitro* (MANTOVANI; FRANCO, 2000). Entretanto, a formação *in vitro* de raízes, sob vários aspectos, ainda é um processo que não está bem compreendido (LEMOS, 2010), especialmente quando se trata de espécies arbóreas, indicando a necessidade de estudos mais detalhados visando à compreensão de todo o processo envolvido na rizogênese.

Quanto à porcentagem de oxidação fenólica (Figura 1A), a menor incidência foi observada na ausência dos fitorreguladores e na presença de 1,5µM de BAP. O escurecimento foi observado na base dos explantes e, apesar de não ter inviabilizado o cultivo *in vitro*, os explantes com essa característica apresentaram-se visivelmente menos desenvolvidos que aqueles não oxidados. Além disso, de maneira geral, os explantes com oxidação apresentaram folhas com aspecto clorótico. A oxidação fenólica, responsável pela cor marrom do explante, é um fenômeno que pode ocorrer durante todas as fases de cultivo *in vitro*. O pardeamento, muitas vezes, pode ser atribuído às polifenoloxidasas (PPOs), enzimas cobre-dependente, que catalisam a reação de orto-difenóis (ácido clorogênico), e, assim, conferem a cor escura ou parda aos produtos. Essa reação é desencadeada no processo de senescência ou por injúria dos tecidos. Na cultura de tecidos, o corte do explante com bisturi, muitas vezes, desencadeia oxidação fenólica e, notadamente, pode ocorrer em diversas plantas perenes (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

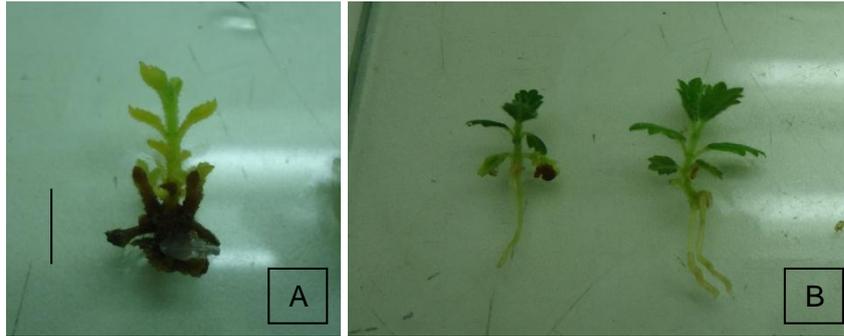


Figura 1 – Segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α - Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Em A) Aspecto da oxidação fenólica na base dos segmentos apicais caulinares; em B) Formação *in vitro* de raízes. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Já para a calogênese, observou-se efeito significativo da interação entre os fitorreguladores testados ($p=0,0000$) (Tabela 4). Foram observadas altas porcentagens de calo nas bases dos segmentos apicais caulinares cultivados na presença de ANA e BAP (Figura 2). Na ausência de ambos os fitoreguladores a calogênese foi muito reduzida (6,60%) e quando apenas ANA foi adicionado, a formação de calos diferiu significativamente daquela observada nos demais tratamentos, mas também foi alta (86,6%), o que indica que é necessária a presença da auxina na indução da calogênese em níveis satisfatórios. Provavelmente, a suplementação de ANA ao meio nutritivo corrigiu o balanço hormonal endógeno do explante em favor da calogênese. Na fase de avaliação da multiplicação *in vitro*, a presença de calos nos explantes pode ser interessante, uma vez que demonstra que o explante é responsivo e, que, havendo competência celular e sendo possível estabelecer uma rota organogênica, poder-se-á obter a formação de outros órgãos vegetais a partir dos calos formados. Alguns estudos têm indicado que, algumas citocininas, como BAP, podem ser fundamentais na etapa de regeneração dos calos ou na multiplicação de gemas axilares ou apicais de plantas lenhosas ou herbáceas (BARRUETO CID et al., 1999).

Tabela 4 – Médias de porcentagem de calogênese em segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescidos das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Ácético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

BAP (μ M)	Calogênese (%)		Média (%)
	ANA (μ M)		
	0	0,05	
0,0	6,60 a*A	86,6 a B	46,60
1,0	93,4 b B	93,4 a B	93,40
1,5	93,4 b B	100,0 a B	96,70
2,0	100,0 b B	93,4 a B	96,70
Média (%)	73,35	93,20	83,35
IV**	8,46		

*médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

No entanto, tendo em vista que a meta do presente estudo consistia em promover a organogênese direta, ou seja, a formação de novas partes aéreas sem a passagem pela fase de calo, considerou-se, como o melhor tratamento, aquele com menor média. Além disso, também é preciso considerar que, nesse experimento inicial em que está sendo recém avaliada a multiplicação *in vitro*, simultaneamente, a maior resposta dos explantes à rizogênese ocorreu no tratamento que promoveu a menor formação de calos na base dos explantes (6,60%) e, também, naquele em que a oxidação fenólica foi menor (66,70%), sugerindo que os processos são inversamente relacionados. Nesse sentido, alguns autores indicaram que a formação de calos na base dos explantes pode interferir no desenvolvimento e funcionalidade do sistema radicular, comprometendo a aclimatização das plantas cultivadas *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

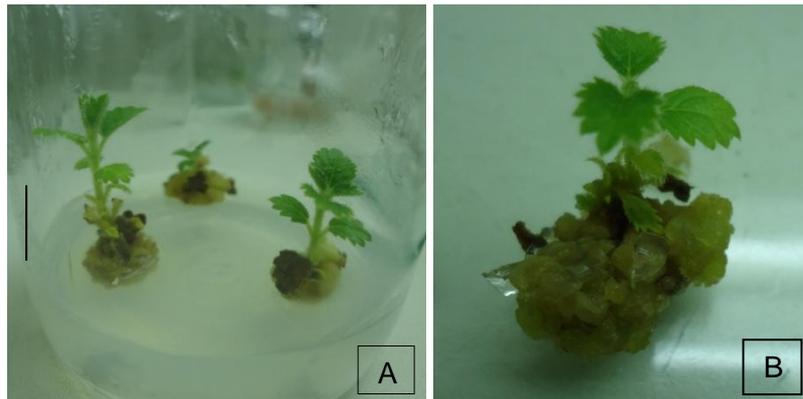


Figura 2 – Calogênese em segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescidos das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Em A) Aspecto geral dos explantes submetidos ao cultivo *in vitro*; em B) Brotação com formação calogênica basal. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

4.3.2 Subcultivo 1: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus*

Não houve efeito significativo dos fatores testados e nem da interação para a sobrevivência (IV=12,32%) e o estabelecimento *in vitro* (IV=13,81%), sendo observadas médias gerais de 92,50% e 88,75% respectivamente. Mesmo sendo consideradas médias altas para os cultivos *in vitro* de espécies florestais, houve um leve declínio nas médias destas variáveis quando comparadas ao seu cultivo inicial (ensaio anterior). Essa redução pode estar associada ao fato de que as plantas podem ir perdendo a capacidade de regeneração *in vitro* com sucessivos subcultivos, fenômeno denominado perda da capacidade morfogenética. Outro fator importante a considerar é o tipo de explante que foi utilizado. Alguns tipos de explantes podem apresentar um potencial regenerativo maior no início do cultivo, o qual vai gradualmente declinando à medida que aumentam o número de subcultivos e, conseqüentemente, há um aumento no tempo de exposição de um mesmo material vegetal às condições *in vitro* (MANTOVANI et al., 1999).

Já para número de brotos por explante ($p=0,0137$) e número de ápices por explante ($p=0,0082$) houve efeito significativo da interação entre a citocinina e a auxina testadas. Os resultados para estas variáveis podem ser visualizados nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

Tabela 5 – Média de número de brotos por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Nafatleno - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013.

BAP (μ M)	Número de brotos por explante		Média
	ANA (μ M)		
	0	0,05	
0,0	0,20 b*A	0,00 a A	0,10
1,0	0,13 b A	0,12 a A	0,13
1,5	0,33 b A	0,33 a A	0,33
2,0	0,80 a A	0,13 a B	0,47
Média	0,36	0,14	0,26
IV**	42,25		

* médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

A maior média obtida para o número de brotos foi observada a 2 μ M de BAP e na ausência da auxina ANA, sendo obtido 0,80 broto por explante, resultado este que diferiu de todos os demais tratamentos. Contudo, as médias observadas para esta variável são consideradas baixas para a cultura de tecidos vegetais, indicando que as concentrações da citocinina e da auxina utilizadas não foram eficientes na formação *in vitro* de brotos em segmentos nodais de *H. chrysotrichus*. Entretanto, aumentando-se as concentrações de BAP, a níveis superiores a 2 μ M, possivelmente, poder-se-á induzir maior formação de brotos em explantes dessa espécie.

Na multiplicação *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. (teca), as combinações de 0,5 μ M de ANA com 2,2 μ M de BAP promoveram os melhores resultados (1,75 brotos) para segmentos nodais cultivados em meio MS após 30 dias de cultivo *in*

in vitro (FERMINO JUNIOR et al., 2009). Para *Citrus aurantium* (laranja-azedo), foi verificado que BAP foi eficiente na indução de múltiplas brotações, apesar do número de brotos por explante decrescer gradualmente quando foram utilizadas concentrações superiores a 2,2µM dessa citocinina. Entretanto, o maior número de brotos foi observado a 1,8µM de BAP (SILVA et al., 2008). Concentrações mais altas dessa citocinina forneceram melhores respostas para a multiplicação *in vitro* de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (aroeira). Os segmentos apicais e nodais foram inoculados em meio ½MS, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,3; 4,5 ou 6,7µM), tendo sido observado 90% de regeneração direta em ambos os tipos de explantes, com BAP a 4,5µM, tratamento que resultou em uma brotação formada por explante (ANDRADE et al., 2000).

Tabela 6 – Média de número de ápices por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013.

BAP (µM)	Número de ápices por explante		Média
	ANA (µM)		
	0	0,05	
0,0	1,20 b*A	0,80 a A	1,00
1,0	1,00 b A	1,12 a A	1,06
1,5	1,33 a b A	1,33 a A	1,33
2,0	1,80 a A	0,93 a B	1,37
Média	1,33	1,05	1,19
IV**	12,76		

*médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Assim como para o número de brotos por explante, a maior média de número de ápices por explante ocorreu na presença de 2µM de BAP e na ausência de ANA (1,80). No entanto, esta média não diferiu de forma significativa do tratamento em que foi acrescido, ao meio nutritivo WPM, 1,5µM de BAP (1,33), sendo que, para esta mesma concentração da citocinina combinada a 0,05µM de ANA, foi observada

média idêntica. Estes resultados podem estar associados ao balanço hormonal endógeno, o qual pode ter sido alterado pelo acréscimo de uma citocinina exógena, favorecendo, assim, a formação de novos ápices.

Para o número de gemas por explante (8,64; IV=15,66%), o número de folhas por explante (9,09; IV=15,17%), o número de entrenós por explante (2,86; IV=17,43%) e a calogênese (85,82%; IV=16,32%), não foi verificado efeito significativo dos fatores testados e, tampouco, da interação. Em relação ao número de gemas por explante e número de folhas por explante foi verificada uma resposta contrária àquela observada para as médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* ao se estabelecer uma comparação com o cultivo inicial, havendo um aumento na proliferação de gemas e folhas durante o presente subcultivo. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que, no presente ensaio, foram usados, como explante, segmentos nodais, os quais contêm duas gemas axilares pré-existentes, ao passo que os segmentos apicais caulinares, utilizados no cultivo inicial, contêm apenas uma. Além disso, durante esse primeiro subcultivo, o meio nutritivo utilizado foi o WPM em sua composição original de sais, enquanto que, no cultivo inicial, optou-se por usar WPM na concentração sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM). Outro aspecto relevante e, que também, pode estar associado aos resultados observados, é o tempo que algumas espécies, especialmente as lenhosas, levam para responder aos estímulos que lhe são impostos. Portanto, a melhor resposta para essas variáveis, pode estar condicionada ao maior tempo (30 dias do cultivo inicial + 30 dias referentes ao subcultivo 1) de exposição aos tratamentos na presença dos fitorreguladores.

Para a oxidação fenólica, houve efeito significativo do fator principal, concentração de BAP ($p=0,0032$) (Tabela 7), em que se observou média mais baixa na ausência de BAP, a qual não diferiu significativamente daquela observada na presença de $2\mu\text{M}$ da citocinina. Muitas vezes, o acréscimo de citocininas ao meio nutritivo pode retardar a síntese de fenóis, assim, permitindo-se obter níveis mais baixos de oxidação fenólica (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010), o que pode ter contribuído para a obtenção de um número maior de brotos nos segmentos nodais de *H. chrysotrichus*, na presença da maior concentração de BAP, neste ensaio. De maneira geral, esse efeito das citocininas, também pode ser percebido em relação à senescência foliar, a qual pode ser atrasada pelo emprego desta classe de fitorreguladores (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Tabela 7 – Porcentagem média de oxidação fenólica em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) independente das concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013.

BAP (µM)	Oxidação fenólica (%)
0,0	16,50 a*
1,0	68,40 b
1,5	63,40 b
2,0	49,90 a b
Média (%)	49,55
IV**	22,16

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Entretanto, de maneira geral, a oxidação fenólica pode estar associada aos ferimentos que são provocados nos explantes no momento do corte. Esse estresse causado ao tecido vegetal, em especial aos tecidos mais juvenis, pode estimular a atividade da fenilalanina amonialiase (PAL), enzima que atua no metabolismo de compostos fenólicos (TAIZ; ZIEGER, 2004). Aliado a isso, podem estar igualmente associados, fatores relacionados às condições a que os explantes estão submetidos, assim como aos componentes do meio nutritivo e aos fitorreguladores (LEDO et al., 2002).

4.3.3 Subcultivo 2: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais *Handroanthus chrysotrichus*

Houve efeito significativo dos fatores testados para todas as variáveis analisadas, exceto para a oxidação fenólica, que apresentou uma elevada média geral (91,69%). Para a sobrevivência (p=0,0064), o estabelecimento (p=0,0191) e o número de brotos por explante (p=0,0005) houve efeito significativo das concentrações da citocinina BAP, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Porcentagem média de sobrevivência, estabelecimento e número de brotos por explante (NB/E) em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) independente das concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

BAP (µM)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	NB/E
0,0	68,35 a*	65,00 a	1,33 a
1,0	51,65 a b	51,65 a b	0,58 b
1,5	31,55 b	31,55 b	0,85 b
2,0	48,30 a b	48,30 a b	0,72 b
Média	49,96	49,12	0,87
IV**	20,26	21,09	20,65

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Em relação às médias gerais obtidas para sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, ao se estabelecer uma comparação com os dois cultivos anteriores (cultivo inicial e primeiro subcultivo), percebe-se uma redução de, aproximadamente, 40% dos valores médios de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes de *H. chrysotrichus*. Estes resultados, possivelmente, estão associados ao tempo em que o material vegetal está sendo subcultivado nas mesmas condições (em torno de 90 dias), podendo conforme mencionado anteriormente, estar perdendo a capacidade de regeneração *in vitro*. Outro aspecto a ser considerado diz respeito à elevada oxidação fenólica, observada na base de 91,69% dos explantes cultivados *in vitro*. Este fenômeno, geralmente, está associado a redução nas médias de desenvolvimento dos materiais vegetais mantidos sob condições de cultivo *in vitro* e muitas vezes, a ele também, pode estar relacionado o maior ou menor estabelecimento *in vitro* dos explantes (BASSAN et al., 2006).

Já para o número de brotos por explante observou-se que a maior média ocorreu na ausência de BAP, em que foram obtidos 1,33 brotos por explante. Mesmo havendo um leve aumento na média geral de número de brotos (0,87 broto por explante), quando comparada à média verificada durante o primeiro subcultivo (0,26 broto por explante), as concentrações de BAP não induziram uma proliferação de brotos de maneira satisfatória, indicando que esta citocinina é ineficiente nessa fase do cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *H. chrysotrichus*.

Diferentemente dos resultados observados no presente estudo, na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Prunus salicina* Lindl. (ameixeira ‘Santa rosa’), em que foi testado o efeito da citocinina BAP (2,22; 4,44; 8,88 ou 13,33 μ M) acrescida ao meio nutritivo MA1, o melhor resultado obtido para a formação de brotos foi na presença de 8,88 μ M, em que foram observados 3,6 brotos por explante (ROGALSKI et al., 2003). De maneira semelhante, para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra), em meio nutritivo BA (GAMBORG et al., 1968), acrescido de 8,88 μ M de BAP, a melhor resposta foi de 3,5 gemas axilares por explante (BORGES et al., 2004).

Para número de gemas por explante, número de folhas por explante e número de ápices por explante (com valores de “p” de 0,0102; 0,0103 e 0,0269 respectivamente) foi observada interação significativa entre os fatores principais. As médias observadas para estas variáveis estão expostas nas Tabelas 9, 10 e 11 respectivamente.

Tabela 9 – Número médio de gemas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

BAP (μ M)	Número de gemas por explante		Média
	ANA (μ M)		
	0	0,05	
0,0	4,33 a*A	4,60 a b A	4,46
1,0	2,93 a A	4,93 a A	3,93
1,5	4,40 a A	1,67 b B	3,03
2,0	2,67 a A	4,80 a A	3,74
Média	3,58	4,00	3,79
IV**	21,00		

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Tabela 10 – Número médio de folhas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

BAP (µM)	Número de folhas por explante		Média
	ANA (µM)		
	0	0,05	
0,0	3,30 a*A	3,33 a b A	9,95
1,0	2,27 a A	3,63 a A	8,85
1,5	3,33 a A	1,13 b B	6,70
2,0	1,86 a A	3,50 a A	8,05
Média	2,69	2,90	2,80
IV**	22,04		

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Para o número de gemas e o número de folhas, a combinação entre a auxina com 1,5µM de BAP não promoveu resultado satisfatório, o qual não diferiu significativamente da média observada quando apenas ANA estava presente. De maneira geral, foi possível perceber que, assim como para a sobrevivência e o estabelecimento *in vitro*, houve uma considerável redução nas médias se comparadas ao primeiro subcultivo e ao cultivo inicial. Esse decréscimo pode estar associado à elevada porcentagem de oxidação fenólica nos explantes (91,69%). Como já discutido anteriormente, a oxidação fenólica pode provocar uma redução no desenvolvimento das culturas pela liberação de substâncias tóxicas aos cultivos. Outra relação que pode ser estabelecida e, que, também, já foi mencionada referindo-se à sobrevivência e estabelecimento, é com o tempo de cultivo *in vitro* do material vegetal (em torno de 90 dias, ao se considerar desde o cultivo inicial), o qual pode ir perdendo a capacidade de responder aos estímulos que lhes foram impostos.

De maneira semelhante, na micropropagação de segmentos nodais de *Didymopanax morototoni* (caixeta), cultivados em meio nutritivo WPM suplementado com 4,44µM de BAP ou TDZ, foi percebido que, após três subcultivos, houve redução na taxa de multiplicação *in vitro* dos explantes (MANTOVANI et al., 1999). Resultado que, também, foi observado para híbridos de *Eucalyptus globulus* Labill.

(eucalipto), durante a fase de multiplicação *in vitro*, atribuindo-se, de modo geral, a causa para o declínio de respostas *in vitro*, à execução de subcultivos contínuos sem alterações das condições *in vitro* (BORGES et al., 2011).

Tabela 11 – Número médio de ápices por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

BAP (µM)	Número de ápices por explante		Média
	ANA (µM)		
	0	0,05	
0,0	1,23 a*A	1,43 a A	1,33
1,0	0,80 a A	1,20 a A	1,00
1,5	1,00 a A	0,40 b B	0,70
2,0	0,67 a A	1,30 a A	0,99
Média	0,93	1,08	1,00
IV**	19,59		

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ** IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Para o número de ápices por explante a combinação entre 1,5µM de BAP com a auxina proporcionou a menor média para esta variável em relação às demais. De modo geral, para a média observada no presente ensaio, também, foi constatada uma redução quando comparada à média resultante no primeiro subcultivo (1,19). Durante a avaliação do ensaio, já fora observado que os brotos formados tinham tamanho muito pequeno, não possuindo, ainda, desenvolvimento de parte aérea completa. Esse resultado, assim como aqueles observados para a maioria das variáveis analisadas neste ensaio, pode estar associado aos sucessivos subcultivos, à ineficiência das concentrações da citocinina aplicada visando à multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus* e ainda, à elevada oxidação fenólica nos segmentos nodais cultivados *in vitro*, como já discutido anteriormente.

Para a calogênese houve efeito significativo da auxina ANA (Tabela 12). Os segmentos nodais de *H. chrysotrichus* apresentaram menor porcentagem de calos na ausência da auxina, sendo considerado o melhor tratamento.

Tabela 12 – Porcentagem média de calogênese em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes concentrações de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M) independentemente das concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

ANA (μ M)	Calogênese (%)
0,00	14,97 a*
0,05	29,10 b
Média (%)	22,03
IV**	42,10

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Pode-se perceber que, no presente subcultivo, houve menor formação calogênica, quando comparado aos dois cultivos que o antecederam. Este resultado por estar associado às menores médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes observadas nesse subcultivo. Resposta que, também, pode estar relacionada ao tempo de cultivo *in vitro* do mesmo material vegetal e à alta porcentagem de oxidação fenólica na base dos segmentos nodais.

4.3.4 Subcultivo 3: Multiplicação *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

O subcultivo 3 foi realizado com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento *in vitro* das brotações de *H. chrysotrichus* formadas nos cultivos anteriores. Durante este subcultivo, todas as brotações obtidas foram, quando possível, subcultivadas em meio nutritivo fresco WPM na ausência de fitorreguladores, não havendo, portanto, fontes de variação a serem testadas. Optou-se por não adicionar fitorreguladores ao meio nutritivo devido às respostas pouco promissoras de *H. chrysotrichus* na sua presença durante os três primeiros cultivos, sendo que, mesmo havendo um pequeno incremento para algumas variáveis, não foi verificada uma multiplicação eficiente dos explantes. Alguns estudos indicam que o acréscimo de

fitorreguladores aos meios nutritivos, muitas vezes, controlam ou induzem a morfogênese *in vitro* de maneira satisfatória. Entretanto, a exposição prolongada do material vegetal à presença de fitorreguladores, pode acarretar em perda da capacidade organogênica e, em alguns casos, podem inclusive causar desordens fisiológicas (ANDRADE et al., 2012).

No entanto, mesmo sem a presença de fontes de variação (tratamentos) para o presente subcultivo, foi realizada a avaliação de algumas variáveis-resposta visando analisar o desempenho das culturas. Com essa finalidade, será apresentado um quadro (Quadro 2) com as médias gerais observadas para as variáveis avaliadas durante esse subcultivo.

<i>Variáveis</i>	<i>Médias gerais</i>
Sobrevivência <i>in vitro</i> (%)	71,93
Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)	71,93
Nº brotos por explante	0,68
Nº gemas por explante	5,18
Nº folhas por explante	4,31
Nº ápices por explante	1,12
Nº entrenós por explante	1,60
Calogênese <i>in vitro</i> (%)	0,88
Rizogênese <i>in vitro</i> (%)	9,64
Oxidação fenólica (%)	85,53

Quadro 2 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, na ausência de fitorreguladores, subsequente a dois subcultivos anteriores e cultivo inicial, totalizando 90 dias, na presença de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Ácido α -Naftaleno Acético – ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

De maneira geral, a maioria das médias observadas durante o presente subcultivo, com exceção do número de brotos por explante e da calogênese, todas as demais variáveis avaliadas em comum com o subcultivo anterior (subcultivo 2), apresentaram médias gerais mais elevadas em relação as obtidas no segundo subcultivo. Para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, pode-se perceber que houve um aumento nas médias resultantes, quando o material foi subcultivado em meio nutritivo WPM, sem a presença de fitorreguladores. Além disso, para número

de gemas por explante, número de folhas por explante, número de ápices por explante e número de entrenós por explante, também foi possível verificar o mesmo comportamento, havendo desenvolvimento dos tecidos vegetais, mesmo na ausência de fitorreguladores. Este fato, ratifica o que anteriormente foi mencionado, que, para a multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*, o uso de fitorreguladores testados (BAP e ANA) pode ser dispensável, nas condições avaliadas.

Para outra espécie florestal, *Grevillea robusta* Cunn. (grevilha), a fase de multiplicação e alongamento *in vitro* de explantes advindos de sucessivos subcultivos foi possível sem a presença dos fitorreguladores testados (BAP, ANA, Ácido Indol Acético – AIA, Ácido Indol Butírico - AIB, e Ácido Giberélico - GA₃) (SANTOS et al., 2004). Resultado semelhante, também, foi obtido para *Albizia niopoides* (Bentham) Burkart (farinha-seca), em que foi possível multiplicar o material vegetal, a partir de segmentos nodais cultivados em meio nutritivo WPM, sem o acréscimo de fitorreguladores (ROSSI; SARTORETTO, 2013).

4.3.5 Subcultivo 4: Multiplicação *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo MS

Da mesma maneira como descrito para o subcultivo 3, o presente subcultivo, também, teve como objetivo manter e multiplicar as brotações de *H. chrysotrichus* desenvolvidas nos subcultivos anteriores. Assim, todas as brotações desenvolvidas *in vitro* foram multiplicadas e subcultivadas em meio nutritivo fresco MS, na ausência de fitorreguladores, sendo todo o material vegetal submetido às mesmas condições descritas anteriormente. O meio nutritivo MS foi utilizado visando fornecer uma condição diferenciada às brotações de *H. chrysotrichus*, que até então estavam sendo cultivadas em meio nutritivo WPM, na tentativa de promover um estímulo ao desenvolvimento *in vitro* desse material vegetal. No Quadro 3 estão expostas as médias gerais obtidas para as variáveis avaliadas durante esse subcultivo.

<i>Variáveis</i>	<i>Médias gerais</i>
Sobrevivência <i>in vitro</i> (%)	43,62
Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)	43,62
Nº brotos por explante	0,51
Nº gemas por explante	2,63
Nº folhas por explante	2,53
Nº ápices por explante	0,64
Nº entrenós por explante	0,60
Calogênese <i>in vitro</i> (%)	0,82
Rizogênese <i>in vitro</i> (%)	0,82
Oxidação fenólica (%)	94,23

Quadro 3 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo MS, na ausência de fitorreguladores, subsequente a três subcultivos anteriores e cultivo inicial, totalizando 120 dias de cultivo *in vitro*, sendo que 90 dias na presença de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Ácido α -Naftaleno Acético – ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Ao contrário do que foi verificado para o subcultivo anterior, durante esse subcultivo todas as médias gerais sofreram considerável redução. Apenas a oxidação fenólica, observada na base das brotações, mostrou-se ainda mais elevada, fenômeno que pode estar relacionado à redução nas médias de todas as demais variáveis avaliadas, neste subcultivo. Da mesma maneira, outro fator que pode estar relacionado a essa redução, é a utilização do meio nutritivo MS, o qual pode não ter atendido de modo satisfatório as necessidades nutricionais das brotações, sugerindo não ser o meio nutritivo mais adequado à multiplicação *in vitro* dessa espécie.

De maneira similar, o meio nutritivo MS, também, não foi o mais apropriado na regeneração *in vitro* de *Cordia trichotoma* (louro-pardo) (MANTOVANI et al., 2001). Igualmente, foi o verificado, durante a micropropagação de *Didymopanax morototoni* (caixeta), em que o mesmo meio nutritivo não foi o mais eficiente no cultivo *in vitro* de brotações dessa espécie (MANTOVANI et al., 1999).

4.3.6 Taxas de multiplicação *in vitro* para o cultivo inicial e subcultivos

Os resultados para as taxas de multiplicação *in vitro* referentes aos cultivos anteriores (cultivo inicial, subcultivo 1, subcultivo 2, subcultivo 3 e subcultivo 4) estão apresentados na Tabela 13. Foi observada diferença significativa entre os valores obtidos para cada taxa de multiplicação estimada em relação aos períodos de cultivo.

A primeira taxa média de multiplicação foi calculada considerando-se o número total de gemas formadas, excluindo-se a apical, durante o cultivo inicial dos segmentos apicais caulinares em um período de 30 dias, sendo que o valor atingido foi de 794 gemas. Embora este resultado seja bastante elevado, foi obtido um valor ainda maior no subcultivo 1 (803 gemas), sendo este o mais alto se comparados àqueles obtidos nos demais cultivos realizados. Os valores obtidos por meio desta estimativa indicam o potencial de propagação do material vegetal em cultivo (SANTIAGO, 2011).

Tabela 13 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de explantes (segmentos apicais caulinares ou segmentos nodais) de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados e subcultivados *in vitro* em meios nutritivos (½WPM, WPM ou MS), na presença ou ausência de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina - BAP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012/2013.

Cultivos <i>in vitro</i>	TX ₁ **	TX ₂ ***	TX ₃ ****
Cultivo inicial	794 b*	7,62 a	-
Subcultivo 1	803 a	4,35 b	4,04 a
Subcultivo 2	430 d	1,90 d	-
Subcultivo 3	725 c	2,59 c	2,72 b
Subcultivo 4	152 e	1,31 e	1,24 c
Média	580,8	3,55	2,67

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **calculada por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical; ***divide-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do cultivo; ****quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes.

Observaram-se, de uma maneira geral, valores muito altos para a primeira taxa de multiplicação (TX_1) empregada, a qual foi originalmente usada para estimar as taxas de multiplicação em cultivares de batata, por Pereira; Fortes (2004). Esta resposta é bastante interessante, especialmente, quando relacionada à multiplicação *in vitro* de uma espécie florestal nativa brasileira, haja vista que a maioria dos trabalhos não contempla essas estimativas. No entanto, alguns dos estudos visando obter a taxa de multiplicação *in vitro* para espécies lenhosas têm sido executados, em grande parte, com o gênero *Eucalyptus* (ALMEIDA, 2012; BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2009; SOBROSA; CORDER, 2003; BENNETT et al., 1994; CORREIA, 1993). As taxas de multiplicação que vem sendo obtidas são bastante variáveis entre diferentes híbridos deste gênero, como por exemplo, para o híbrido *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* em que a média observada foi 20,2 gemas por explante (BRONDANI et al., 2009), enquanto que para híbridos de *E. globulus* a média obtida foi de 4,7 brotações por explante (BORGES et al., 2011) e 7,0 brotos por explante para *E. grandis* (ANDRADE et al., 2006).

Por meio desse mesmo cálculo (TX_1), para cultivares de batata mantidas *in vitro* o resultado observado para os rametes mais produtivos foi de 72 gemas, para o ramete A33 da cultivar Asterix, enquanto que para o ramete 5D de Atlantic, a taxa média resultante foi de 102,38 gemas formadas ao longo dos oito subcultivos (SANTIAGO, 2011). A referida autora indica que as taxas de multiplicação são fatores importantes relacionados à estabilidade genética do material vegetal cultivado *in vitro*, podendo ser indicativo, quando as taxas de multiplicação são muito elevadas, de variação somaclonal.

A variação somaclonal, pode ser gerada por alterações genéticas ou epigenéticas (mudanças reversíveis) nas plantas durante a propagação *in vitro* e, pode ter sua origem associada a diversas causas, dentre as quais podem ser incluídas altas taxas de multiplicação e o estresse provocado ao material vegetal pela execução de sucessivos subcultivos (RIBEIRO, 2012). Entretanto, dependendo do objetivo do estudo, a ocorrência de desse tipo de variação pode ser interessante, tendo em vista, por exemplo, a ampliação da variabilidade genética de uma espécie com base genética estreita. Por outro lado, quando se deseja a multiplicação de genótipos elite, a ocorrência dessas variações pode ser desfavorável (SANTIAGO, 2011).

Para espécies florestais ainda são poucos os relatos a respeito destes eventos. Um dos estudos relacionados à variação somaclonal apontou a ocorrência de mecanismos epigenéticos que promoveram alterações nos resultados obtidos durante o cultivo *in vitro* de clones de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson (eucalipto) quanto ao desenvolvimento requerido. Estando estas respostas, conforme a autora, correlacionadas à nutrição mineral no cultivo *in vitro* (ALMEIDA, 2012). Em *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), foi avaliada a estabilidade genética na calogênese *in vitro*, sendo os calos submetidos à técnica de marcadores de DNA denominada Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados - AFLP, para verificar a possível ocorrência de variação somaclonal em função da origem dos explantes, números de subcultivos e período de cultivo *in vitro*. Os resultados observados pelo autor foram de que, apesar de o uso da técnica AFLP ser viável para a condução de estudos com a espécie, não foi possível detectar, de maneira precisa, a ocorrência de variação somaclonal, sendo, nesse sentido, necessários ajustes para ampliar o poder da técnica (NENARTAVIS, 2010).

Dessa maneira, diante dos resultados obtidos no presente ensaio, no que diz respeito às elevadas médias observadas de multiplicação *in vitro*, estimadas por meio do emprego da primeira taxa (TX₁), para os explantes de *H. chrysotrichus*, sugerem, que além do bom potencial da espécie para essa fase do cultivo *in vitro*, pode ser indicativa da ocorrência de variações somaclonais durante a execução de subcultivos sucessivos. Contudo, estudos específicos a respeito destes aspectos devem ser realizados para investigar essas questões.

Em relação às demais taxas que foram calculadas (TX₂ e TX₃), as quais podem fornecer uma estimativa em relação à capacidade de crescimento e desenvolvimento do material vegetal que está sendo micropropagado (SANTIAGO, 2011), obtiveram-se resultados semelhantes para ambas as estimativas durante os subcultivos em que estas foram calculadas. Em estudo realizado com *Malus prunifolia* Willd, Borkh (macieira cv. Marubakaido) em meio nutritivo MS acrescido de 4,44µM de BAP, foi obtida uma taxa média de multiplicação de 12,9 após 40 dias de cultivo *in vitro* (ERIG; SCHUCH, 2002), a qual foi superior às taxas TX₂ e TX₃ observadas no presente ensaio. No entanto, é recomendado considerar que na multiplicação *in vitro*, não se trata apenas de alcançar taxas elevadas de multiplicação para alguns explantes, o interessante é obter valores médios que

sejam satisfatórios, havendo o mínimo de variação entre explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

4.3.7 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de Cinetina (CIN) e tipos de explantes na multiplicação *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus*

Para a sobrevivência não houve efeito significativo para nenhum dos fatores testados e, tampouco, para a interação entre eles. Entretanto, foi observada uma elevada média geral, de 95,36% (IV=4,13%) de sobrevivência *in vitro* dos explantes. Para o estabelecimento *in vitro*, a análise de variância resultou significativa para a interação entre os fatores testados ($p=0,0205$), no entanto, o teste de médias não revelou diferença significativa para explantes do tipo segmento apical caulinar. Contudo, houve efeito significativo das concentrações de citocininas quando o explante usado foi o segmento nodal (Tabela 14).

Tabela 14 – Porcentagem média de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA a $0,05\mu\text{M}$ e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)			
CIN (μM)	Tipos de explantes		
	Segmento apical caulinar	Segmento nodal	Média (%)
0,0	87,62 a*A	100,0 a A	93,81
1,0	91,75 a A	100,0 a A	95,87
1,5	95,87 a A	83,37 b B	89,62
2,0	100,0 a A	87,62 a A	93,81
Média (%)	93,81	92,75	93,28
IV**	5,34		

*médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Os dois tipos de explantes apresentaram, de maneira geral, altas porcentagens de estabelecimento *in vitro*, exceto segmentos nodais na presença de 1,5µM de cinetina que apresentaram média inferior, de maneira semelhante ao que foi verificado em outro ensaio quando foi utilizada a citocinina BAP. Os resultados observados indicam que, para essa fase do cultivo *in vitro* de *H. chrysotrichus*, a citocinina testada é dispensável. Da mesma maneira, para o número de brotos por explante ($p=0,0137$) e o número de ápices por explante ($p=0,0133$) foi verificada interação significativa entre as concentrações de CIN e os diferentes tipos de explantes testados (Tabelas 15 e 16 respectivamente). Houve diferenças significativas entre os tipos de explantes utilizados e as concentrações de CIN, sendo que os segmentos nodais apresentaram maior formação de brotos por explante, de maneira geral, em comparação aos segmentos apicais caulinares.

Tabela 15 – Número médio de brotos por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA a 0,05µM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Número de brotos por explante			
CIN (µM)	Tipos de explantes		Média
	Segmento apical caulinar	Segmento nodal	
0,0	0,00 a*B	1,75 a A	0,88
1,0	0,00 a B	1,67 a b A	0,84
1,5	0,25 a B	1,13 b A	0,69
2,0	0,04 a B	1,67 a b A	0,86
Média	0,07	1,56	0,82
IV**	17,96		

*médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

De maneira geral, o segmento nodal apresentou melhor resultado, tanto para número de brotos por explante quanto para o número de ápices por explante, em relação ao segmento apical caulinar. Este resultado pode ser atribuído ao número de gemas iniciais presentes nos explantes, pois o segmento nodal continha duas gemas

axilares pré-existentes, enquanto que o segmento apical caulinar apenas a gema apical, podendo esta diferença entre os explantes ter influenciado no melhor desempenho *in vitro* do segmento nodal quanto à formação de brotos e ápices, independentemente da presença da citocinina (Figura 3). No entanto, esses valores ainda são considerados baixos quando o objetivo é a multiplicação *in vitro* do material vegetal.

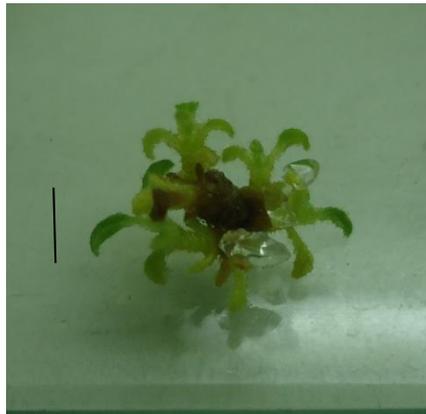


Figura 3 – Formação de brotações em segmento nodal de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA ($0,05\mu\text{M}$). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Visando à indução de brotações *in vitro* em segmentos nodais de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (peroba-rosa), os explantes foram inoculados em meio nutritivo WPM, suplementado de concentrações de BAP, Zeatina – ZEA ou CIN (0; 2,2; 4,4 ou $8,8\mu\text{M}$), durante o cultivo inicial e os dois subcultivos subsequentes. As maiores taxas médias de regeneração de brotações axilares (4-5 brotos por explante) foram obtidas na presença de BAP e ZEA a partir de $4,4\mu\text{M}$, após o segundo subcultivo. Conforme os autores, a citocinina CIN pode promover baixas taxas médias de regeneração de brotações (2-3), ou, então, que este fitorregulador, em algumas espécies, contribui para o alongamento das brotações (RIBAS et al., 2005). Em estudo com *Handroanthus impetiginosus* Mattos (ipê-roxo), com objetivo de verificar a influência das concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ou $8\mu\text{M}$) de CIN na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais, após 60 dias de cultivo em

meio nutritivo WPM, foi observado que, a presença da concentração mais alta da citocinina, resultou na formação de maior número médio de brotos por explante (4,0) e número médio de gemas por explante (10,83) para essa espécie (MÁXIMO et al., 2010). A cinetina, nas concentrações de 4,65 e 23,23 μM , foi mais eficiente na indução de brotos (3,00) e gemas (1,83), respectivamente, em segmentos caulinares de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) cultivados *in vitro* em meio nutritivo MS após 60 dias (NICIOLI, 2006).

Tabela 16 – Número médio de ápices por explante em segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA a 0,05 μM e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2 μM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Número de ápices por explante			
CIN (μM)	Tipos de explantes		
	Segmento apical caulinar	Segmento nodal	Média
0,0	0,96 a*B	1,88 a A	1,42
1,0	0,96 a B	1,79 a A	1,38
1,5	1,04 a B	1,29 b B	1,17
2,0	1,04 a B	1,75 a A	1,40
Média	1,00	1,68	1,34
IV**	7,95		

*médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Igualmente ao verificado para o número de brotos por explante, para o número de ápices por explante, a melhor resposta obtida foi com a utilização do segmento nodal, exceto na concentração a 1,5 μM de CIN. Para essa variável o comportamento dos diferentes tipos de explantes em relação às concentrações da CIN, foi semelhante ao observado para o estabelecimento *in vitro*. Foi observado que a maior média (1,88) para os segmentos nodais foi obtida na ausência da citocinina, no entanto, este resultado não diferiu de maneira significativa das respostas obtidas para as demais concentrações de CIN. Por outro lado, para os

segmentos apicais caulinares, foram verificadas médias mais promissoras para o número de ápices por explante na presença das concentrações mais altas da CIN, entretanto, não houve diferença significativa entre as demais médias considerando este tipo de explante.

Para o número de gemas por explante (IV=13,64%) e o número de folhas por explante (IV=17,29%) não foi observado efeito significativo entre os fatores testados e nem para a interação, sendo observadas médias gerais de 4,70 gemas por explante e 2,97 folhas por explante. Entretanto, foi possível obter melhores resultados para ambas as variáveis com a utilização de BAP e/ou ANA nos ensaios discutidos anteriormente, durante os dois primeiros cultivos (cultivo inicial e subcultivo 1).

Para a calogênese houve efeito significativo apenas da concentração de CIN ($p=0,0165$), como apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 – Médias de porcentagem de calogênese em segmentos apicais caulinares ou segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA a $0,05\mu\text{M}$ e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

CIN (μM)	Calogênese (%)
0,0	0,00 a*
1,0	37,56 b
1,5	22,87 a b
2,0	31,25 a b
Média	22,92
IV**	8,10

*médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

O melhor tratamento foi observado na ausência de CIN, uma vez que os calos estavam presentes apenas quando a citocinina foi adicionada, sugerindo que o balanço hormonal foi alterado com a utilização de uma fonte de citocinina exógena, favorecendo a calogênese. Entretanto, em comparação com o ensaio (cultivo inicial) em que se utilizou a citocinina BAP, igualmente ao que foi observado para o número

de gemas e o número de folhas por explante, foi, também, obtida menor formação de calos na base dos explantes quando cultivados com CIN. Isso se deve ao fato de que, de maneira geral, BAP pode ser considerada uma citocinina mais eficiente na indução de respostas *in vitro*.

Durante o estabelecimento *in vitro* de *E. involucrata* aos 60 dias de cultivo, foi observado que os segmentos apicais caulinares apresentaram 66,66% de calos na região basal em meio nutritivo WPM, enquanto segmentos nodais obtiveram 38,74% (GOLLE et al., 2012). Na multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L. (figueira), segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de CIN (0,0; 2,32; 4,65; 9,29 ou 18,59 μ M) combinadas a Ácido Giberélico - GA₃ (0,0; 5,77; 11,55; 17,32 ou 23,09 μ M). Adicionalmente, os resultados indicaram que houve formação de calos na presença de CIN independentemente da suplementação com GA₃ (FRÁGUAS et al., 2004).

Para a porcentagem de enraizamento e de oxidação fenólica houve efeito significativo do fator tipo de explante (apresentando valores de “p” de 0,0015 e 0,0000 respectivamente). Os resultados para estas variáveis podem ser visualizados na Tabela 18.

Tabela 18 – Médias de porcentagem de enraizamento e oxidação fenólica em segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA a 0,05 μ M e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Tipo de Explante	Enraizamento (%)	Oxidação Fenólica (%)
Segmento apical caulinar	14,50 a*	23,97 a*
Segmento nodal	1,03 b	90,62 b
Média (%)	7,76	57,30
IV**	73,24	16,81

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Os segmentos apicais caulinares apresentaram maior formação *in vitro* de raízes e menor oxidação fenólica que os segmentos nodais. Nas condições

testadas, esse resultado pode indicar uma maior aptidão ao enraizamento *in vitro*, para essa espécie, do explante que contém o meristema apical, aliado ao fato de que houve uma menor oxidação fenólica. Neste mesmo estudo, durante o cultivo inicial em que foram testadas diferentes concentrações de BAP e ANA, também, foi observada que a maior porcentagem de enraizamento *in vitro* (56,8%) em segmentos apicais caulinares se deu quando a porcentagem de oxidação fenólica foi menor.

De maneira geral, muitos fatores podem estar envolvidos na formação de raízes em plantas cultivadas *in vitro*, sendo um deles a juvenildade do material vegetal. São considerados tecidos mais juvenis àqueles que contém o meristema apical, portanto, conferindo aos segmentos apicais caulinares, possivelmente, maior capacidade de indução de raízes adventícias (SOUZA; PEREIRA 2007). Aliado a isso, tecidos mais jovens também apresentam menor suscetibilidade à ocorrência de oxidação fenólica, estando esta associada a tecidos mais velhos e lignificados (TEIXEIRA, 2005).

Semelhantemente ao observado no presente estudo, na multiplicação *in vitro* de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), os segmentos nodais apresentaram os maiores níveis de oxidação, fato que ocorreu no cultivo em meio MS suplementado com 6,7 μ M de BAP. Já em relação ao enraizamento *in vitro* desta espécie, foi verificado uma média de 70% em segmentos apicais caulinares, mas de, apenas, 10% em segmentos nodais na ausência de fitorreguladores no meio nutritivo aos 35 dias de cultivo (ANDRADE et al., 2000).

4.3.8 Subcultivo 1 Efeito de diferentes concentrações de CIN na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus*

Não houve efeito significativo das concentrações de cinetina para nenhuma das variáveis testadas, exceto para a calogênese. Entretanto, foi obtida uma elevada sobrevivência (IV=7,32%) e estabelecimento *in vitro* (IV=7,72%) dos segmentos nodais inoculados, apresentando elevadas médias gerais de 91,72% e 89,65% respectivamente.

No presente ensaio, para o número de brotos (IV=39,63%) obteve-se uma média geral de 0,77 broto por explante, a qual se manteve, praticamente, inalterada quando comparada à média geral obtida no cultivo inicial, que foi de 0,81 brotos por explante. O número de ápices (IV=15,19%) apresentou comportamento semelhante, sendo observada uma média geral de 1,26 ápices por explante, a qual foi levemente inferior quando comparada à média geral obtida no cultivo inicial (1,34 ápices por explante). De maneira semelhante, esse resultado foi observado, também, nos ensaios em que se utilizou a citocinina BAP, nas mesmas concentrações empregadas no presente ensaio, durante o primeiro subcultivo de segmentos nodais de *H. chrysotrichus*.

Já para o número de gemas (IV=10,72%) e o número de folhas (IV=17,79%), em que as médias gerais observadas foram de 5,39 gemas por explante e 3,62 folhas por explante, pode-se notar um leve aumento nas médias gerais obtidas neste subcultivo ao compará-las com aquelas verificadas no cultivo inicial (4,70 gemas por explante e 2,97 folhas por explante). Essa resposta pode estar relacionada ao maior tempo de contato dos explantes com o meio nutritivo, tendo em vista que várias espécies florestais apresentam certa recalcitrância ao cultivo *in vitro*, podendo, muitas vezes, necessitar de um período mais longo de contato com os tratamentos a que são submetidas para evidenciar alguma resposta. Esse comportamento, também pode ser visto para a porcentagem de enraizamento (IV=49,90%), que, no presente ensaio, apresentou média geral de 19,75%, a qual foi superior à média geral do cultivo inicial (7,76%). Este resultado, mesmo durante a fase de multiplicação *in vitro*, é bastante interessante, tendo em vista a dificuldade de se promover a rizogênese *in vitro* de raízes em muitas espécies lenhosas.

Não diferindo do comportamento das variáveis já referidas, a porcentagem de ocorrência de oxidação fenólica (IV=24,33%) na base dos explantes, também se manteve semelhante quando comparada à média geral obtida no cultivo inicial (57,30%), mostrando-se ainda elevada (59,87%). Entretanto, esta não inviabilizou o desenvolvimento *in vitro* dos segmentos nodais de *H. chrysotrichus*, nas condições testadas. Diferente do observado para *Swietenia macrophylla* King (mogno), em que a alta porcentagem de oxidação fenólica (90%) nos explantes, na presença de BAP e CIN, impossibilitaram a regeneração *in vitro* e impediu a execução de subcultivos (PINTO, 2012).

Em relação à formação de calos junto aos explantes, houve efeito significativo das diferentes concentrações da citocinina testada ($p= 0,0029$). Os resultados para calogênese podem ser visualizados na Tabela 19.

Tabela 19 – Médias de porcentagem de calogênese em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de Ácido α -Naftaleno Acético - ANA a $0,05\mu\text{M}$ e das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

CIN (μM)	Calogênese (%)
0,0	0,00 a*
1,0	39,62 b
1,5	18,81 a b
2,0	43,81 b
Média (%)	25,56
IV**	49,08

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

No presente ensaio, não houve formação de calos na ausência do fitorregulador, comportamento que, também, foi observado no cultivo inicial deste material vegetal. Entretanto, na presença de CIN, de maneira geral, foi observada elevada formação de calos nos segmentos nodais de *H. chrysotichus* cultivados *in vitro*. Este resultado sugere que, na presença da citocinina, o balanço hormonal endógeno foi alterado, favorecendo a calogênese, a qual pode ser uma rota alternativa à indução de novas brotações quando a finalidade é a multiplicação *in vitro*. Isso pode ser considerado um bom resultado, tendo em vista que, grande parte dos materiais vegetais subcultivados podem ir perdendo a capacidade de desenvolvimento *in vitro* com o prolongamento dos cultivos.

Resultado semelhante ao observado no presente estudo em relação à calogênese, também foi verificado em *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra) durante a fase de multiplicação *in vitro*. Após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo B5 (GAMBORG et al., 1968), foi obtido 100% de calos na base de

segmentos nodais na presença de 14 μ M de CIN, sendo que na ausência dessa citocinina não houve indução à calogênese (BORGES JÚNIOR et al., 2004).

4.3.9 Subcultivo 2: Multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

Assim como já mencionado para os subcultivos 3 e 4 realizados a partir do material vegetal utilizado nos ensaios, em que se testaram diferentes concentrações de BAP e ANA, o presente subcultivo teve a mesma finalidade, qual seja a de subcultivar o material vegetal de *H. chrysotrichus*, desenvolvido *in vitro* durante o cultivo inicial e primeiro subcultivo, em meio nutritivo WPM na ausência de fitorregulares para continuar a acompanhar o seu processo de regeneração *in vitro*. Desse modo, todo o material vegetal obtido foi subcultivado nas mesmas condições, não havendo sua distribuição em tratamentos. Os resultados referentes às médias gerais obtidas para as variáveis analisadas estão expostas no Quadro 4.

<i>Variáveis</i>	<i>Médias gerais</i>
Sobrevivência <i>in vitro</i> (%)	96,72
Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)	96,72
Nº brotos por explante	0,84
Nº gemas por explante	4,49
Nº folhas por explante	3,34
Nº ápices por explante	1,28
Nº entrenós por explante	1,03
Calogênese <i>in vitro</i> (%)	1,09
Rizogênese <i>in vitro</i> (%)	19,67
Oxidação fenólica (%)	49,18

Quadro 4 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, na ausência de fitorreguladores, subsequente a um subcultivo anterior e cultivo inicial, totalizando 60 dias de cultivo na presença de Cinetina (CIN) e Ácido α -Naftaleno Acético – ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes foram observadas médias superiores em relação às médias verificadas durante o cultivo

inicial (95,36% e 93,28% respectivamente) e primeiro subcultivo (91,72% e 89,65% respectivamente). Este resultado é bastante promissor, tendo em vista que, o material vegetal utilizado no presente subcultivo manteve sua capacidade de regeneração mesmo estando sob as condições de cultivo *in vitro* a mais de 90 dias.

Para as demais variáveis analisadas, de maneira geral, foi possível perceber que houve a manutenção das médias obtidas nos cultivos anteriores, exceto para a calogênese. Os resultados observados foram considerados positivos, indicando que até esse momento, o material vegetal de *H. chrysotrichus* foi capaz de se manter responsivo mesmo sendo submetido a subcultivos sucessivos. Entretanto, a oxidação fenólica também se manteve alta, porém não comprometendo o desenvolvimento *in vitro* dos explantes.

4.3.10 Taxas de multiplicação *in vitro* para o cultivo inicial e subcultivos

As taxas de multiplicação *in vitro* foram calculadas para o cultivo inicial, o primeiro e o segundo subcultivo de culturas iniciadas a partir de explantes de *H. chrysotrichus*, cultivados, inicialmente, na presença de CIN e ANA. Na Tabela 20 estão apresentadas as taxas de multiplicação estimadas para os referidos cultivos.

Tabela 20 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de explantes (segmentos apicais caulinares ou segmentos nodais) de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados e subcultivados *in vitro* em meios nutritivos (½WPM ou WPM), acrescidos ou não das diferentes concentrações de Cinetina - CIN (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Cultivos	TX ₁ **	TX ₂ ***	TX ₃ ****
Cultivo inicial	615 b	3,13 a	-
Subcultivo 1	651 a	2,70 b	-
Subcultivo 2	456 c	2,25 c	2,31
Média	574	2,69	2,31

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **calculada por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical; ***divide-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do cultivo; ****quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes.

Da mesma maneira, como observado para os cultivos *in vitro* iniciados com a presença de BAP e/ou ANA, houve diferenças significativas entre as taxas de multiplicação estimadas para cada período de cultivo. Foi observado o mesmo comportamento do material vegetal quando se comparou a taxa de multiplicação obtida no cultivo inicial e primeiro subcultivo dos ensaios anteriores, sendo que durante o primeiro subcultivo foi observado o maior valor médio de taxa de multiplicação, o qual se apresentou superior aos demais. Também, observaram-se, de modo geral, elevadas taxas de multiplicação referentes aos valores obtidos para a primeira taxa estimada (TX₁). Este resultado pode indicar que, independentemente dos tratamentos que foram testados, a espécie apresenta um desempenho promissor quanto à formação de gemas durante o cultivo *in vitro*.

Além disso, essas informações podem colaborar para o incremento de estudos relacionados a espécies lenhosas nativas do Brasil, no que diz respeito às estimativas de taxas específicas de multiplicação *in vitro*, e, também, dos possíveis efeitos que podem estar associados a estes resultados, como a ocorrência de variantes somaclonais nas plantas subcultivadas, conforme discutido anteriormente.

Assim como para os valores da TX₁, as demais taxas mantiveram médias semelhantes àquelas obtidas nos experimentos anteriores. A estimativa mais alta para a taxa de multiplicação TX₂ foi observada no cultivo inicial, sendo que as estimativas para as demais taxas médias foram decrescendo gradativamente nos subcultivos subsequentes, o que pode estar relacionado ao tempo de exposição às condições *in vitro*, em que o material pode ir diminuindo sua capacidade morfogênica ao longo do tempo. Comportamento semelhante foi verificado para clones híbridos de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), sendo que as taxas de multiplicação foram mais elevadas nos primeiros subcultivos e, a partir do terceiro, essa tendência não se manteve. Os autores atribuíram essa queda nas taxas de multiplicação à execução de subcultivos contínuos nas mesmas condições, sugerindo a alteração de alguma dessas condições entre um subcultivo e outro para tentar estimular as respostas *in vitro* (BORGES et al., 2011).

4.3.11 Cultivo inicial: Efeito de diferentes concentrações de 2-iP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

Não houve efeito significativo dos fatores isolados e tampouco da interação entre a citocinina e a auxina testadas para sobrevivência e estabelecimento *in vitro* (96,67%; IV=3,80%), número de brotos por explante (1,44; IV=13,38%), número de gemas por explante (5,84; IV=9,21%) e número de ápices por explante (1,62; IV=9,60%). No entanto, para a sobrevivência e estabelecimento foram obtidas médias gerais elevadas, ao passo que para o número de gemas, pode-se considerar a média adequada, enquanto que, para o número de brotos e o número de ápices, as médias observadas foram baixas.

Para o número de folhas ($p=0,0088$), o número de entrenós ($p=0,0073$), a calogênese ($p=0,0009$) e a oxidação fenólica ($p=0,0187$) houve efeito significativo das concentrações de ANA testadas (Tabela 21).

Tabela 21 – Médias de número de folhas por explante (NF/E), número de entrenós por explante (NET/E), calogênese (CALO%) e oxidação fenólica (OF%) em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, acrescido das diferentes concentrações de Ácido α -Naftaleno Acético (0 ou 0,05 μ M) independente das concentrações de Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

ANA (μ M)	NF/E	NET/E	CALO%	OF%
0,00	6,97 a*	2,41 a	45,80 b	47,45 a
0,05	5,82 b	1,89 b	22,45 a	65,85 b
Médias	6,40	2,15	34,12	56,65
IV**	9,45	12,31	27,99	19,09

* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Observou-se que os melhores resultados obtidos para as variáveis mencionadas anteriormente foi na ausência de ANA, exceto para a calogênese, a qual apresentou porcentagem média mais alta na ausência de fitorreguladores. De

maneira geral, este comportamento pode ser percebido em todos os ensaios de multiplicação realizados neste estudo, em que, para muitas variáveis, a presença de fitorreguladores no meio nutritivo não promoveu grandes incrementos no desenvolvimento *in vitro*, se comparado aos tratamentos em que estavam ausentes, evidenciando que seu uso pode ser dispensável para a fase de multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*, nas condições testadas.

De maneira semelhante, na multiplicação *in vitro* de brotações de *Prunus persica* L. (pessegueiro), foram testadas as citocininas BAP e 2-iP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 ou 4,0 μ M) adicionadas ao meio nutritivo MS. Foi observado que 2-iP não induziu de maneira satisfatória a multiplicação *in vitro* dessa espécie, enquanto que as respostas obtidas com BAP, na presença de sua concentração mais alta, foram mais promissoras para essa fase de cultivo em pessegueiro (RADMANN et al., 2009). Os autores sugeriram que nem sempre a adição de citocinina exógena ao meio nutritivo promove de maneira satisfatória a multiplicação *in vitro*, sendo possível que o seu acréscimo propicie o surgimento de alterações fisiológicas nos tecidos vegetais, tais como a vitrificação e a oxidação fenólica. Por outro lado, na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais *Rubus idaeus* L. (framboeseira) em meio nutritivo MS, foram observados maiores valores para o número médio de gemas (5,29) e número médio de folhas (4,14) na presença da citocinina 2-iP (LEITZKE et al., 2010). Igualmente, foi verificado durante a multiplicação *in vitro* de *Carica papaya* L. (mamoeiro), em que a citocinina 2-iP induziu a formação de brotações melhor desenvolvidas e com folhas normais quando comparada as demais citocininas testadas (BAP ou CIN), sendo que na concentração de 24 μ M dessa citocinina foi observado o maior número médio de gemas (2,12) (VIDAL et al., 2013).

4.3.12 Subcultivo: Efeito de diferentes concentrações de 2-iP combinadas à presença ou ausência de ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo MS

Houve efeito significativo da interação entre os fatores principais para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais de *H. chrysotrichus*, com valor de “p” igual a 0,0006 para as duas variáveis (Tabela 22). Porcentagens

médias mais promissoras em relação à sobrevivência e estabelecimento *in vitro* foram observadas na presença de 2µM da citocinina 2-iP e na ausência da auxina, sendo que este resultado não diferiu significativamente do tratamento em que 2-iP e ANA estavam ausentes.

Tabela 22 – Médias de porcentagem de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Sobrevivência e estabelecimento <i>in vitro</i> (%)			
2iP (µM)	ANA (µM)		Média (%)
	0	0,05	
0,0	44,47 a*A	42,20 a A	43,34
1,0	22,13 b B	57,80 a A	39,97
1,5	28,93 b A	37,87 a A	33,40
2,0	57,87 a A	22,13 a B	40,00
Média (%)	38,35	40,00	39,18
IV**	22,11		

*médias 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. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Contudo, ao se estabelecer uma comparação com o cultivo inicial, pode-se observar que as médias gerais referentes a estas variáveis, no presente ensaio, sofreram considerável redução, independentemente do tratamento. Possivelmente, isso se deve ao cultivo do material vegetal em meio nutritivo MS, o qual pode não ter suprido de maneira eficiente às necessidades nutricionais dos explantes de *H. chrysotrichus*, e assim, provocando a queda nas taxas de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* durante este subcultivo.

Para número de brotos por explante a interação entre os fatores principais foi significativa ($p=0,0001$); os resultados podem ser vistos na Tabela 23. O maior número de brotos foi obtido na presença de 2µM da citocinina e na ausência de ANA (1,20), sendo que, quando a auxina esteve presente o inverso foi observado, ou

seja, a concentração mais baixa da citocinina proporcionou a maior média para número de brotos (1,08).

Tabela 23 – Médias de números de brotos por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas a Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

2iP (µM)	Número de brotos por explante		Média
	ANA (µM)		
	0	0,05	
0,0	0,78 b*A	0,53 b A	0,66
1,0	0,42 b B	1,08 a A	0,75
1,5	0,51 b A	0,67 b A	0,59
2,0	1,20 a A	0,42 b B	0,81
Média	0,73	0,68	0,70
IV**	22,99		

*médias 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. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

No entanto, os resultados observados seguem a mesma tendência das respostas obtidas para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, havendo redução nas médias quando comparadas àquelas observadas durante o cultivo inicial. Assim, como já discutido anteriormente, os fitorreguladores e as concentrações testadas, não induziram de modo eficiente a multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*, indicando que seu uso é dispensável durante essa fase do cultivo *in vitro* dos segmentos nodais dessa espécie, nas condições em que foram testados.

Por outro lado, para a micropropagação *in vitro* de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (canjerana), em que segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com 2,5µM de 2-iP, foi observado que 7% dos explantes formaram brotos durante o segundo subcultivo, enquanto que, no terceiro, essa porcentagem aumentou para 16% (ROCHA et al., 2007). Já na micropropagação de segmentos caulinares de *Vaccinium ashei* Reade (mirtilo), foram testados dois tipos de citocininas ZEA e 2-iP em quatro concentrações (0; 12; 24 ou 36 µM) acrescidas ao meio nutritivo WPM.

Com o uso da ZEA foi obtido maior número de brotações formadas em todas as concentrações testadas, sendo o número máximo de 15,71 brotos por explante, verificado na concentração de 36 μ M. Com 2-iP, os valores médios foram bem menores, não sendo superior a 2,29 brotos por explante. Entretanto, neste mesmo estudo, foi possível observar maior número de médio de gemas na presença de 2-iP (5,93) quando comparado ao uso de ZEA (4,99), aos 60 dias de cultivo *in vitro* (SCHUCH et al., 2008).

Quanto ao número de gemas por explante, também, foi observado efeito significativo da interação entre as concentrações da citocinina com a auxina ($p=0,0007$). Na Tabela 24, podem-se visualizar os resultados observados para essa variável.

Tabela 24 – Médias de número de gemas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

2iP (μ M)	Número de gemas por explante		Média
	ANA (μ M)		
	0	0,05	
0,0	1,95 b* A	1,91 b A	1,93
1,0	1,38 b B	3,60 a A	2,49
1,5	1,60 b A	2,13 b A	1,87
2,0	3,53 a A	1,20 b B	2,37
Média	2,12	2,21	2,17
IV**	25,82		

*médias 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. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Em relação ao número de gemas por explante, assim como verificado para o número de brotos, houve um maior desenvolvimento de gemas quando 2-iP esteve presente na concentração de 2 μ M e na ausência da auxina, sendo obtida uma média de 3,53 gemas por explante, resultado semelhante ao observado na presença de 1 μ M de 2-iP combinado a 0,05 μ M de ANA, em que a média resultante foi de 3,60

gemas por explante. Para essa variável, foi observada uma pequena redução quando comparada à resposta verificada durante o cultivo inicial (5,84 gemas por explante), resultado que pode estar associado a realização de subcultivo em meio nutritivo MS, o qual pode não ser o mais apropriado para a multiplicação *in vitro* de explantes de *H. chrysotrichus*.

Para o número de folhas por explante ($p=0,0016$) e número de ápices por explante ($p=0,0017$), também foi verificado efeito significativo da interação entre os fatores principais. O mesmo comportamento das variáveis mencionadas anteriormente foi observado para número de folhas por explante (Tabela 25) e número de ápices por explante (Tabela 26). Para as duas variáveis, o maior número de folhas (4,42) e de ápices (1,02) foi obtido na presença de 2-iP a $1\mu\text{M}$ combinado a $0,05\mu\text{M}$ de ANA, contudo, este resultado foi semelhante àquele observado na presença de $2\mu\text{M}$ da citocinina e na ausência da auxina (4,31 folhas por explante e 0,97 ápice por explante).

Tabela 25 – Médias de número de folhas por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou $2\mu\text{M}$) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou $0,05\mu\text{M}$). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

2iP (μM)	Número de folhas por explante		Média
	ANA (μM)		
	0	0,05	
0,0	2,04 b* A	2,09 b A	2,07
1,0	1,78 b B	4,42 a A	3,10
1,5	2,02 b A	2,89 b A	2,46
2,0	4,31 a A	1,51 b B	2,91
Média	2,54	2,73	2,64
IV**	27,07		

*médias 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. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Tabela 26 – Médias de números de ápices por explante em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2 μ M) combinadas a Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

2iP (μ M)	Número de ápices por explante		Média
	ANA (μ M)		
	0	0,05	
0,0	0,40 b* A	0,40 b A	0,40
1,0	0,47 b B	1,02 a A	0,75
1,5	0,51 b A	0,67 b A	0,59
2,0	0,97 a A	0,36 b B	0,67
Média	0,59	0,61	0,60
IV**	25,36		

*médias 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. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

De maneira semelhante às respostas observadas em *H. chrysotrichus*, na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Acca sellowiana* (Berg) Burret (goabeira serrana), as citocininas (BAP, CIN ou 2-iP) nas concentrações (0,05; 0,5; 5,0 e 50,0 μ M), adicionadas ao meio nutritivo WPM, não proporcionaram aumento no número de brotos e nem no número de nós em relação ao tratamento testemunha, após 30 dias de cultivo *in vitro* (OLTRAMARI et al., 2000). Diferentemente dos resultados obtidos durante a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Rubus* sp. (amoreira-preta cv 'Xavante'), em que o número médio de folhas, observado no cultivo *in vitro* dos explantes em meio nutritivo WPM, foi de aproximadamente 4 folhas na presença de 15 μ M de 2-iP, enquanto que em meio nutritivo MS, foi possível obter aproximadamente 6 folhas na ausência dessa citocinina (LEITZKE et al., 2010).

Em relação à calogênese ($p=0,0015$) foi observado efeito significativo apenas das concentrações da citocinina 2-iP (Tabela 27). De modo geral, houve reduzida formação de calos juntos aos segmentos nodais, comportamento diferente do observado durante o cultivo inicial, em que se observou uma porcentagem média de 34,12%.

Tabela 27 – Médias de porcentagem de calogênese *in vitro* em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, acrescido das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2µM) independente das concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

2iP (µM)	Calogênese (%)
0,0	0,00 a*
1,0	6,60 b
1,5	0,00 a
2,0	1,10 a
Média (%)	1,92
IV**	102,37

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Não houve efeito significativo dos fatores principais e nem da interação entre estes, apenas para número de entrenós por explante (IV=35,97%) e oxidação fenólica (IV=11,71%). Para o número de entrenós por explante a média geral observada foi baixa (0,65). Já em relação à porcentagem média geral de oxidação fenólica, foi bastante elevada, atingindo 81,12% dos segmentos nodais inoculados. Essa alta oxidação fenólica observada na base dos explantes, pode estar relacionada ao cultivo em meio nutritivo MS, sendo que no cultivo anterior, o meio nutritivo utilizado foi o WPM e a porcentagem média foi de 56,65%. A elevada porcentagem média de oxidação fenólica nos explantes pode estar influenciando a redução dos valores médios de todas as variáveis já mencionadas, como já foi discutido para todos os experimentos executados visando à multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*, em que este fenômeno, de maneira geral, esteve presente em altas porcentagens. Alguns autores indicam que o sucesso da micropropagação pode estar relacionado com o máximo desenvolvimento de brotos a partir de gemas axilares perante a menor ocorrência de oxidações e calogênese (MANTELL et al., 1994).

4.3.13 Taxas de multiplicação *in vitro* para o cultivo inicial e subcultivo

Quanto às taxas de multiplicação estimadas para o cultivo inicial e o subcultivo, realizados com o mesmo material vegetal e na presença de fitorreguladores (2-iP e/ou ANA), houve diferença significativa entre as taxas médias obtidas nos cultivos (Tabela 28). Observou-se que, durante o cultivo inicial, para TX₁, a qual considera o número de gemas envolvidos durante o período de cultivo, foi obtido um valor bastante elevado. Ao contrário do verificado para o subcultivo, cuja a taxa obtida foi consideravelmente inferior àquela do cultivo inicial. Este comportamento, até o momento, não tinha sido observado, já que as taxas apresentadas nos ensaios anteriores, realizados com BAP ou CIN, apresentaram uma taxa média ligeiramente superior durante o primeiro subcultivo.

No presente ensaio, a diferença entre os resultados obtidos pode estar relacionada aos meios nutritivos que foram utilizados durante o cultivo inicial (WPM) e o subcultivo (MS), relação que corrobora as respostas observadas para as demais variáveis já mencionadas, tendo em vista o desempenho *in vitro* inferior do material vegetal que foi subcultivado em meio nutritivo MS. Outro fator que, provavelmente, exerceu influência sobre as taxas, é a elevada ocorrência de oxidação fenólica junto aos explantes que foram subcultivados (81,12%), a qual pode ter influenciado a redução das taxas entre os cultivos.

Tabela 28 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados e subcultivados *in vitro* em meios nutritivos ('Woody Plant Medium' – WPM ou MS), acrescidos das diferentes concentrações de 2-Isopenteniladenina - 2-iP (0; 1; 1,5 ou 2µM) combinadas as concentrações de Ácido α-Naftaleno Acético - ANA (0 ou 0,05µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Cultivos	TX ₁ **	TX ₂ ***	TX ₃ ****
Cultivo inicial	923 a*	2,92 a	3,78 a
Subcultivo	59 b	1,08 b	1,24 b
Média	491	2,00	2,51

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste Fe 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **calculada por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical; ***divide-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do cultivo; ****quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes.

Em relação às outras duas taxas calculadas (TX₂ e TX₃), foi verificado um comportamento semelhante ao dos cultivos realizados anteriormente com as citocininas BAP e CIN. Entretanto, também observou-se redução entre as taxas obtidas no subcultivo quando comparadas àquelas do cultivo inicial. Como supramencionado, nem sempre é possível manter a morfogênese *in vitro* do material vegetal durante cultivos sucessivos. Muitas vezes, de uma maneira geral, fatores como a ocorrência de contaminações, oxidação fenólica, vitrificação, clorose foliar, balanços hormonais e/ou nutricionais inadequados ao cultivo de determinadas espécies, podem comprometer as respostas *in vitro*.

Para clones de *Musa* spp. (bananeira) foram realizados sete subcultivos de 30 dias cada. Durante o primeiro subcultivo houve elevados índices de contaminação bacteriana (50%) dos explantes, causando consideráveis perdas de material. Quanto às taxas de multiplicação, as maiores médias foram obtidas durante o terceiro subcultivo, apresentando uma média de até 6,1 brotos por explante (OLIVEIRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). Já para *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) a maior taxa de multiplicação foi obtida quando BAP (8µM) esteve presente no meio nutritivo WPM, em foi atingida uma média 9,61. No entanto, a capacidade de multiplicação dos explantes da espécie diminuiu com a execução de sucessivos subcultivos (SOARES et al., 2011).

4.3.14 Cultivo inicial: Efeito de diferentes fontes e concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus*

Foi verificado para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes efeito significativo da interação entre as diferentes fontes e concentrações das citocininas testadas, apresentando ambas $p=0,0003$ e $IV=11,23\%$. Para as duas variáveis-resposta foi observado o mesmo comportamento, sendo que, para as concentrações das citocininas BAP e 2-iP, foram ajustadas equações de terceiro grau, enquanto que, para TDZ, houve um ajuste quadrático, sendo a máxima eficiência técnica (MET) estimada a 4,69µM de concentração, enquanto para CIN foi observado comportamento linear decrescente (Figura 4).

Foram observados 100% de sobrevivência e de estabelecimento *in vitro* na ausência das citocininas testadas, exceto para CIN, em que, na sua ausência foi observada uma porcentagem média de aproximadamente 94% para essas variáveis. A adição de 2-iP ao meio nutritivo, a 2,5 μ M e a 10 μ M, resultou em considerável redução nas médias destas variáveis, as quais ficaram em torno de 50 e 44% respectivamente. Já para BAP foram verificadas médias mais baixas na presença de suas concentrações mais altas, o que pode ter desencadeado um efeito inibidor com o aumento nas concentrações e, assim, influenciando negativamente na sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes. De maneira semelhante, para CIN verificou-se que, com o aumento nas concentrações, as médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes sofreram leve redução. Enquanto que, para TDZ as melhores médias foram obtidas na sua ausência ou na presença de sua concentração mais alta, embora as concentrações intermediárias, também, tenham mantido médias altas para essas variáveis. De maneira geral, os resultados observados indicaram que independentemente da fonte utilizada estas citocininas são dispensáveis para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *H. chrysotrichus*, tendo em vista que elevadas porcentagens, também, foram observadas na ausência dessa classe fitorreguladores.

De maneira semelhante, foi observado em estudo realizado com *Luehea divaricata* (açoita-cavalo), que o acréscimo de citocininas ao meio nutritivo não se faz necessária para assegurar a sobrevivência *in vitro* dos epicótilos cultivados em meio nutritivo MS, e ainda, foi observado que mais de 95% dos explantes se estabeleceram na ausência das citocininas (LEÓN, 2014). Em outro estudo realizado com *H. chrysotrichus*, as concentrações mais reduzidas de BAP proporcionaram as melhores médias de estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares (PAIM, 2011). Já para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Vaccinium ashei* (mirtilo) a adição de 24 μ M de 2-iP ao meio nutritivo foi o tratamento que proporcionou o melhor resultado para a espécie (ERIG; SCHUCH, 2005).

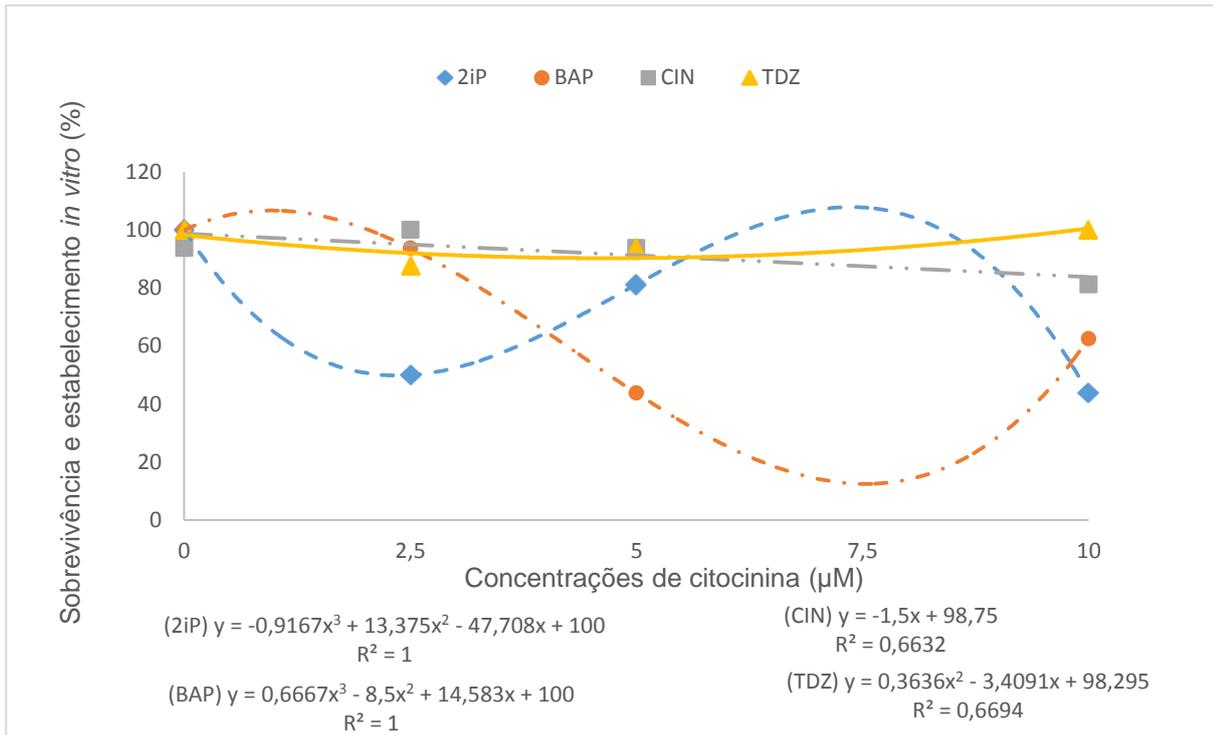


Figura 4 – Porcentagem média de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaninopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10µM) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Quanto ao número de brotos por explante, também houve efeito significativo da interação entre os fatores principais ($p=0,0004$; $IV=15,36\%$). Da mesma maneira que para sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, ajustaram-se equações de terceiro grau para BAP e 2-iP, para CIN observou-se um comportamento quadrático ($MET=7,20\mu M$, cuja média seria $\sim 1,5$ brotos por explante) enquanto para TDZ foi observado um ajuste linear crescente (Figura 5).

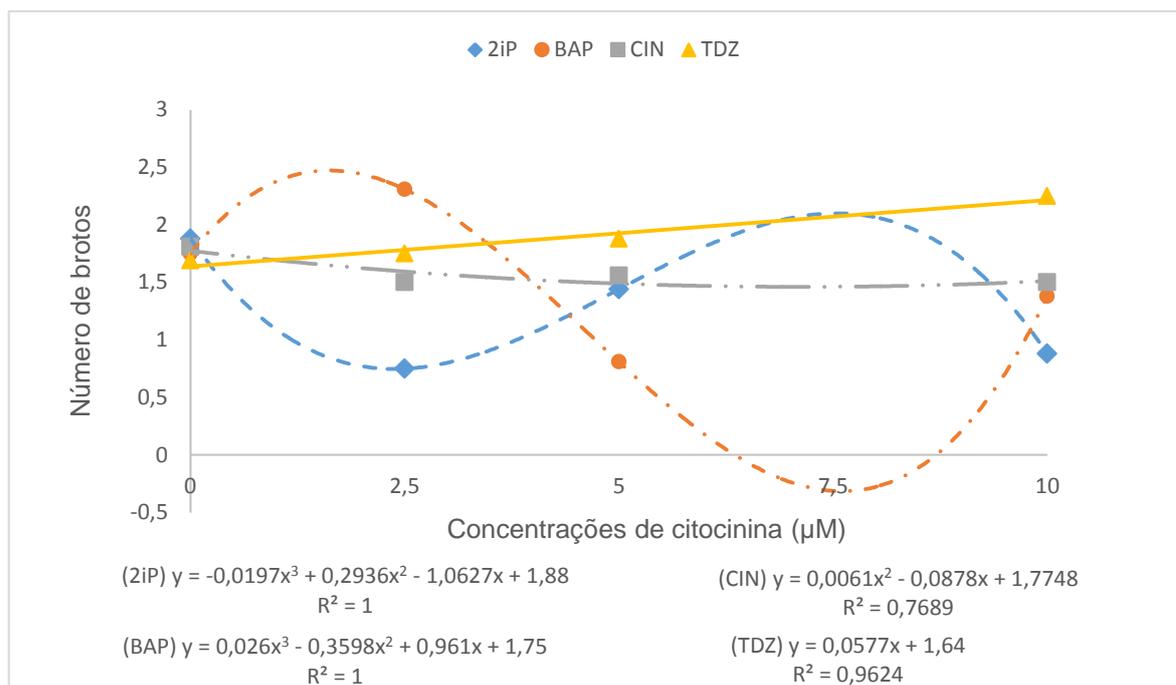


Figura 5 – Número médio de brotos por explante formados a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thiadizuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10µM) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Os melhores resultados para o número de brotos foram obtidos com as concentrações de BAP e TDZ, sendo obtidos 2,31 brotos por explante na adição de BAP a 2,5µM, resposta semelhante àquela obtida com TDZ, em que se verificou que quanto mais alta a concentração desta citocinina, maior foi a formação de brotos, atingindo-se 2,25 brotos por explante na presença de 10µM. Assim, BAP é mais eficiente, pois resulta em maior média com o emprego de uma concentração quatro vezes menor que àquela de TDZ, sem contar o custo desta última que é mais de 28 vezes maior (frasco de 25 mg de BAP tem um custo de R\$ 12,50 ao passo que mesma massa de TDZ custa R\$ 355,00). Para as demais citocininas, de modo geral, as médias observadas foram semelhantes, sendo que, tanto para 2-iP quanto para CIN, as médias mais altas foram observadas na ausência dessas citocininas (1,88 e 1,81 brotos por explante respectivamente).

Durante o cultivo *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (catingueira), foram avaliadas as citocininas BAP (0; 2; 4; 8; ou 16µM), CIN (0; 2; 4; 8; ou 16µM) ou TDZ (0; 1; 2; 4; ou 6µM) adicionadas ao meio nutritivo WPM. Os resultados indicaram que

o acréscimo das concentrações mais altas das citocininas provocaram redução nas médias de brotos por explante, sendo que a maior média observada foi de 0,97 broto por explante, alcançada na ausência de citocininas após 45 dias de cultivo e, os piores resultados foram constatados na presença de TDZ (SILVA et al., 2014), ao contrário do observado com *H. chrysotrichus*, no presente estudo. Para outra espécie lenhosa, *Tapirira guianensis* Aubl. (copiúva), houve a indução de brotações mesmo na ausência de fitorreguladores, no entanto, as melhores respostas quanto à multiplicação *in vitro* dos segmentos nodais foram com a adição de 4,44 μ M de BAP ao meio nutritivo WPM, em que foram obtidos 2,83 brotos por explante (GUTIÉRREZ et al., 2013).

Em relação ao número de gemas por explante (IV=12,39%) foi, igualmente, observado um efeito significativo da interação entre os fatores principais, sendo o valor de “p” igual a 0,0000 (Figura 6). Com as concentrações das citocininas BAP e 2-iP ajustaram-se equações polinomiais de terceiro grau, evidenciando as oscilações que foram provocadas pelas concentrações destas citocininas na formação de gemas. Já com as concentrações de TDZ foi observado um comportamento quadrático, sendo a MET fornecida pela concentração 5,78 μ M (~7 gemas por explante), enquanto que para CIN verificou-se que o melhor ajuste foi dado por uma equação linear decrescente (Figura 6).

As maiores médias para número de gemas foram identificadas na presença de CIN e TDZ. Obtiveram-se 7,25 gemas na concentração 2,5 μ M de cinetina, ao passo que com o emprego de TDZ, esta mesma média foi observada, apenas com o dobro da concentração, a 5 μ M. Entretanto, deve-se observar que as médias registradas na ausência dessas citocininas foram 7 e 5,63 respectivamente e que os incrementos resultantes da suplementação de CIN e, principalmente, de TDZ, cujo custo é mais elevado, devem levar em consideração estimativas de benefícios e custos. Um frasco de 25 mg de CIN tem custo médio de R\$ 30,00 enquanto o de TDZ é de R\$ 355,00. A adição de 2-iP não induziu de maneira satisfatória a proliferação de gemas, sendo verificada, na sua ausência, a maior média (6,75 gemas por explante). De maneira semelhante, com BAP, as melhores médias foram na ausência da citocinina (5,44 gemas por explante) ou na presença de sua concentração mais baixa (5,88 gemas por explante). Portanto, pode-se inferir que, para essa variável, apenas CIN e TDZ podem resultar em aumento na eficiência da multiplicação, porém dependendo de análises da relação custo x benefício. As

demais citocininas avaliadas, BAP e 2-ip são dispensáveis na multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*.

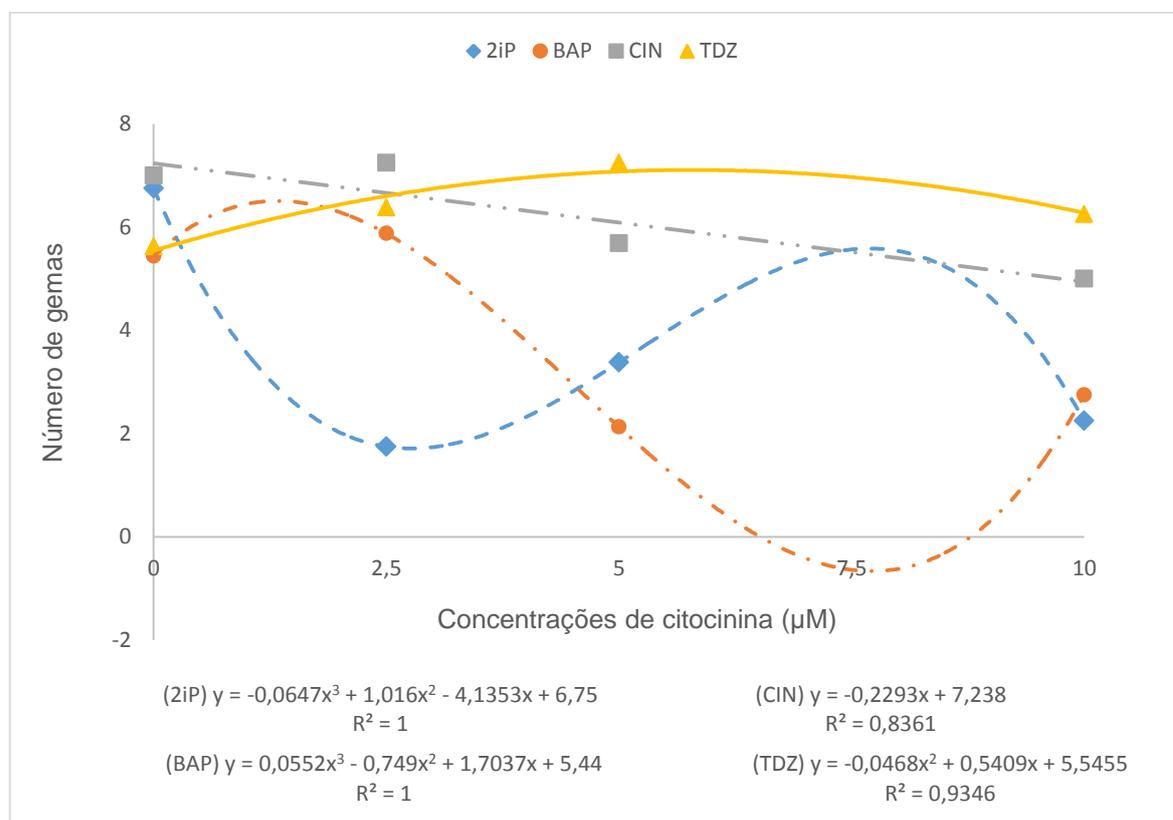


Figura 6 – Número médio de gemas por explante formadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10µM) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Na multiplicação *in vitro* de *Rubus idaeus* (framboeseira) foi analisado o desempenho das citocininas ZEA, 2-iP ou BAP em diferentes concentrações (0,0; 7,5; 15,0 ou 22,5µM). Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foi verificado que houve aumento no número médio de gemas, de folhas e de brotos com o aumento nas concentrações das citocininas testadas, independentemente da fonte, sendo que as maiores médias para as três variáveis referidas foram alcançadas com o acréscimo de 15µM ao meio nutritivo WPM (~ 6 gemas por explante; ~ 5 folhas por explante; ~ 1 broto por explante) (LEITZKE et al., 2010). Já na multiplicação *in vitro* de

segmentos nodais de *H. impetiginosus* (ipê-roxo) em meio nutritivo WPM, a concentração mais alta de CIN (8 μ M) foi a que apresentou os melhores resultados para o número médio de brotos (4,0) e o número médio de gemas (10,83) (MÁXIMO et al., 2010).

A interação entre os fatores principais, também teve efeito significativo na formação de folhas ($p=0,0000$; $IV=13,45\%$), sendo que, com BAP e 2iP, a equação que resultou no melhor ajuste foi a cúbica, enquanto que para as concentrações de CIN e TDZ observou-se um comportamento linear. No entanto, para CIN foi percebido que o número de folhas diminuiu com o aumento na concentração desta citocinina, enquanto que, para TDZ ocorreu o inverso, havendo uma maior formação de folhas conforme aumentaram as concentrações (Figura 7).

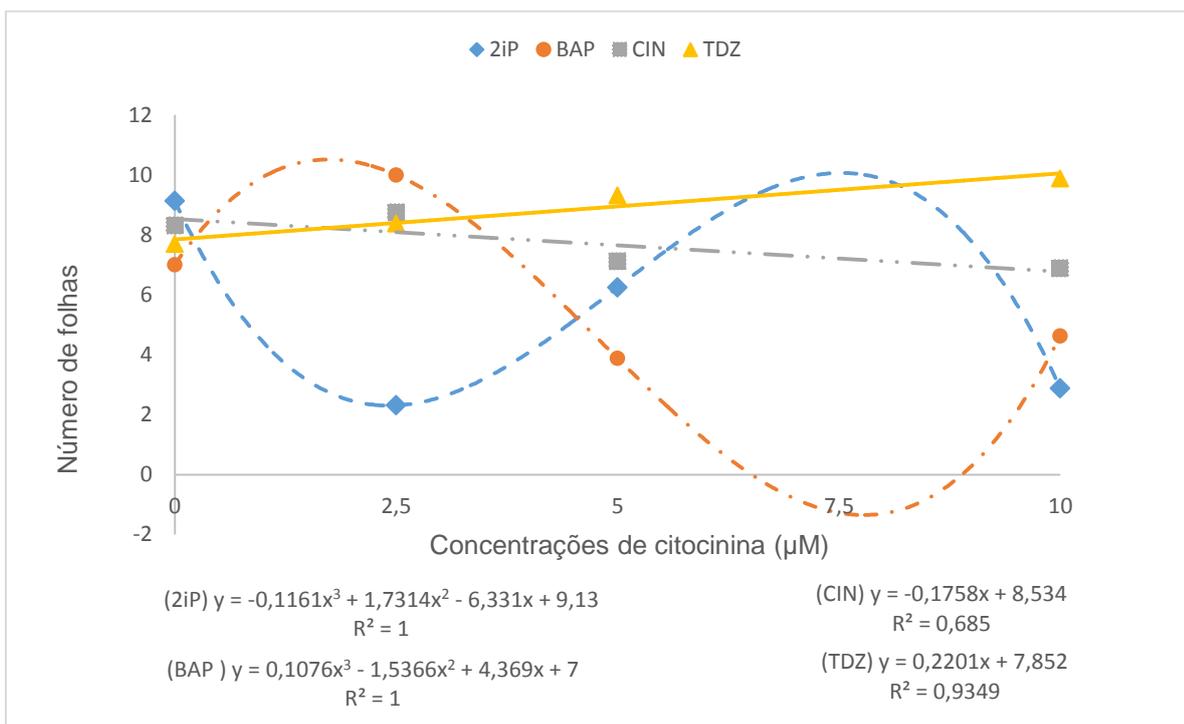


Figura 7 – Número médio de folhas por explante formadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Observou-se, que as citocininas, de maneira diferenciada, de acordo com as concentrações avaliadas, promoveram respostas no sentido de formação *in vitro* de folhas em *H. chrysotrichus*, exceto 2-iP, já que o maior número de folhas (9,13) foi observado na sua ausência. A maior média de folhas formadas ocorreu na presença de 2,5µM de BAP, em que foi observada a média de 10,0 folhas por explante, todavia, com o aumento na concentração desta citocinina houve redução de mais de 50% nas médias observadas. Quanto aos valores médios registrados na presença de TDZ, houve a formação de 9,88 folhas com o emprego da concentração mais alta enquanto com cinetina a maior média obtida foi obtida na presença de 2,5µM (8,75 folhas por explante). Portanto, da mesma maneira que foi observado anteriormente com outras variáveis, BAP é mais eficiente que TDZ e CIN.

Por outro lado, para *Rubus* sp. (amoreira-preta) quando a citocinina BAP estava presente, o aumento nas concentrações até 15µM promoveu, também, aumento no número médio de folhas, atingindo aproximadamente 14 folhas por explante (LEITZKE et al., 2010). Entretanto, a adição de citocininas ao meio nutritivo, como, por exemplo, de BAP, induz à morfogênese *in vitro*, especialmente, em relação ao formação de novos brotos, porém o seu efeito pode reduzir as taxas de crescimento/alongamento das brotações (PEIXOTO; PASCAL, 1996) e, conseqüentemente, influenciar na formação *in vitro* de folhas.

De maneira semelhante ao observado para as variáveis já mencionadas, para o número de entrenós, também houve efeito significativo das diferentes fontes e concentrações de citocininas testadas ($p=0,0000$; $IV=12,10\%$). Ajustaram-se, para BAP e 2-iP, equações polinomiais de terceiro grau enquanto para CIN e TDZ, o ajuste foi quadrático, cujos valores de MET seriam a 2,16µM e 6,67µM respectivamente (Figura 8).

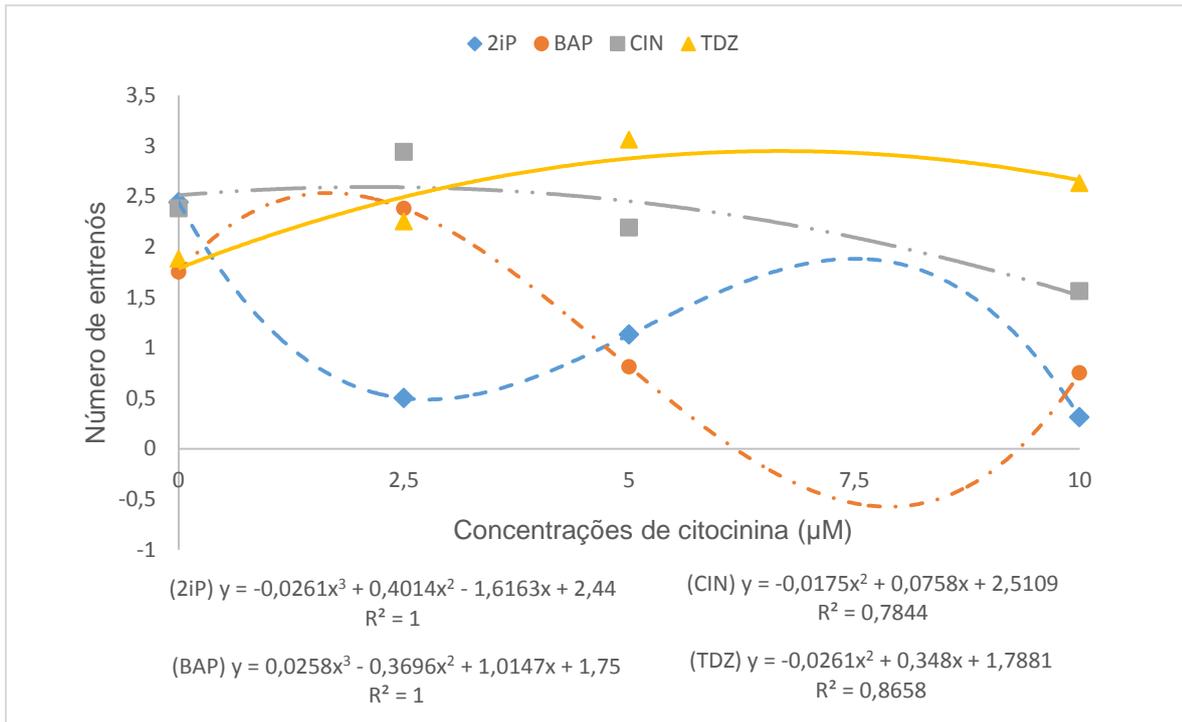


Figura 8 – Número médio de entrenós por explante formados a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Foram obtidos 3,06 entrenós por explante quando TDZ (5 μ M) foi adicionado ao meio nutritivo, média seguida por aquelas verificadas com o emprego de CIN e BAP a 2,5 μ M, em que se obteve a indução de 2,94 e 2,38 entrenós por explante respectivamente. Já em relação a 2-iP, assim como verificado para a maioria das variáveis já mencionadas, não foi observada eficiência na formação de entrenós, sendo que a maior média foi obtida na sua ausência (2,41 entrenós por explante). Os baixos índices de multiplicação apresentados por alguns explantes na presença de citocininas naturais, como ZEA e 2-iP, pode ser atribuído ao fato de que estas são mais suscetíveis à degradação pela ação de uma enzima denominada citocinina oxidase. Adicionalmente, um alto suprimento de citocininas exógenas pode aumentar a atividade desta enzima e, assim, inibir a indução de brotos (BARRUETO CID, 2005; GEORGE, 1993).

Para o número de ápices por explante houve efeito significativo da interação entre os fatores principais testados ($p=0,0000$; IV=12,67%). Igualmente ao

observado para as demais variáveis, BAP e 2-iP apresentaram um comportamento cúbico, CIN e TDZ, por sua vez, ajustaram-se a equações lineares (Figura 9). Novamente, observou-se comportamento oposto entre estas citocininas, haja vista que com, o aumento nas concentrações de TDZ, verificou-se um incremento no número de ápices. Enquanto que, para CIN quanto maior a concentração menor foi o número médio ápices formados.

TDZ e BAP induziram a formação de aproximadamente 2 ápices por explante na presença de 10 μ M de TDZ e, também, com apenas 2,5 μ M de BAP. Por outro lado, esta mesma média foi observada na ausência de 2-iP e CIN. Indicando, portanto, que as citocininas, independentemente da concentração, não foram eficientes na proliferação *in vitro* de ápices em *H. chrysotrichus*. Muitas vezes, os teores endógenos de hormônios, tais como as citocininas, já estão presentes nos tecidos vegetais, não se fazendo necessária a adição de uma citocinina exógena, sendo que ao adicioná-la pode-se obter um efeito decrescente na taxa de multiplicação (RADMANN et al., 2009).

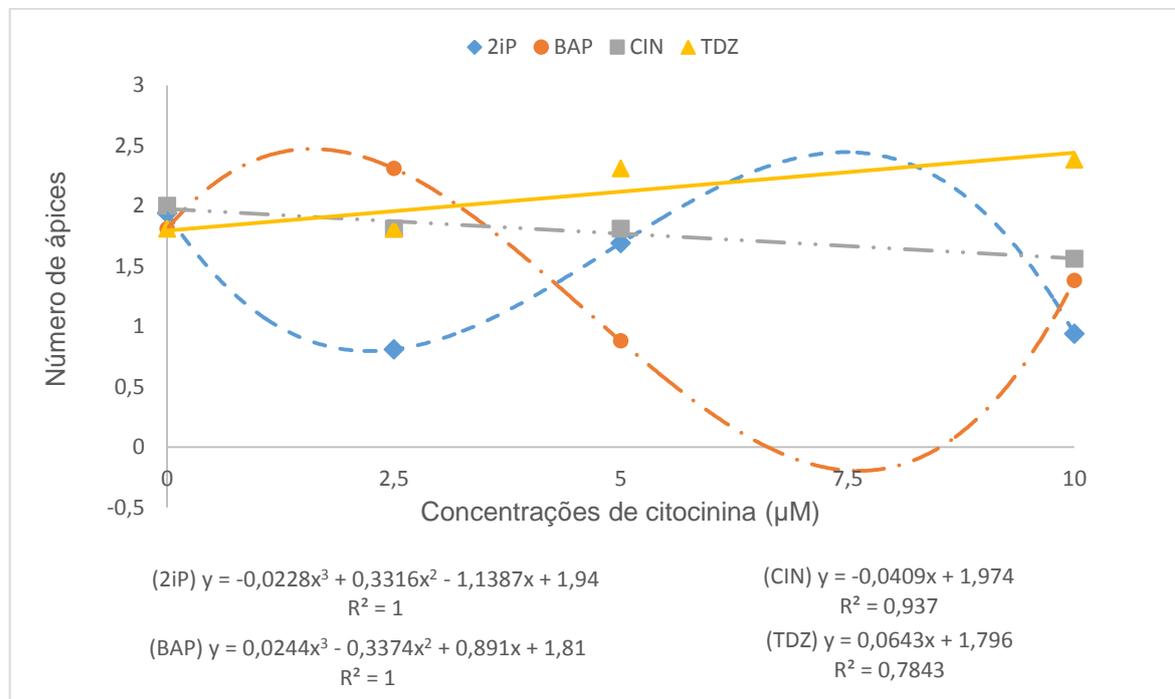


Figura 9 – Número médio de ápices por explante formados a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, acrescido das diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Para as variáveis calogênese (IV=53,78%); oxidação fenólica (IV=10,36%) e clorose foliar (119,34%), não foi verificado efeito significativo dos fatores principais e nem, tampouco, da interação. Para a calogênese foi observada uma média geral de 19,14%, a qual foi reduzida se comparada às médias observadas na maioria dos ensaios realizados visando à multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus*. Esta resposta pode estar associada ao balanço hormonal proporcionado pela adição de concentrações mais altas de citocininas no presente ensaio, sendo que este, possivelmente, favoreceu o desenvolvimento *in vitro* de brotos em detrimento ao de calos. Já a porcentagem média de oxidação fenólica foi alta (86,72%), podendo estar relacionada à presença de citocininas exógenas no meio nutritivo, as quais podem promover aumento nas médias como resposta a um balanço hormonal inadequado, por exemplo. Entretanto, a elevada oxidação observada não impediu a regeneração *in vitro* do material vegetal. A clorose foliar, da mesma maneira que a calogênese, foi reduzida, sendo verificada em apenas 5,46% das brotações.

4.3.15 Subcultivo: Multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* em meio nutritivo WPM

O presente subcultivo foi realizado para multiplicar o material vegetal desenvolvido *in vitro* durante o cultivo inicial dos segmentos nodais de *H. chrysotrichus*. Assim, como já mencionado anteriormente, os explantes foram apenas subcultivados em meio nutritivo livre de fitorreguladores, estando todo o material vegetal na mesma condição, ou seja, não havendo tratamentos. No Quadro 5, estão expostas as médias observadas para as variáveis analisadas, as quais foram avaliadas visando acompanhar o comportamento *in vitro* desse material vegetal.

<i>Variáveis</i>	<i>Médias gerais</i>
Sobrevivência <i>in vitro</i> (%)	91,67
Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)	91,30
Nº brotos por explante	0,99
Nº gemas por explante	5,69
Nº folhas por explante	7,40
Nº ápices por explante	1,00
Nº entrenós por explante	2,41
Calogênese <i>in vitro</i> (%)	1,44
Rizogênese <i>in vitro</i> (%)	7,25
Oxidação fenólica (%)	34,42
Clorose foliar (%)	49,18

Quadro 5 – Médias gerais observadas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 30 dias de subcultivo em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' – WPM, na ausência de fitorreguladores, subsequente ao cultivo inicial, totalizando 30 dias de cultivo na presença de diferentes fontes (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10 μ M) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Embora as médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* das brotações, tenham sofrido pequena redução, quando comparadas às médias do cultivo inicial, ainda se mantiveram elevadas. Número de brotos, número de gemas, número de folhas, número de ápices, também apresentaram leve redução, mas, mesmo assim, foi possível manter a capacidade de regeneração *in vitro*. Já para o número de entrenós por explante a média verificada no cultivo inicial manteve-se inalterada neste subcultivo.

Já na oxidação fenólica foi observada uma considerável redução no presente subcultivo, comportamento oposto ao observado para clorose foliar, a qual se apresentou mais elevada. O aumento na clorose foliar pode estar relacionado aos teores residuais, nos tecidos vegetais, dos fitorreguladores testados durante o cultivo inicial, os quais podem ter influenciado a ocorrência de maior porcentagem deste fenômeno, neste momento, podendo, ainda, estar em concentrações suficientes nos tecidos a ponto de induzirem alguma resposta. Entretanto, deve-se esclarecer que a incidência de oxidação fenólica e de clorose foliar não impediu a regeneração *in vitro* dos explantes subcultivados.

4.3.16 Taxas de multiplicação *in vitro* para o cultivo inicial e subcultivo

Foi observada diferença significativa entre as três taxas médias de multiplicação calculadas para o cultivo inicial e subcultivo. Os resultados observados podem ser visualizados na Tabela 29.

Tabela 29 – Taxas de multiplicação *in vitro* (TX₁, TX₂ e TX₃) calculadas a partir de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados, durante 30 dias, e subcultivados *in vitro*, por 30 dias adicionais, em meios nutritivos (WPM ou MS), na presença ou não de citocininas (6-Benzilaminopurina - BAP, Cinetina - CIN, 2-Isopenteniladenina - 2-iP ou Thidiazuron - TDZ) e concentrações (0; 2,5; 5,0 ou 10µM) de citocininas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Cultivos <i>in vitro</i>	TX ₁ **	TX ₂ ***	TX ₃ ****
Cultivo inicial	784 b*	2,54 b	3,54 a
Subcultivo	1018 a	2,84 a	3,40 b
Média	901	2,69	3,47

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ** calculada por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a gema apical; ***divide-se o número de gemas por explante pelo número inicial de gemas do explante no momento de estabelecimento do cultivo; ****quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número total de explantes.

Em relação à primeira taxa estimada para os cultivos, a melhor média foi obtida durante o subcultivo, em que foram formadas 1018 gemas, sendo este valor o maior observado para TX₁ ao compará-lo com todos os demais verificados durante os cultivos anteriores. Resultado que reforça o potencial da espécie para a formação *in vitro* de gemas, nas condições avaliadas. Como já discutido para as taxas de multiplicação estimadas nos cultivos anteriores, os valores estimados, considerando-se a formação *in vitro* de gemas, são considerados muito elevados, fato que reforça a ideia da possibilidade de ocorrência de variações somaclonais nos tecidos vegetais micropropagados.

Em estudo realizado com *Vitis vinifera* L. (videira), foi sugerido que as altas taxas de multiplicação *in vitro* podem provocar alterações na estrutura e quantidade cromossômica, acarretando no surgimento de variantes somaclonais (PRADO et al.,

2010). Entretanto, estudos apontam que a variação somaclonal, tanto quando induzida como de ocorrência espontânea, deve ser rastreada durante várias gerações das plantas propagadas por sementes, na tentativa de verificar se é uma alteração genética permanente ou, se é de origem epigenética (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010). No entanto, estes mesmos autores mencionaram que a ocorrência de variação somaclonal é menos frequente em plantas originárias de gemas nodais ou axilares, sendo mais comum a ocorrência desse tipo de variação nas plantas que se originam por meio de calos, de suspensão celular, de protoplastos e de embriogênese somática.

Já, em relação à estimativa para TX₂, assim como para TX₁, a maior taxa foi obtida durante o subcultivo (2,84), enquanto que para TX₃, os valores observados para os dois cultivos foram semelhantes, indicando que durante o subcultivo a taxa de multiplicação se manteve inalterada. De maneira semelhante, para outra espécie florestal, *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa), foi observado que se manteve a taxa média de brotações (4-5 brotos por explante) obtida no cultivo inicial e nos dois subcultivos subsequentes (RIBAS et al., 2005).

4.4 Conclusões

Na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, o uso das citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), 2-Isopenteniladenina (2-iP), Cinetina (CIN) e Thidiazuron (TDZ) e, também, da auxina Ácido α -Naftaleno Acético (ANA), é dispensável.

A taxa média de multiplicação *in vitro*, estimada para segmentos nodais e segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus*, considerando-se o número de gemas formadas durante o período de cultivo, em todos os cultivos em que o meio nutritivo utilizado é o WPM, resulta muito elevada independentemente dos fitorreguladores testados.

É possível manter a capacidade morfogenética de *Handroanthus chrysotrichus* após a realização de sucessivos subcultivos em meio nutritivo WPM. Enquanto que, os explantes cultivados em meio nutritivo MS não se desenvolvem de maneira satisfatória nas condições utilizadas.

Obtiveram-se elevadas porcentagens médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes de *Handroanthus chrysotrichus* cultivados *in vitro*, tanto na presença como na ausência dos fitorreguladores testados, em meio nutritivo WPM.

Na presença da citocinina BAP e da auxina ANA ocorre elevada formação de calos na base das brotações de *Handroanthus chrysotrichus* cultivadas *in vitro*.

5 CAPÍTULO III
ASPECTOS RELACIONADOS À SENESCÊNCIA FOLIAR EM
BROTAÇÕES DE *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J.
Mattos CULTIVADAS *IN VITRO*

5.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar aspectos relacionados à senescência foliar em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos cultivadas *in vitro*.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Avaliação da senescência foliar em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos cultivadas *in vitro*

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, sendo que os tratamentos foram constituídos dos períodos (14; 21; 28; 40; 56; 70; 84; 102; 116; 130; 154 ou 186 dias), de cultivo *in vitro*, sem subcultivo ou transferência para meio nutritivo fresco, totalizando 12 tratamentos. As unidades experimentais foram compostas por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo, contendo dois explantes. Foram utilizados, no total, 134 explantes distribuídos em 67 frascos.

Utilizaram-se, como explantes, segmentos nodais isolados de plântulas germinadas *in vitro*. Decorridos 28 dias, os segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e

1atm de pressão durante 15min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C}\pm 3$, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas aos 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência *in vitro* (explantes com coloração verde), número de folhas por explante, número de folhas com sinais de senescência (folhas com perda da coloração verde ou com manchas escurecidas), porcentagem de formação de raízes primárias, de raízes secundárias, de calogênese, de clorose foliar (amarelecimento das folhas) e de oxidação fenólica (coloração escura na base dos explantes).

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as médias das variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi realizada a análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2006). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{N}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTE-GOMES, 2009).

5.3 Resultados e discussão

Para a sobrevivência *in vitro* das brotações de *H. chrysotrichus* cultivadas em meio nutritivo WPM, houve efeito significativo do período de avaliações (IV=6,61%), sendo possível observar um ajuste linear decrescente em relação ao tempo de cultivo (Figura 10). As médias mantiveram-se acima de 50% até, aproximadamente, 120 dias de cultivo *in vitro*, sendo que na última avaliação realizada, em torno de 190 dias, ainda foi possível observar mais de 40% das brotações vivas. Este resultado é bastante promissor, tendo em vista, que as brotações mantiveram-se no mesmo

meio nutritivo, sem subcultivo e sem transferência para meio nutritivo fresco, desde a instalação do ensaio. Os resultados observados podem ser indicativos de que as brotações sobreviventes estivessem efetuando fotossíntese de maneira ativa, a qual as supriria com energia, haja vista que ao longo desse período é provável que o meio nutritivo estivesse deplecionado em nutrientes. Entretanto, essa hipótese deverá ser adicionalmente investigada, especificamente, em relação à taxa de fotossíntese.

De maneira geral, a resposta obtida pode auxiliar no planejamento de ensaios adicionais que, eventualmente, serão executados com essa espécie, que indicarão o período máximo de cultivo *in vitro* em um mesmo meio nutritivo, para fins de conservação *in vitro* de germoplasma e, também, de seleção de genótipos superiores em relação a exigências nutricionais do meio nutritivo. Além disso, pode contribuir com informações quanto ao comportamento *in vitro* do material vegetal, haja vista terem sido observados genótipos que se destacaram, não só quanto a sobrevivência *in vitro*, mas, também, em relação às demais variáveis que foram analisadas, indicando a existência de diferenciação entre os genótipos, com alguns expressando características de adaptação e desenvolvimento muito superiores aos demais. A detecção de variabilidade fenotípica entre as brotações avaliadas era esperada, uma vez que o material vegetal utilizado foi proveniente de sementes, porém a sua longevidade superou a expectativa, a qual estava sendo esperada em torno de 80 dias de cultivo *in vitro*.

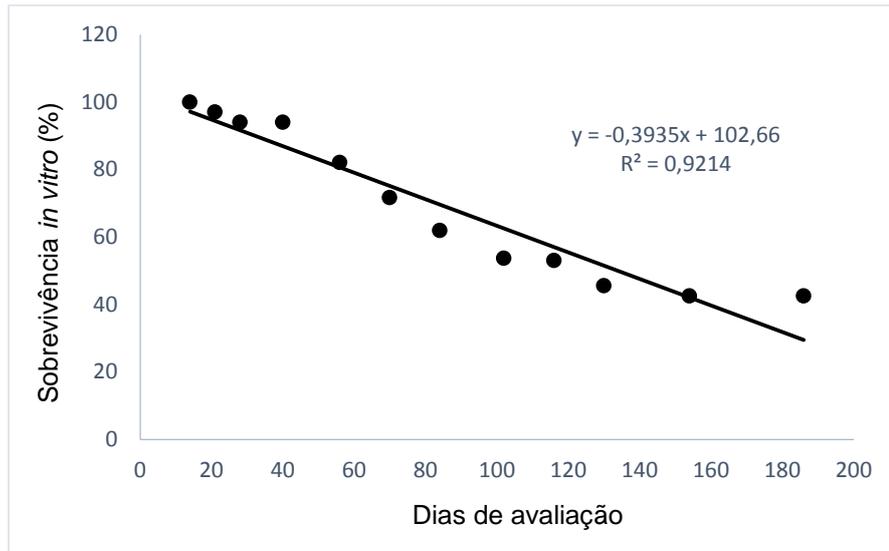


Figura 10 – Porcentagem média de sobrevivência de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Para o número de folhas por explante, também houve efeito significativo dos períodos de avaliação (IV=4,88%). Foi ajustada uma equação de segundo grau para esta variável, a qual apresentaria um valor de máxima eficiência técnica (MET) aos 160 dias de cultivo *in vitro* e uma média de 13 folhas por explante (Figura 11).

Observou-se que o número de folhas aumentou gradativamente no decorrer o tempo de cultivo *in vitro*, apresentando uma média de 13,43 folhas por explante ao final da avaliação, aos 186 dias. No entanto, a curva obtida indica o início de um provável período de estabilização para esta variável a partir dos 160 dias, aproximadamente. Assim, como mencionado para a sobrevivência *in vitro*, o resultado obtido para essa variável, também foi considerado positivo, pois sinaliza que mesmo estando a um longo período de cultivo *in vitro*, no mesmo meio nutritivo, a capacidade morfogenética dos tecidos foi mantida.

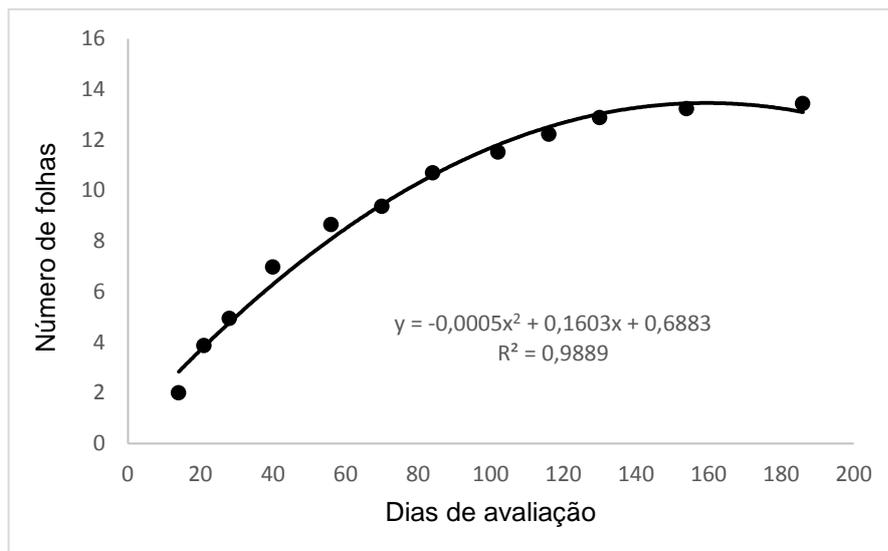


Figura 11 – Número médio de folhas por explante em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Quanto ao número de folhas com sinal de senescência foi, igualmente, observado um efeito significativo dos períodos de avaliação (IV=15,10%), ajustando-se uma equação linear crescente (Figura12). Foi observado um aumento gradativo no número de folhas com sinais de senescência durante o período avaliado, apresentando o mesmo comportamento do número de folhas por explante.

Os sinais de senescência foliar nas brotações de *H. chrysotrichus* tiveram início a partir dos 20 dias de cultivo *in vitro*, porém em níveis muito reduzidos, podendo-se considerar que, somente, a partir dos 40 dias de cultivo *in vitro* foi possível obter média superior a uma folha por explante com sinal de senescência. A maior média observada foi 6,42 folhas aos 186 dias de cultivo *in vitro*, sinalizando que, em média, metade das folhas formadas *in vitro* apresentaram sinais de senescência. Este valor pode ser considerado baixo, tendo em vista o longo período de cultivo *in vitro* a que as brotações foram submetidas. A resposta observada evidencia a aptidão que a espécie possui para a micropropagação e, possivelmente, para a conservação *in vitro* (Figura 13) de seu germoplasma. Além disso, os resultados obtidos sugerem a possibilidade da existência de genótipos superiores em relação a reduzida exigência de nutrientes ou, por outro lado, a ocorrência de fotossíntese ativa em condições de cultivo *in vitro*, contrariando a tese amplamente

aceita de que, nessas condições, as culturas são mixotróficas e que a fotossíntese ocorre em baixos níveis, apenas suficientes para manter a coloração verde dos explantes.

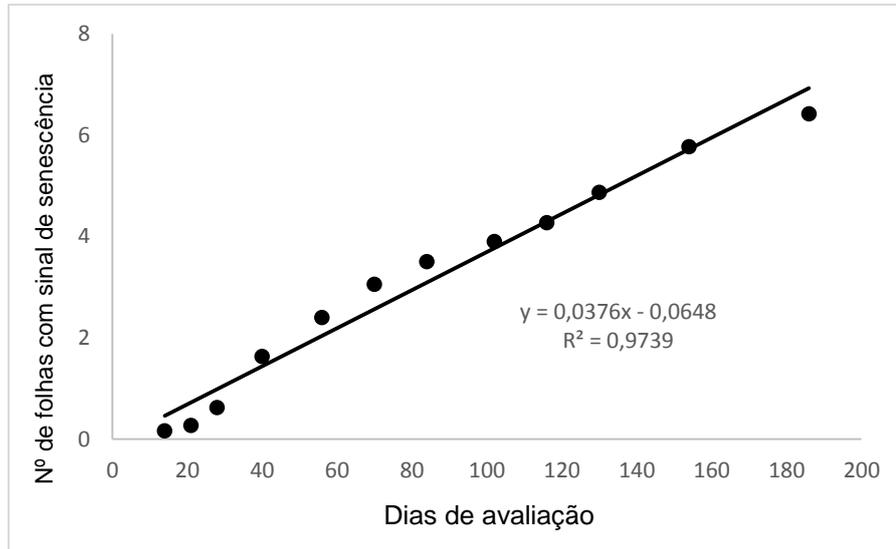


Figura 12 – Número médio de folhas com sinal de senescência em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

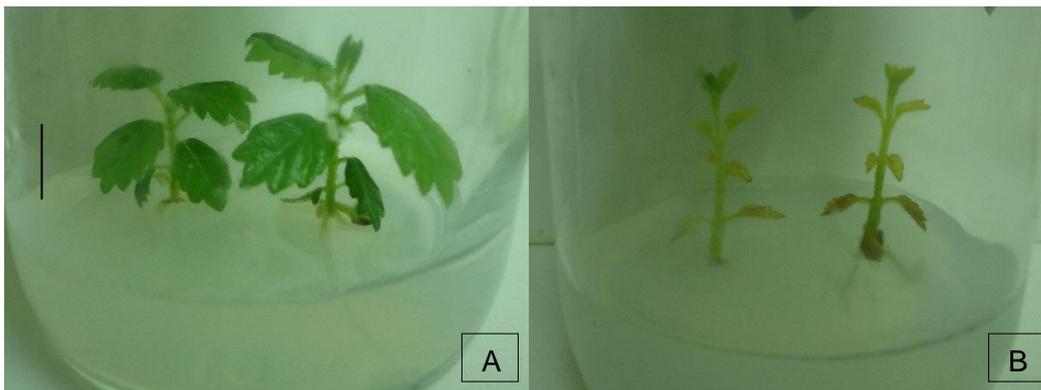


Figura 13 – Aspectos gerais de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivadas *in vitro* após 50 dias em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, sem subcultivo ou transferência para meio nutritivo fresco. Em A) Brotações com folhas sem sinal de senescência; em B) Brotações apresentando folhas com sinais de senescência e aspecto clorótico. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

De modo geral, a senescência é considerada um distúrbio metabólico natural, mas que pode ser influenciado por diversos fatores ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes, período de luminosidade, estresse térmico ou hídrico, dentre outros. Estes fatores podem estimular a ocorrência desse processo nos tecidos foliares. Contudo, trata-se de um fenômeno complexo do ponto de vista histológico, fisiológico, bioquímico e genético-molecular (genes e promotores envolvidos neste processo), porém natural, já que sua ocorrência está interligada com o ciclo de vida das folhas (BARRUETO CID, 2005). Outros pesquisadores tratam a senescência como uma série de eventos citológicos e bioquímicos. A nível celular pode ocorrer a destruição de algumas organelas, dentre elas o cloroplasto, cujo processo de degradação é desencadeado logo quando se inicia a senescência foliar. Além disso, a expressão de alguns genes que codificam proteínas envolvidas na fotossíntese pode ser inibida, enquanto outros genes, que codificam enzimas, como aquelas envolvidas na biossíntese do etileno (ACC sintase e ACC oxidase), são induzidos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Estes autores mencionaram, ainda, que alguns hormônios podem estar envolvidos neste processo, dentre os quais podem-se citar as citocininas, as quais são consideradas reguladoras naturais da senescência foliar, e o etileno, que está associado à degradação da clorofila e, conseqüentemente, ao desaparecimento gradual da cor dos tecidos foliares.

Nesse sentido, alguns estudos já foram realizados com objetivo de monitorar a senescência foliar em tecidos cultivados *in vitro*. Em particular, em brotações de *Annona glabra* L. (araticum), nas quais foram testadas as citocininas BAP, TDZ, CIN e ZEA na concentração 4,44 μ M, adicionadas ao meio nutritivo WPM, após 45 dias de cultivo *in vitro*, foi observado que as citocininas testadas foram eficientes no retardo da degradação de clorofilas, reduzindo, assim, a senescência foliar durante o cultivo *in vitro* desta espécie (OLIVEIRA et al., 2007). Já em *Moringa oleifera* L. (bastão-de-tambor), outra espécie florestal, os sinais de senescência foram desencadeados em torno dos 30 dias de cultivo *in vitro*, os quais dificultaram a micropropagação da espécie (CYSNE, 2006).

Já para a formação *in vitro* de raízes primárias e secundárias, também foi observado efeito significativo do período de avaliação (IV=6,36% e IV= 13,92% respectivamente). Ajustaram-se, para ambas as variáveis, equações de segundo grau (Figura 14), cujos valores de MET seriam observados em 126 e 155 dias de cultivo *in vitro* respectivamente.

De maneira geral, houve elevada formação de raízes primárias e secundárias durante o período de cultivo *in vitro*, atingindo médias de 77% e 48,51%, respectivamente, aos 186 dias. Para as raízes primárias foram observada médias promissoras desde a primeira avaliação (14 dias de cultivo *in vitro*), sendo, neste momento, observar mais de 30% de enraizamento das brotações, e, a partir dos 40 dias de cultivo, as brotações já haviam alcançado 70% de enraizamento. As respostas obtidas para variáveis rizogênese mostraram-se bastante promissoras em um período de tempo relativamente curto, ao passo que a indução *in vitro* de raízes para boa parte das espécies arbóreas ainda é considerado um problema, e que, para muitas espécies, a elucidação do processo de rizogênese não foi alcançada (CURTI, 2014).

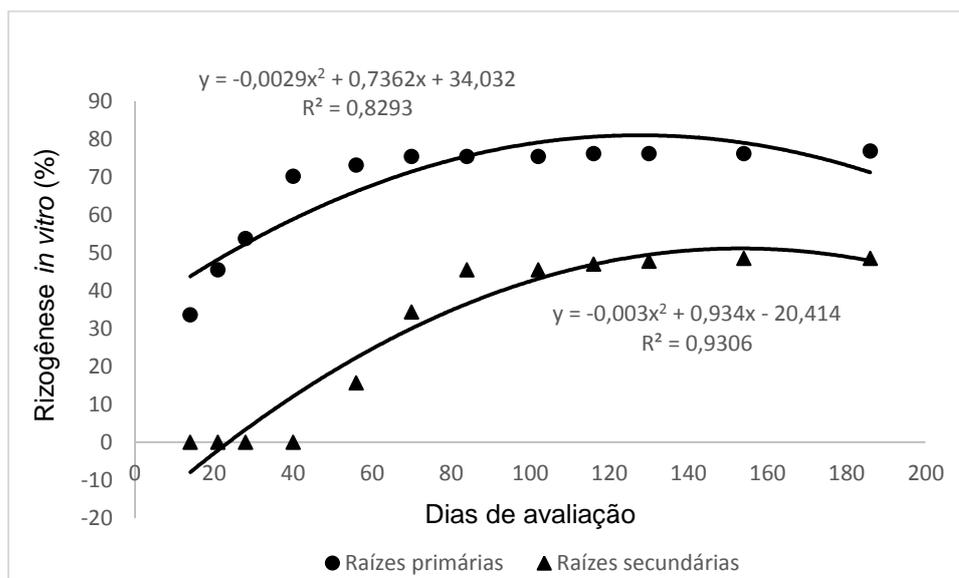


Figura 14 – Porcentagem média de rizogênese *in vitro* (formação de raízes primárias e secundárias) em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

A formação *in vitro* de raízes ainda é um fator limitante para a micropropagação de muitas espécies, dentre elas as florestais. Estudos com espécies lenhosas têm sido realizados visando estabelecer um protocolo eficiente para essa fase do cultivo *in vitro* e, de maneira geral, avaliando-se o uso de

fitorreguladores, especialmente das auxinas (SOUZA; PEREIRA, 2007). Nesse contexto, o resultado observado neste estudo, em que os explantes foram cultivados em meio nutritivo WPM, sem qualquer alteração na sua composição original de sais, na ausência de fitorreguladores, pode estar relacionado aos níveis endógenos de auxina nos tecidos vegetais dos segmentos nodais inicialmente cultivados, os quais se encontravam em níveis adequados a ponto de induzir o enraizamento *in vitro* sem a necessidade de suplementação exógena. Muitas vezes, um alto nível de auxinas endógenas pode ser suficiente para promover a indução de raízes adventícias primordiais (PEREIRA; SOUZA, 2007).

De maneira semelhante ao observado na presente espécie, o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *Rubus* sp. (amoreira-preta) foi atingido de maneira satisfatória sem o acréscimo de auxinas ao meio nutritivo MS após 60 dias de cultivo *in vitro* (PASA et al., 2012). Por outro lado, em *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith (cerejeira), a maior formação *in vitro* de raízes nas brotações cultivadas em ½WPM ocorreu na presença de 0,5µM de AIB, decorridos 30 dias (FERMINO JUNIOR; SCHERWISKI-PEREIRA, 2012).

Outro aspecto referente ao enraizamento é a formação de raízes secundárias, as quais são imprescindíveis para o bom funcionamento do sistema radicular. No presente estudo, embora quase 50% das raízes formadas *in vitro* tenham apresentado raízes secundárias, estas exibiram, em sua maioria, pequenas ramificações durante o período avaliado, podendo ser consideradas iniciais (Figura 15). Muitas vezes, a ausência ou a ineficiência de raízes secundárias e de pelos absorventes em brotações micropropagadas é atribuída à presença de ágar (VIAGANÓ et al., 2007), o qual pode conferir uma certa barreira física que impede o desenvolvimento dessas estruturas. Em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert (canafístula), por exemplo, foi observado que um sistema radicular desprovido de raízes secundárias não foi capaz de enraizar e sobreviver durante a fase de aclimatização (CURTI, 2014) de culturas *in vitro*.



Figura 15 – Formação de raízes secundárias iniciais em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivadas *in vitro* após 100 dias em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, na ausência de fitorreguladores. Barra= 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Igualmente ao que ocorreu com as demais variáveis, a calogênese *in vitro* sofreu influência significativa do período de cultivo *in vitro*, sendo ajustada uma equação linear crescente (IV=42,69%) (Figura 16). Foi observada baixa formação de calos junto às brotações de *H. chrysotrichus*, cuja máxima porcentagem média obtida foi de 11,19% aos 186 dias de cultivo. Durante as primeiras avaliações não se observou formação de calos nas brotações, somente a partir dos 50 dias de cultivo *in vitro*. Esta resposta, coincide com o período em que começaram a surgir os sinais de senescência foliar nas brotações inoculadas (a partir dos 40 dias de cultivo), podendo estar relacionada ao início de esgotamento dos nutrientes presentes no meio nutritivo.

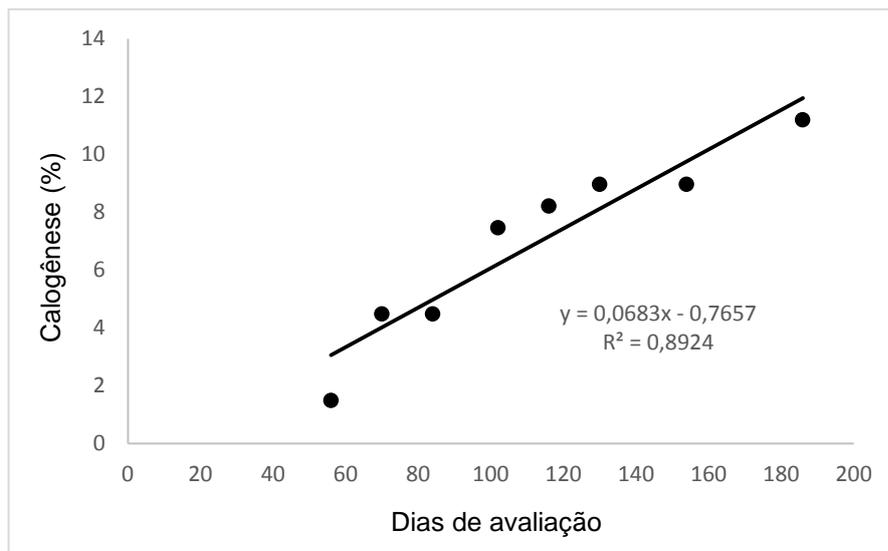


Figura 16 – Porcentagem média de calogênese em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Também houve efeito significativo do período de cultivo para a clorose foliar, sendo que, assim como para a calogênese, ajustou-se uma equação linear crescente (IV=16,06%) (Figura 17) ao seu desempenho. Pode-se perceber que, no decorrer do tempo de cultivo, houve um crescimento na ocorrência de clorose foliar, sendo observada a maior média aos 186 dias de cultivo *in vitro*, atingindo mais de 40% das brotações.

Assim como supramencionado, para a formação de calos e de folhas com sinais de senescência, a clorose foliar, também teve início após 40 dias de cultivo *in vitro*. Estas respostas podem estar sinalizando a eventual necessidade de transferência das brotações para um meio nutritivo fresco.

A clorose foliar é evidenciada pelo amarelecimento das folhas e pode causar redução no crescimento das plantas (WENDLING et al., 2006). Este fenômeno, de modo geral, sinaliza algum tipo de estresse que a planta está sofrendo como, por exemplo, deficiência mineral, excesso de luminosidade, presença de fitorreguladores no meio nutritivo, dentre outras condições (TREVIZAN, 2005). A presença desse fenômeno pode reduzir o desenvolvimento *in vitro* de espécies florestais. Em *Swietenia macrophylla* King (mogno) e *Melia azedarach* L. (cinamomo) sua ocorrência prejudicou a multiplicação *in vitro* (SCHOTTZ et al., 2007; CABEL, 2006).

O mesmo foi verificado na multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L. (figueira), em que a adição da giberilina GA₃ foi indicada como responsável pela indução de sua ocorrência (FRÁGUAS et al., 2004).

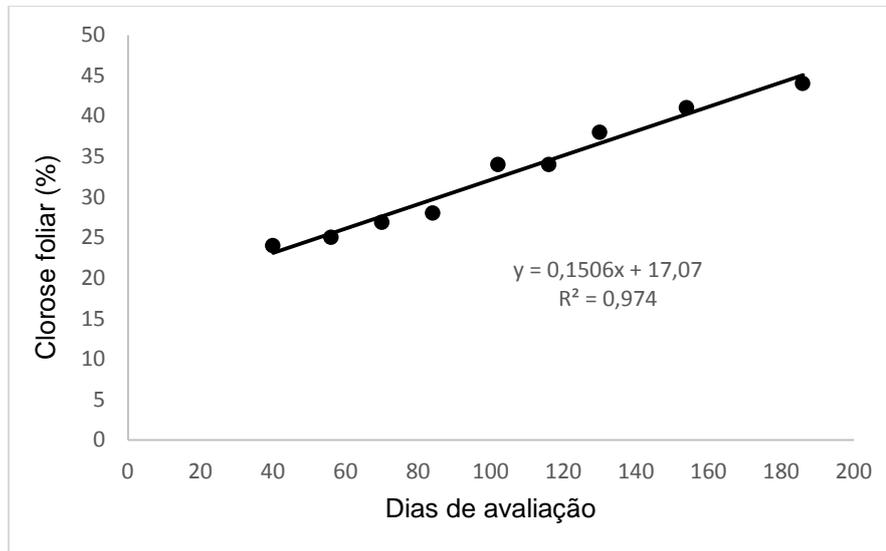


Figura 17 – Porcentagem média de clorose foliar em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

De maneira semelhante ao observado para clorose foliar, houve efeito significativo do período de cultivo para a oxidação fenólica (IV=16,06%). Novamente, ajustou-se uma equação quadrática (Figura 18). Não foi observada oxidação fenólica nas brotações nas duas primeiras avaliações realizadas, entretanto, a partir dos 28 dias de cultivo *in vitro* foi observado que mais de 30% das brotações apresentavam-se oxidadas e, a partir de então, sua ocorrência foi estável, mantendo uma média de, aproximadamente, 37% das brotações oxidadas, comportamento que pode ser visualizado pela curva ajustada.

A oxidação fenólica, responsável pelo escurecimento dos explantes, pode ocorrer com frequência em espécies florestais propagadas *in vitro* e, ainda, é tida com um desafio ao estabelecimento *in vitro* de culturas vegetais (SATO et al., 2001). Esses compostos fenólicos podem produzir substâncias tóxicas, as quais se acumulam nos tecidos vegetais podendo modificar a composição do meio do nutritivo e a absorção de nutrientes (ANDRADE et al., 2000).

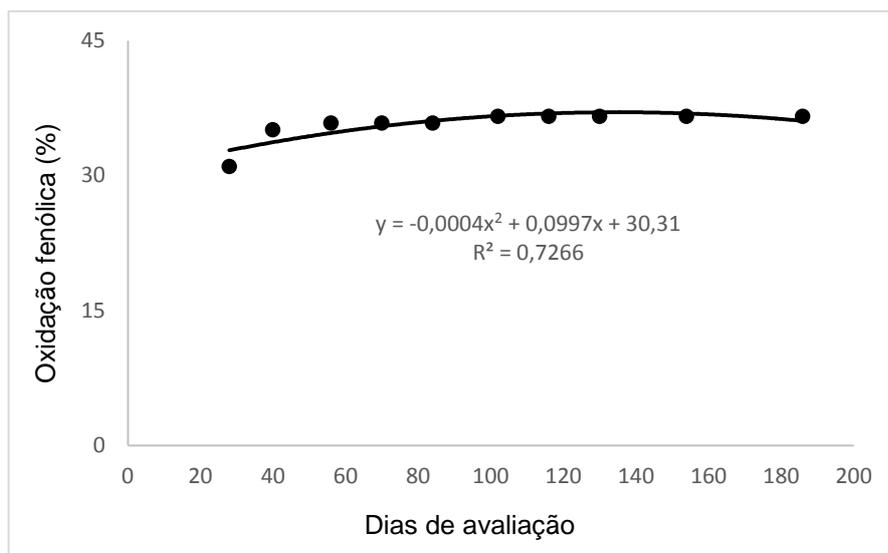


Figura 18 – Porcentagem média de oxidação fenólica em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 14, 21, 28, 40, 56, 70, 84, 102, 116, 130, 154 ou 186 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

5.4 Conclusões

As brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos apresentam folhas com sinais de senescência a partir dos 40 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM, porém em médias reduzidas.

A porcentagem de sobrevivência *in vitro* das brotações de *Handroanthus chrysotrichus* mantem-se elevada (acima de 50%) até os 115 dias de cultivo *in vitro*, sendo possível cultivá-las no mesmo meio nutritivo (WPM) por, pelo menos, 186 dias.

Há formação *in vitro* de raízes primárias e secundárias iniciais em brotações de *Handroanthus chrysotrichus*, obtidas a partir do cultivo de segmentos nodais de origem seminal, em meio nutritivo WPM, na ausência de fitorreguladores, em porcentagens satisfatórias para espécies lenhosas, a partir dos 50 dias de cultivo *in vitro*.

6 CAPÍTULO IV

RIZOGÊNESE *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO *EX VITRO* DE BROTAÇÕES DE *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos

6.1 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de AIB, na presença ou ausência de vermiculita na rizogênese *in vitro* de em *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos e, posterior aclimatização das mudas micropropagadas.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Efeito de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na rizogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus*

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, sendo que os tratamentos consistiram das diferentes concentrações de AIB (0; 5; 10 ou 20 μ M), totalizando quatro tratamentos, com oito repetições cada. A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes. Foram utilizados, como explantes, segmentos apicais caulinares isolados de brotações provenientes dos ensaios de multiplicação *in vitro*, anteriormente relatados. As brotações, antes de serem utilizadas no presente ensaio, passaram por um período de 15 dias de cultivo em meio nutritivo WPM acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 7g L⁻¹ de ágar e 1g L⁻¹ de carvão ativado, na ausência de fitorreguladores.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos apicais caulinares foram inoculados em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de 30g L^{-1} de sacarose, 50mg L^{-1} de mio-inositol, 7g L^{-1} de ágar e 1g L^{-1} de carvão ativado, além das diferentes concentrações de AIB, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8, previamente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

A avaliação foi realizada após 60 dias de cultivo *in vitro*. As variáveis analisadas foram: sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), formação de raízes primárias, formação de raízes secundárias, brotações com calo, oxidação fenólica (escurecimento na base do explante), todas expressas em porcentagem, além de comprimento médio de raízes, em cm.

6.2.2 Cultivo inicial: Efeito de AIB combinado à presença ou ausência de vermiculita na rizogênese *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus*

O presente ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4×2 , em que os tratamentos foram constituídos das diferentes concentrações de AIB (0; 5; 10 ou $20\mu\text{M}$) combinadas à presença ou ausência de vermiculita, totalizando oito tratamentos, com sete repetições cada. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e duas brotações. As brotações utilizadas neste ensaio, foram provenientes de plântulas germinadas *in vitro* e, na sequência, cultivadas, durante 30 dias, em meio nutritivo WPM, acrescido de 30g L^{-1} de sacarose, 100mg L^{-1} de mio-inositol, 7g L^{-1} de ágar, sem adição de fitorreguladores.

Em câmara de fluxo laminar, as brotações foram inoculadas em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de 30g L^{-1} de sacarose, 50mg L^{-1} de mio-inositol, 7g L^{-1} de ágar e 1g L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP), o qual foi adicionado ao meio nutritivo objetivando controlar a oxidação fenólica. Adicionalmente, conforme o tratamento, foi acrescentado, ao meio nutritivo, AIB, na concentração de acordo com o tratamento, e 30mL de vermiculita. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com

ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

A avaliação foi realizada após 45 dias de cultivo *in vitro*. As variáveis analisadas foram: sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), formação de raízes primárias, formação de raízes secundárias, brotações com calo, oxidação fenólica (escurecimento na base do explante), clorose foliar (amarelecimento das folhas), todas expressas em porcentagem, e também, o comprimento médio de raízes, em cm.

6.2.3 Subcultivo: Rizogênese *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus*

Neste subcultivo foram usadas as brotações provenientes do ensaio anterior, descrito no item 6.2.2 (cultivo inicial), visando otimizar a formação *in vitro* de raízes adventícias. Com essa finalidade, em câmara de fluxo laminar, as brotações foram inoculadas em frascos com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de 20g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol, 7g L⁻¹ de ágar e 30mL de vermiculita. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min.

A avaliação foi realizada aos 25 dias de cultivo *in vitro*. As variáveis analisadas foram: sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), formação de raízes primárias, formação de raízes secundárias, todas expressas em porcentagem, e também, o comprimento médio de raízes (cm).

6.2.4 Aclimatização *ex vitro* de brotações micropropagadas de *Handroanthus chrysotrichus*

Com o objetivo promover a aclimatização *ex vitro* brotações cultivadas no ensaio anterior, conforme descrito no item 6.2.4 (Subcultivo 1), primeiramente, foram abertos os frascos que continham as brotações, para permitir que ocorresse de

modo gradual, as trocas gasosas entre as brotações cultivadas *in vitro* e o ambiente externo. Após, decorridos dois dias da abertura dos frascos, as brotações foram transferidas para copos de plástico com capacidade para 300mL, contendo 300mL de substrato Mecplant®, nos quais permaneceram durante sete dias ainda com cobertura, a qual foi proporcionada por outro copo plástico, de mesma capacidade, com cinco pequenas perfurações. Foram utilizadas, no total 42 repetições, sendo que cada copo plástico recebeu uma brotação.

Os copos plásticos contendo as brotações foram dispostos em bandejas plásticas contendo, em sua base, uma lâmina de 1cm de água destilada visando proporcionar um microclima adequado à aclimatização das brotações provenientes do cultivo *in vitro*. A avaliação foi realizada após 30 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência das brotações (brotações com coloração verde), número de folhas por brotação e comprimento da parte aérea (cm).

6.2.5 Condições de cultivo

Após a inoculação das brotações, os frascos foram vedados com papel alumínio (exceto os copos plásticos que continham as brotações submetidas ao processo de aclimatização) e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C}\pm 3$, fotoperíodo de 16h, e intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

6.2.6 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 médias das 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 F ou o teste de

Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, para os tratamentos qualitativos. Enquanto que, para os tratamentos quantitativos, foi realizada a análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2006). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{N}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTE-GOMES, 2009).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Cultivo inicial: Efeito de AIB na rizogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares de *Handroanthus chrysotrichus*

Não houve efeito significativo das concentrações de AIB para nenhuma das variáveis analisadas. No entanto, foi observada elevada média geral (91,69%, IV=8,75%) para a sobrevivência *in vitro* dos segmentos apicais caulinares após 60 dias de cultivo.

Para a formação *in vitro* de raízes adventícias, a média alcançada foi de 21,81% de raízes primárias (IV=50,70%), sendo que, destas, apenas 3,09% apresentaram raízes secundárias (IV=115,08%). Ambas as médias são consideradas baixas e indicam que as concentrações de AIB testadas não foram eficientes na indução *in vitro* de raízes em segmentos apicais caulinares de *H. chrysotrichus*. O mesmo foi verificado para o comprimento médio de raízes, as quais exibiram apenas 0,85 cm (IV=56,34%).

A indução de raízes adventícias em explantes de caule e de folhas tem ocorrido, na maioria dos estudos, de maneira empírica, a partir da adição de auxinas ao meio nutritivo, o que altera a relação auxina/citocinina endógena dos tecidos. Na presença da auxina no meio nutritivo, é comum o aparecimento de calos, enquanto as raízes podem aparecer logo depois. Entretanto, a morfogênese tem sido observada em numerosas espécies de plantas cultivadas *in vitro*, mas ainda não é

possível apresentá-la como um fenômeno universal. Várias plantas e tecidos ainda são de difícil manipulação *in vitro* e pouco ou nada respondem aos estímulos e sinais aplicados, por isso, são chamadas de recalcitrantes (LEMOS, 2010). Nos experimentos de rizogênese *in vitro* em espécies lenhosas este fato, além de muito frequente, é recorrente.

Contudo, para muitas espécies florestais, já foram obtidos resultados promissores na fase de rizogênese *in vitro*. Exemplos de sucesso são microestacas de *Cabralea canjerana*, nas quais foram testadas diferentes concentrações de AIB (0; 2,5; 5 ou 10 μ M) acrescidas ao meio $\frac{1}{2}$ MS. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, foram observadas 87,5% de microestacas enraizadas a 5 μ M de AIB (ROCHA et al., 2007). Igualmente, brotações de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo), em que foram testadas as auxinas AIB (22,22 μ M) e ANA (26,85 μ M), isoladamente, ou na presença de carvão ativado (1,5g L⁻¹), após 30 dias de cultivo *in vitro*, o melhor resultado obtido foi de 73% de brotações enraizadas com a combinação entre AIB e carvão ativado (MANTOVANI et al., 2001). Da mesma maneira, em *Acca sellowiana* (Berg) Burret (goiabeira), foram obtidos 68,9% de enraizamento *in vitro* por meio do tratamento pulso de seis dias na presença de 20 μ M de AIB, tratamento que, também, resultou em maior número médio (1,3 raízes) e comprimento médio de raízes (5,6 mm) (OLTRAMARI et al., 2000).

Já em relação à calogênese (36,44%; IV= 33,42%) e à oxidação fenólica observadas nos explantes (63,56%, IV=22,69%) as médias podem ser consideradas altas, especialmente, a oxidação fenólica. A elevada porcentagem de explantes oxidados pode ter interferido, negativamente, na indução *in vitro* de raízes nos segmentos apicais caulinares de *H. chrysotrichus*. Este fenômeno pode inibir a morfogênese *in vitro* em qualquer fase da microprogação, por meio da liberação de substâncias tóxicas, as quais podem causar necroses e, em casos mais severos, a morte do explante (THOMAS, 2008).

6.3.2 Efeito de AIB combinado à presença ou ausência de vermiculita na rizogênese *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus*

Para a sobrevivência *in vitro* das brotações houve efeito significativo do fator principal presença de vermiculita no meio nutritivo ($p=0,0005$) (Tabela 30). O tratamento contendo vermiculita, independentemente das concentrações de AIB, forneceu o melhor resultado, sendo verificada uma elevada porcentagem de sobrevivência *in vitro* das brotações nesta condição. De maneira semelhante, durante o enraizamento *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert (canafístula), foram observadas médias superiores a 90% de sobrevivência *in vitro* das brotações, independentemente dos substratos (vermiculita, Plantmax® ou areia fina, combinados a presença ou ausência de ágar) adicionados ao meio nutritivo MS acrescido de 10 μ M de AIB (CURTI; REINIGER, 2014).

Tabela 30 – Médias de sobrevivência *in vitro* (%) de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), na presença ou ausência de vermiculita independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Vermiculita	Sobrevivência <i>in vitro</i> (%)
Presença	87,50 a*
Ausência	51,78 b
Média (%)	69,64
IV**	19,30

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Para a indução *in vitro* de raízes primárias (IV=66,47%), secundárias (IV=81,65%) e comprimento médio de raízes (IV=83,83%) não foram verificados efeitos significativos dos fatores testados e, tampouco, da interação entre estes. As médias alcançadas foram 11,60%, 8,92% e 0,33cm respectivamente. O resultado observado indica que as concentrações de AIB combinadas à presença ou ausência

de vermiculita não foram eficientes em promover a rizogênese *in vitro* em brotações de *H. chrysotrichus*.

O desenvolvimento *in vitro* de um sistema radicular eficiente em plantas micropropagadas é tido como um processo complexo que envolve diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, que ainda não foram completamente elucidados, podendo estes dificultar ou até impedir o estabelecimento de um protocolo de micropropagação para determinadas espécies (SOUZA; PEREIRA, 2007). Nesse sentido, além da utilização de diferentes classes de fitorreguladores, pode-se interferir na composição do meio nutritivo visando obter resultados mais promissores à formação *in vitro* de raízes adventícias em espécies arbóreas (CURTI; REINIGER, 2014). A adição de vermiculita ao meio nutritivo, por exemplo, modifica a estrutura do meio proporcionando-lhe maior aeração e, assim, podendo favorecer a rizogênese (CALDAS, 1990).

Por outro lado, em diversas espécies, inclusive florestais, esta fase do cultivo *in vitro* já foi ultrapassada. Como é caso de *Malus pumilla* Mill. (macieira M9), em que ao serem testados três diferentes tipos de substratos (ágar, vermiculita e cinza vegetal), incorporados ao meio nutritivo ½MS, foram observadas mais de 80% das miniestacas enraizadas na presença de vermiculita ou cinza vegetal, após 35 dias de cultivo *in vitro*. Contudo, o maior comprimento médio de raízes foi observado na presença de ágar, sendo obtidos 5,7cm (VIEIRA et al., 2007). Comportamento semelhante foi observado em *Prunus cerasifera* cv. Mr. S. 1/8 (pessegueiro), em que foi possível substituir o ágar por vermiculita e obter uma porcentagem de enraizamento *in vitro* superior a 90%, após 35 dias de cultivo (VIAGANÓ et al., 2007). Altas porcentagens de enraizamento *in vitro* (90%), também, foram observadas em brotações de *Melia azedarach* L. (cinamomo) cultivadas em meio nutritivo ½MS acrescido de 4,92µM de AIB (CABEL, 2006). Já para *Peltophorum dubium* (canafístula), o melhor resultado obtido na rizogênese *in vitro*, foi atingido com a combinação de vermiculita e ágar adicionados ao meio nutritivo MS, após 60 dias de cultivo *in vitro* das brotações, sendo observada uma média de 36,78% de brotações com raízes (CURTI, REINIGER, 2014).

Quanto à calogênese *in vitro* ($p=0,0000$; $IV=26,83\%$) houve efeito significativo das concentrações de AIB. Observou-se um comportamento quadrático (Figura 19), em que a máxima eficiência técnica (MET) ocorreria na presença de 13,39µM da auxina.

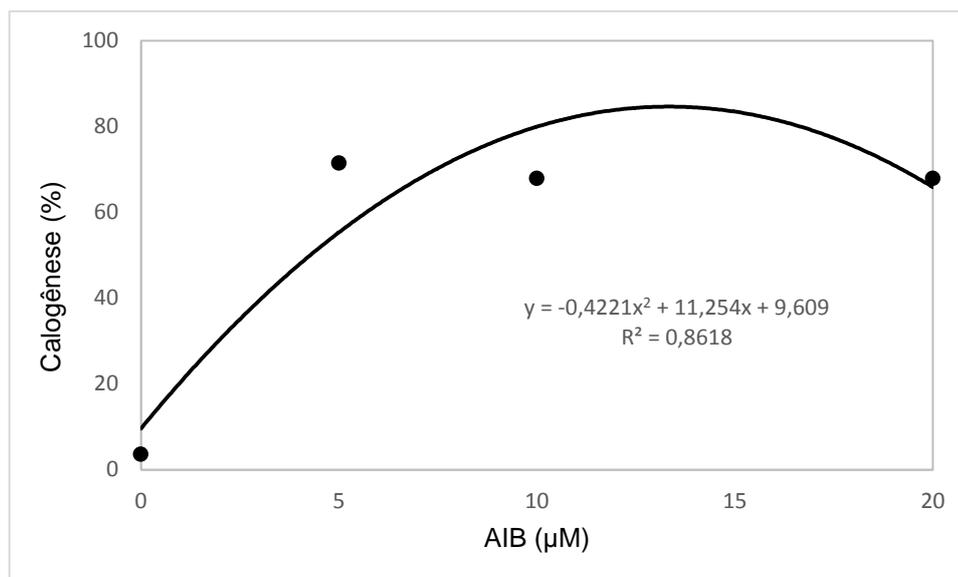


Figura 19 – Porcentagem média de calogênese em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido das diferentes concentrações de AIB (0; 5; 10 ou 20µM) independentemente da presença ou ausência de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Foi observado que, na ausência da auxina, a formação de calos foi praticamente nula, enquanto na presença de AIB a 5µM houve elevada formação calogênica basal em mais de 70% das brotações. Embora tenha sido observada pequena redução, nas demais concentrações de AIB avaliadas, a calogênese manteve-se, ainda, elevada (67,85%). Esta resposta indica, que a adição da auxina, provavelmente, alterou o balanço hormonal endógeno, equilibrando-o e, em consequência, favoreceu a calogênese em detrimento à formação de raízes adventícias.

Alguns autores indicaram que, ao se alterar o balanço hormonal endógeno, por meio da adição de auxinas e, dessa maneira, favorecer o surgimento de calos na base das brotações, compromete-se não só o enraizamento *in vitro* como, também, o crescimento da parte aérea (PASCAL et al., 2001). Além disso, a formação de calos na base das brotações, pode, muitas vezes, interferir na qualidade do sistema radicular formado, afetando principalmente as conexões do explante com o sistema vascular e, conseqüentemente, comprometendo o processo de aclimatização das brotações (FACHINELLO et al., 1995). É possível, também, que a adição de auxinas

como ANA, AIB e AIA, ao meio nutritivo, frequentemente, pode induzir a formação de calos e promover o desenvolvimento de raízes mais grossas nas plantas. Estas respostas são indesejáveis durante a etapa de enraizamento *in vitro*, visto que podem interferir, negativamente, na funcionalidade do sistema radicular, podendo, inclusive, comprometer a aclimatização das brotações propagadas *in vitro* (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1998).

Em estudo realizado com *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), foi observada a formação de calos (superior a 25%) na base dos explantes na presença de 6 μ M de AIB em meio nutritivo WPM, após 30 dias de cultivo *in vitro* (LEÓN, 2014). Porcentagens mais elevadas de calos (65,41%) foram observadas em *Peltophorum dubium* (canafístula), aos 60 dias de cultivo, durante enraizamento *in vitro*, na presença de 10 μ M de AIB acrescido ao meio nutritivo ½WPM, na presença de vermiculita e, independentemente das concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L⁻¹) e ágar (0 ou 7 g L⁻¹) (CURTI, 2014).

Em relação à porcentagem de clorose foliar (IV=24,18%) não foi observado efeito significativo dos fatores testados e nem da interação entre eles. Todavia, foi constatada a ocorrência de 68,75% de clorose foliar, média considerada elevada, a qual pode ter influenciado, negativamente, a formação *in vitro* de raízes para a espécie em questão.

Aliada a esta resposta pode estar, também, relacionada a oxidação fenólica, a qual sofreu efeito significativo da presença ou ausência de vermiculita no meio nutritivo (p=0,0000) (Tabela 31).

Tabela 31 – Médias de porcentagem de oxidação fenólica em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo), após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'Woody Plant Medium' - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), na presença ou ausência de vermiculita independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20 μ M). Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Vermiculita	Oxidação fenólica (%)
Presença	19,64 a*
Ausência	62,50 b
Média (%)	41,07
IV**	38,56

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Assim como observado na sobrevivência *in vitro*, a melhor resposta em relação à oxidação fenólica foi obtida na presença de vermiculita. Estas respostas, possivelmente, estão relacionadas, já que a maior porcentagem de brotações que sobreviveram foi observada quando a oxidação fenólica mostrou-se mais reduzida, ratificando que estes processos são inversamente relacionados. A oxidação fenólica tem sido relatada como prejudicial ao estabelecimento *in vitro* de espécie lenhosas, devido ao acúmulo de polifenóis em torno da superfície incisada, sendo que as substâncias que são liberadas podem prejudicar a absorção de nutrientes (ANDRADE et al., 2000).

6.3.3 Subcultivo: Rizogênese *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus*

O presente subcultivo foi executado na tentativa de melhorar o desenvolvimento do sistema radicular das brotações de *H. chrysotrichus*, que foram cultivadas em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM acrescido de diferentes concentrações de AIB na presença ou ausência de vermiculita, uma vez que não foi obtido um resultado satisfatório durante o cultivo inicial. Desse modo, as brotações, após 60 dias de cultivo *in vitro*, foram subcultivadas em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM na presença de vermiculita, tendo em vista que, houve maior média de sobrevivência *in vitro* e

menor porcentagem de oxidação fenólica durante o cultivo inicial, quando esta estava presente. Em decorrência disso, as brotações foram mantidas todas sob as condições de cultivo *in vitro* iguais, não havendo, portanto, tratamentos distintos.

De maneira geral, foi observado que o material vegetal subcultivado obteve respostas mais promissoras se comparado ao cultivo inicial, sendo alcançada média de 100% de sobrevivência das brotações subcultivadas, após 25 dias de cultivo *in vitro* na ausência de fitorreguladores. Em relação à rizogênese, também, foi verificada uma resposta superior à obtida no cultivo inicial. Para a formação *in vitro* de raízes primárias nas brotações, foi observada uma média geral de 52,38% sendo que, destas, 30,95% apresentaram raízes secundárias iniciais (Figura 20). Além disso, foi obtido um comprimento médio de raízes superior (0,92cm) ao observado no cultivo inicial (0,33cm), apesar de ser ainda baixo. Alguns autores indicaram que o processo de formação de raízes pode ser dividido em três fases: indução, iniciação e alongação. De maneira geral, a indução e a iniciação são dependentes de auxina, enquanto a alongação (crescimento) pode ser inibida pela presença de fitorreguladores (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998).

Em *H. chrysotrichus*, pode-se perceber, durante os cultivos realizados, que, na ausência de fitorreguladores, de modo geral, a espécie apresentou melhor desenvolvimento *in vitro*. Relatos indicam, que do mesmo modo que existe um significativo número de espécies que necessitam da adição de fonte de auxinas exógena, para promover o enraizamento *in vitro*, existem aquelas espécies que enraízam sem a necessidade dessa classe de fitorreguladores, pois já possuem elevados níveis endógenos (SOUZA, PEREIRA, 2007).



Figura 20 – Formação de raízes adventícias em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), subcultivadas *in vitro* em meio nutritivo ‘Woody Plant Medium’ - WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de vermiculita, após 25 dias de cultivo *in vitro*. A) Formação *in vitro* de raízes primárias; B) Formação *in vitro* de raízes secundárias iniciais. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

6.3.4 Aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Handroanthus chrysotrichus*

Não foi possível promover a aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas de *H. chrysotrichus* de maneira satisfatória, sendo que das 42 mudas submetidas às condições *ex vitro*, apenas três sobreviveram e continuaram o seu desenvolvimento fora do ambiente *in vitro*. De maneira geral, esta resposta pode estar relacionada ao sistema radicular mal formado das plantas, pois apesar de se obter uma porcentagem de raízes relativamente satisfatória (52,38%). No entanto, estas não apresentaram raízes secundárias e pelos absorventes em quantidade adequada.

Muitas vezes, a aclimatização é uma etapa da propagação *in vitro* que pode ser limitante ao estabelecimento de um protocolo de micropropagação para diversas espécies, não permitindo que se obtenham elevadas taxas de sobrevivência das plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SILVA et al., 2007). Várias podem ser as causas para as baixas taxas de sobrevivência, dentre as quais podem ser citadas

a perda excessiva de água que sofrem durante o período de aclimatização (SCHUCK et al., 2012), formação *in vitro* de sistema radicular ineficiente (HOFFMANN et al., 2001; SOUZA; PEREIRA, 2007), ocorrência de calogênese na base das brotações cultivadas *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para *Malus pumilla* (macieira) a aclimatização foi possível, somente, quando as miniestacas micropropagadas foram desenvolvidas em meio nutritivo contendo vermiculita, sendo observada uma média de 93,5% de sobrevivência *ex vitro* das plantas, após 40 dias em estufa. Os autores atribuíram os ganhos na qualidade do sistema radicular formado *in vitro*, à maior aeração proporcionada ao meio nutritivo com a adição de vermiculita e cinza vegetal, permitindo assim, a indução de raízes ramificadas com presença abundante de pelos absorventes, os quais são imprescindíveis para o sucesso da fase de aclimatização (VIEIRA et al., 2007).

Em ensaios visando ao enraizamento *in vitro* e, posterior aclimatização *ex vitro* de brotações de *Prunus salicina* Lindl. Cv. América (ameixa japonesa), foi observado que a presença de AIB (0, 0,25, 0,5, 0,75 ou 1mg L⁻¹), no meio nutritivo ½MS proporcionou melhores médias para a formação *in vitro* de raízes (41,95%), quando comparadas às médias obtidas na presença de AIA nas mesmas concentrações, aos 20 dias de cultivo. Já para a aclimatização *ex vitro* das plantas, provenientes da micropropagação, após 30 dias, as maiores porcentagens de sobrevivência *ex vitro* aconteceram em plantas cultivadas em AIB ou AIA a 1mg L⁻¹ (88 e 92% respectivamente). Entretanto, os autores mencionaram que, embora AIB tenha proporcionado maior enraizamento *in vitro*, a maioria das brotações sobreviventes foram aquelas cultivadas na presença de AIA, provavelmente porque AIB promoveu a indução de raízes mais fibrosas e, assim, mais suscetíveis à danificação no momento de transferência para o substrato (BANDEIRA et al., 2012).

6.4 Conclusões

As concentrações de AIB testadas não promovem um nível satisfatório de rizogênese *in vitro* em *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos.

É possível obter 52,38% de enraizamento *in vitro* das brotações de *Handroanthus chrysotrichus* subcultivadas na ausência de fitorreguladores e com a

adição de vermiculita ao meio nutritivo WPM, cujas concentrações de sais foram reduzidas à metade ($\frac{1}{2}$ WPM).

Na presença de vermiculita no meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), é verificada elevada porcentagem de sobrevivência *in vitro* e menor ocorrência de oxidação fenólica nas brotações de *Handroanthus chrysotrichus*.

Há elevada formação de calos na base das brotações de *Handroanthus chrysotrichus* na presença de Ácido 3 Indobutírico - AIB, após 45 dias de cultivo *in vitro*.

A aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Handroanthus chrysotrichus* não é bem sucedida quando estas são transferidas para substrato Mecplant® e mantidas nas condições de sala de crescimento.

7 CAPÍTULO V

ANATOMIA FOLIAR DE BROTAÇÕES DE *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos MICROPROPAGADAS

7.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi analisar aspectos relacionados à anatomia foliar de plantas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos germinadas *in vivo* e *in vitro*, brotações micropropagadas que foram cultivadas na presença ou na ausência de fitorreguladores e, ainda, de brotações que foram aclimatizadas.

7.2 Material e métodos

Para as avaliações da anatomia foliar de *Handroanthus chrysotrichus* foram confeccionadas lâminas histológicas de material vegetal proveniente da germinação de sementes e dos ensaios realizados para a micropropagação desta espécie, conforme descritos nas metodologias dos capítulos anteriores (II, III e IV). Sendo assim, foram utilizadas folhas de *H. chrysotrichus* dos seguintes materiais:

- plantas germinadas *in vivo* (plântulas germinadas em casa de vegetação, em substrato Mecplant®, com aproximadamente 90 dias);
- plantas germinadas *in vitro* em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM) (plantas com aproximadamente 60 dias);
- brotações (com aproximadamente 40 dias de cultivo) que passaram por tratamentos com fitorreguladores (ensaios de multiplicação *in vitro* com utilização das citocininas 6-Bezilaminopurina - BAP, 2-Isopenteniladenina - 2-iP, Cinetina - CIN ou Thidiazuron - TDZ e, ensaio de enraizamento *in vitro* usando a auxina Ácido 3-Indolbutírico - AIB);
- brotações cultivadas *in vitro* em meio nutritivo WPM ou $\frac{1}{2}$ WPM (meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade), sem a presença de

fitorreguladores, advindas dos ensaios de senescência foliar (brotações com aproximadamente 120 dias de cultivo) e multiplicação *in vitro* (explantos de origem seminal, com aproximadamente 60 dias de cultivo);

- plantas aclimatizadas *ex vitro* (com aproximadamente 40 dias de cultivo *ex vitro*).

Dessa maneira, os tratamentos consistiram da comparação entre os materiais vegetais mantidos *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizados. Tentou-se realizar uma comparação geral em relação à organização dos tecidos foliares de *H. chrysotrichus* submetidos a diferentes tratamentos *in vitro* e ambientes de cultivo. Assim, foram confeccionadas lâminas histológicas dos tecidos foliares de *H. chrysotrichus*, sendo que, para isso, foi realizada uma sequência de procedimentos conforme descrito a seguir:

- Clivagem do material vegetal.
- Desidratação em série etílica:
 - 70% durante 1h;
 - 80% durante 1h;
 - 90% durante 1h;
 - 95% durante 1h;
- Absoluto *over night*.
- Banho em solução de etanol absoluto e xilol:
 - solução de xilol e etanol (1:2);
 - solução de xilol e etanol (1:1);
 - solução de xilol e etanol (2:1).
- Impregnação com parafina: seis banhos de parafina de alto ponto de fusão (56° - 58°C).
- Emblocamento: foi realizado com uma mistura de parafina de alto ponto de fusão acrescido de 20% de cera de abelha.
- Corte do bloco em micrótomo rotativo automático: foram realizados cortes transversais em micrótomo rotativo automático com a espessura de 5µm, logo após o fragmento foi distendido em banho-maria com temperatura de 54°C±1 e colocado sobre a lâmina. Na sequência, os fragmentos permaneceram por 12h em um suporte para secagem.

- Reidratação: após a secagem, as lâminas foram banhadas com xilol para a retirada da parafina. O material fixado a lâmina foi reidratado com a seguinte sequência:

- etanol a 95% por 5min;
- etanol a 90% por 5min;
- etanol a 80% por 5min;
- etanol a 70% por 5min;
- etanol a 60% por 5min;
- etanol a 40% por 5min;
- água destilada.

- Coloração: as lâminas foram imersas em solução de Azul de Toluidina durante 1min. Após este período, as lâminas foram colocadas em água corrente por 2min, para a retirada do excesso de corante e, posteriormente, levadas à estufa para secagem. Por fim, foi realizada a colagem da lamínula.

A análise dos tecidos vegetais (nervura central e lâmina foliar), fixados nas lâminas histológicas, foi executada em microscópio ótico Zeiss Primo Star.

As lâminas histológicas foram confeccionadas no Laboratório de Histotécnica da Universidade de Cruz Alta – UNICRUZ, em Cruz Alta, RS.

7.3 Resultados e discussão

De acordo com as observações realizadas dos tecidos foliares de *Handroanthus chrysotrichus* mantidos *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizados, pode-se perceber que, de maneira geral, existem diferenças na organização das células e tecidos submetidos a diferentes tratamentos e ambientes de cultivo. Pode-se verificar que os tecidos desenvolvidos em condições *in vivo*, os quais foram isolados de plantas provenientes de germinação de sementes em substrato comercial e mantidas em estufa (Figura 21 A e B), apresentaram uma estrutura celular bem definida, mais organizada, com células mais espessas e diferenciadas, em comparação aos tecidos foliares isolados de plantas provenientes da germinação *in vitro* de sementes (Figura 21 C e D). Além disso, foi observada a presença de células de tecido de sustentação (esclerênquima) bem definidas na região da

nervura central de folhas cultivadas *in vivo* (Figura 21 B). Estes tipos celulares, também foram observados nos cortes transversais dos tecidos foliares mantidos *in vitro* e aclimatizados (Figura 21 E), embora neste dois últimos, a presença desse tipo de tecido foi bem menos evidente. Em outro estudo, a presença de periciclo esclerenquimático (fibras), também, foi, igualmente, observada na unidade vascular central de espécies do gênero *Handroanthus*, incluindo *H. chrysotrichus* (SILVA et al., 2009).

Algumas modificações anatômicas são, frequentemente, observadas em tecidos vegetais mantidos em ambientes de cultivo diferentes. Em tecidos cultivados *in vitro*, em particular, tem sido observada uma menor diferenciação do mesófilo, menor espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, além de espaços intercelulares menores, quando comparados aos tecidos de plantas desenvolvidas em condições *in vivo* (DOSSEAU et al., 2008). Estes autores, indicaram, ainda, que a diferenciação dos tecidos e a plasticidade na anatomia foliar são interessantes no processo de absorção de luz e, que quanto mais espesso for o parênquima paliçádico, possivelmente, maiores serão as taxas fotossintéticas.

A comparação entre as estruturas anatômicas de tecidos cultivados *in vitro* e *ex vitro*, pode fornecer informações importantes relacionadas à compreensão de algumas estratégias adaptativas que as plantas micropropagadas tendem a desenvolver, uma vez que são submetidas a condições diferentes daquelas encontradas na natureza. Muitas vezes, as mudas provenientes dos cultivos *in vitro*, estão expostas a um microambiente único, organizado para gerar estresse mínimo, mas em condições favoráveis à multiplicação (HAZARIKA, 2006), desse modo, podendo sofrer alterações morfológicas, fisiológicas e anatômicas durante esse período (CALVETE et al., 2002).

Já em relação à epiderme, nos três casos (*in vivo*, *in vitro* e aclimatizados), foi percebida uma camada única de células, tanto na face adaxial como abaxial. Nos tecidos desenvolvidos *in vivo* e *in vitro*, a epiderme apresentou células mais uniformes e arredondadas que nos tecidos do material vegetal que sofreu aclimatização, cujas células tem um formato mais hexagonal. Este fato pode ser decorrente da desorganização celular que, provavelmente, ocorre quando os tecidos cultivados *in vitro* são submetidos às condições *ex vitro*, evento que, muitas vezes, influencia na sobrevivência *ex vitro* de materiais micropropagados (DOSSEAU et al., 2008).

Resultados semelhantes foram observados em *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (ipê-do-cerrado), em estudo anatômico comparativo entre tecidos cultivados *in vivo*, *in vitro* e aclimatizados, sendo verificada a presença de epiderme uniestratificada, constituída por células de formato arredondado nas plantas *in vitro* e, hexagonal, à medida que ocorreu o processo de aclimatização (DOSSEAU et al., 2008). Em outro estudo anatômico desenvolvido com *H. chrysotrichus*, também foi constada a presença de epiderme unisseriada (SILVA et al., 2009).

Quanto às células da nervura central, foram visualizadas células menos uniformes nos tecidos foliares cultivados *in vitro* e aclimatizados, sendo estas maiores e apresentando-se mais frouxas que as células da nervura central dos tecidos vegetais desenvolvidos *in vivo*. Os tecidos vasculares, também, mostraram-se mais definidos e organizados nos tecidos mantidos *in vivo*. Pesquisas indicaram que o ineficiente desenvolvimento dos tecidos vasculares, que pode ocorrer em plantas micropropagadas, devido à baixa transpiração destas nas condições *in vitro*, é um dos principais problemas estruturais e anatômicos que podem estar envolvidos na baixa aclimatização *ex vitro* dessas plantas (MARTINS et al., 2012). De maneira geral, as alterações morfo-anatômicas podem reduzir a capacidade de sobrevivência após a transferência para o ambiente *ex vitro*, sendo que é fundamental a avaliação das possíveis mudanças que podem ocorrer durante esse processo de adaptação (DOUSSEAU et al., 2008).

Estes aspectos foram observados no presente estudo com *H. chrysotrichus*, apesar de os materiais vegetais utilizados para confecção das lâminas anatômicas não possuírem a mesma idade, característica importante para se poder realizar uma análise comparativa mais precisa quanto à anatomia dos tecidos foliares, foi observado que existem diferenças anatômicas e estruturais marcantes em relação ao modo de cultivo a que as plantas são submetidas. Esta relação fica evidente ao se comparar, por exemplo, o tecido vascular dos tecidos mantidos *in vivo* (Figura 21 A) com o tecido vascular, quase inexistente e desorganizado, visto no corte realizado do tecido cultivado *in vitro* por mais de 120 dias (Figura 21 F).

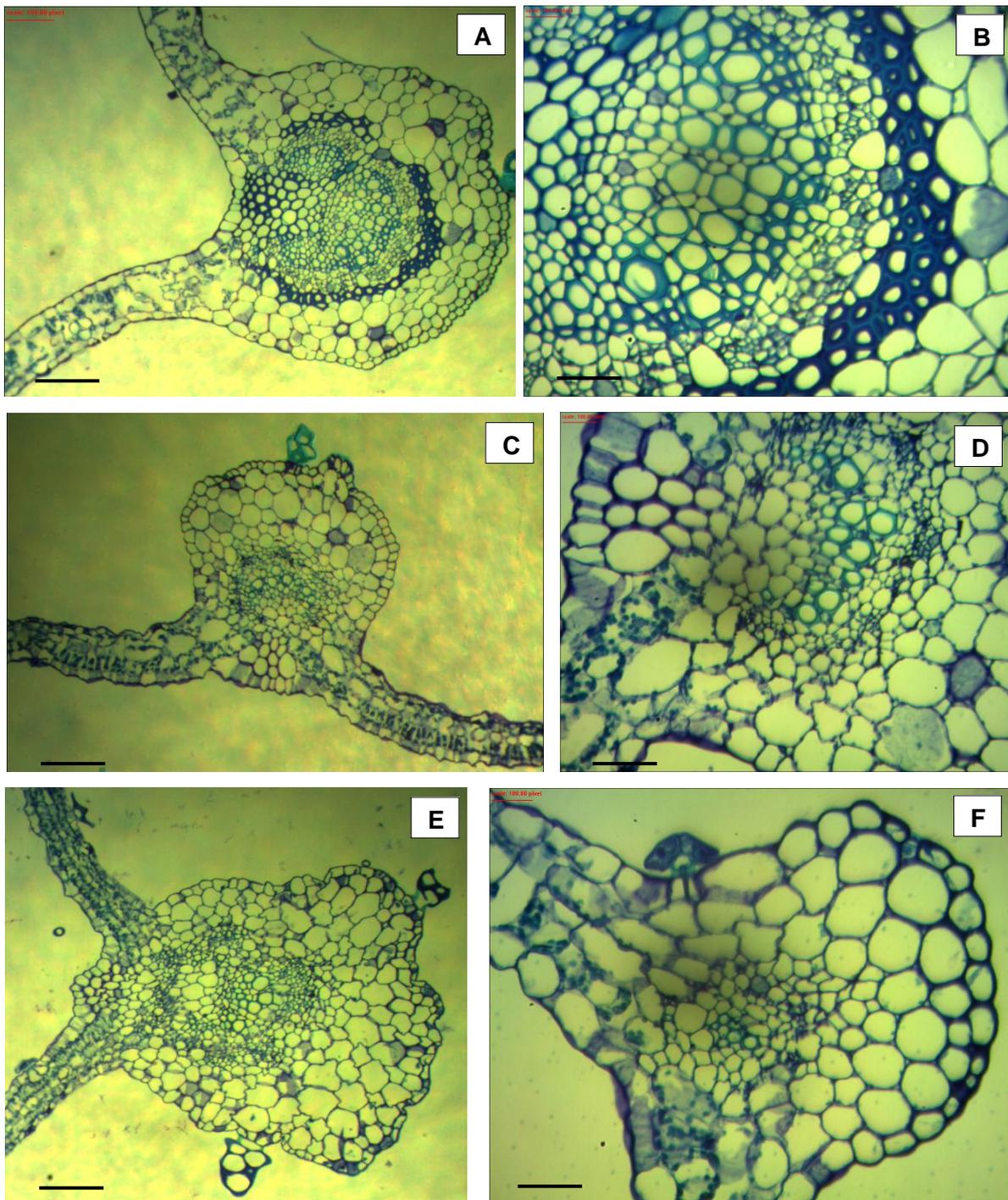


Figura 21 – Secções transversais da nervura central dos tecidos foliares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizado. A) Aspecto geral da nervura central dos tecidos foliares de plantas germinadas *in vivo* (~90 dias); B) Em detalhe a nervura central dos tecidos foliares de plantas germinadas *in vivo*; C) Aspecto geral da nervura central de plantas germinadas *in vitro* (~60 dias); D) Em detalhe nervura central de plantas germinadas *in vitro*; E) Aspecto geral da nervura dos tecidos foliares de plantas aclimatizadas (~40 dias); F) Aspecto geral da nervura central de brotações cultivadas *in vitro* (~120 dias). Barra em A; C, E corresponde a 10 μ m e em B, D, F a 40 μ m. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

Em relação aos diferentes tratamentos *in vitro* a que foram submetidas as brotações de *H. chrysotrichus*, mais especificamente, aos tratamentos de multiplicação e enraizamento, os quais contaram com a presença de fitorreguladores acrescidos ao meio nutritivo, observou-se uma organização estrutural diferenciada entre estes. Da mesma maneira, pode-se, também, perceber esta diferenciação entre os tecidos das folhas que apenas foram cultivadas *in vitro* em meio nutritivo WPM ou $\frac{1}{2}$ WPM. De modo geral, nos tecidos advindos dos ensaios com as citocininas e auxinas, houve a formação de células de tamanhos irregulares e com pouca diferenciação (Figura 22 A e B). Entretanto, essas características foram visualizadas, também, no material mantido *in vitro* a mais de 120 dias e que não foi cultivado na presença de fitorreguladores (Figura 22 C). Por outro lado, os tecidos desenvolvidos em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM durante, aproximadamente, 60 dias de cultivo *in vitro* apresentaram uma estrutura celular mais organizada e diferenciada (Figura 22 D), podendo-se identificar a presença de uma camada de parênquima paliçádico na face adaxial logo abaixo da epiderme, ocorrência que não foi visualizada nas situações a pouco citadas. No entanto, essas características ficam mais evidentes na lâmina foliar do material aclimatizado, que apresentou células mais alongadas e justapostas (Figura 22 E e F). Resultado este bastante interessante, indicando que, possivelmente, durante este período de rustificação, os tecidos de *H. chrysotrichus*, que foram desenvolvidos *in vitro*, estão conseguindo se reestruturar e se adaptar às novas condições impostas. A ocorrência de células paliçádicas mais alongadas é uma característica que constitui um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade luminosa, evidenciando a plasticidade adaptativa dos tecidos vegetais ao novo ambiente (LEE et al., 2000).

Além dos aspectos já mencionados, foi verificada a presença de tricomas glandulares sob a epiderme dos tecidos foliares cultivados *in vitro* e aclimatizados da de *H. chrysotrichus* (Figura 22 C e E). De maneira similar, em estudo anatômico realizado com *Tabebuia serratifolia* (ipê-do-cerrado), foram observados tricomas ao longo da nervura (DOSSEAU et al., 2008). Da mesma maneira, a presença de tricomas, com formas variadas ocorrendo em toda a lâmina foliar, foi relatada em várias espécies do gênero *Handroanthus*, incluindo-se *H. chrysotrichus* (SILVA et al., 2009). Em estudo com *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb (ipê-roxo) e *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. (ipê-amarelo), em que foram analisadas a

morfologia e a anatomia de plântulas, foi verificada a presença de tricomas tectores e glandulares nos cotilédones e folhas dessas espécies (SOUZA; OLIVEIRA, 2004).

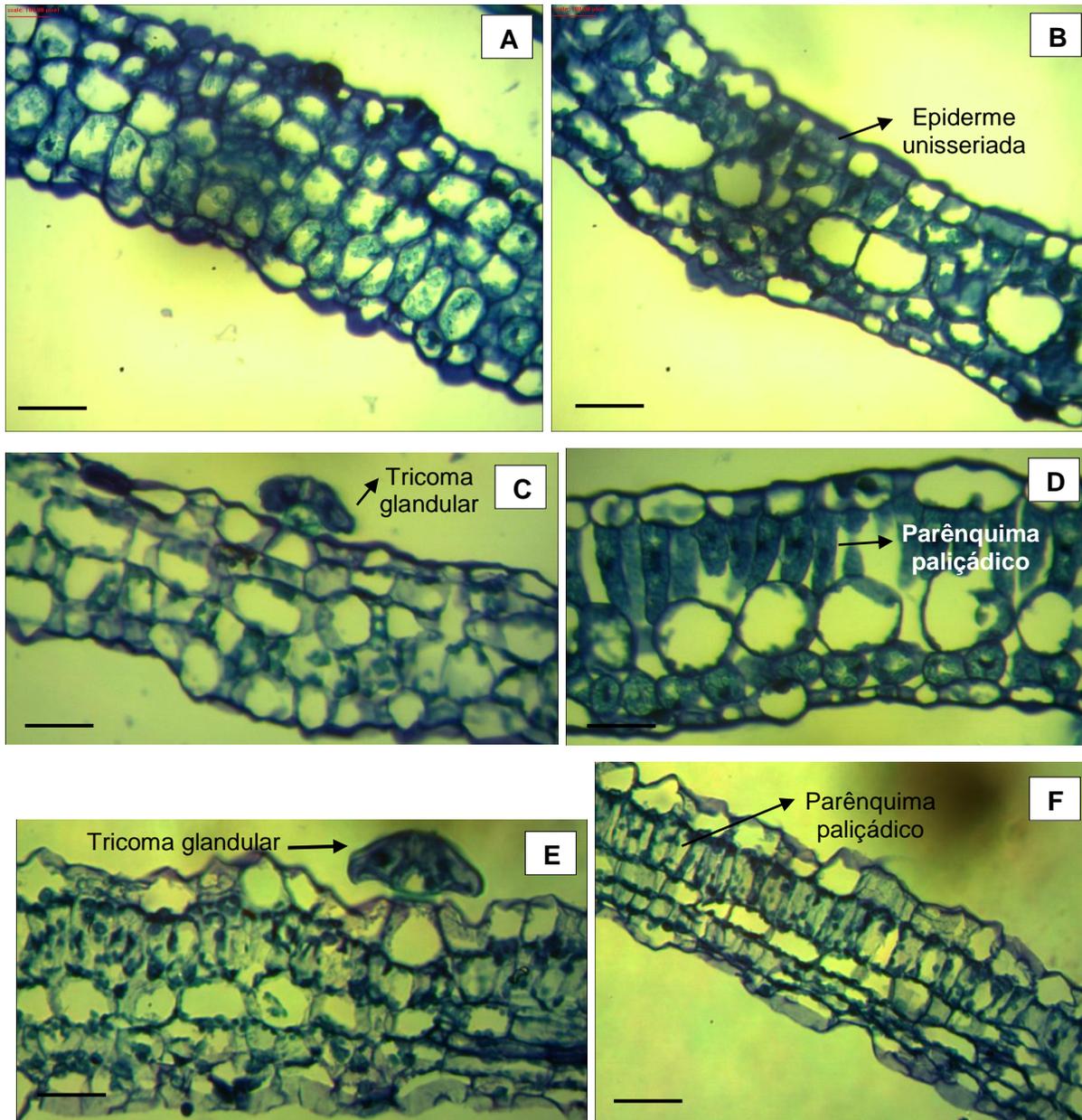


Figura 22 – Secções transversais da lâmina foliar dos tecidos foliares de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), cultivados *in vitro* ou aclimatizados. A) Lâminas foliares de tecidos provenientes dos ensaios de multiplicação *in vitro*, após 40 dias de cultivo; B) Lâmina foliar de tecidos provenientes dos ensaios de enraizamento *in vitro*, após 40 dias de cultivo; C) Lâmina foliar de tecidos cultivados em meio nutritivo WPM, após 120 dias de cultivo *in vitro*; D) Lâmina foliar de tecidos cultivados em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), após 60 dias de cultivo *in vitro*; E) Lâmina foliar e presença de tricoma glandular em tecidos aclimatizados *ex vitro*, após 40 dias; F) Lâmina foliar de tecidos aclimatizados *ex vitro*, após 40 dias. Barra=40µm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013/2014.

7.4 Conclusões

Há diferenças anatômicas nos tecidos cultivados *in vivo*, *in vitro* ou aclimatizados de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos.

Tecidos foliares de *Handroanthus chrysotrichus* desenvolvidos *in vivo* apresentam estrutura anatômica mais organizada e diferenciada que tecidos cultivados em condições *in vitro* ou aclimatizados.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível obter informações relevantes sobre a micropropagação e a anatomia foliar de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, tendo-se em vista que muitos dos resultados observados são inéditos para esta espécie. Além disso, de modo geral, estes resultados podem contribuir com o incremento de informações relativas às espécies florestais nativas do Brasil.

No que diz respeito à micropropagação de *Handroanthus chrysotrichus* foram obtidas médias elevadas para as taxas de multiplicação *in vitro*, especialmente, àquelas estimadas considerando-se a formação *in vitro* de gemas, as quais podem estar associadas à ocorrência de variações somaclonais em subcultivos de *H. chrysotrichus*. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados visando explorar, de modo mais preciso, a provável ocorrência destas variantes nas plantas micropropagadas da espécie em questão.

Em relação aos aspectos ligados à senescência foliar, foi observado que a espécie apresenta um comportamento bastante promissor quanto à duração do período de cultivo *in vitro* em um mesmo meio nutritivo, sendo obtidas elevadas médias de sobrevivência e regeneração *in vitro* até pelo menos 100 dias de cultivo. Adicionalmente, mais de 40% das brotações mantiveram-se vivas após 180 dias de cultivo *in vitro* e com taxas de regeneração estáveis.

Handroanthus chrysotrichus também apresentou elevado potencial durante a fase de enraizamento *in vitro*, sendo atingida uma média superior a 50% de brotações enraizadas, resultado bastante promissor para uma espécie lenhosa. Entretanto, mais estudos devem ser executados visando otimizar as porcentagens de rizogênese *in vitro*, bem como estudos direcionados a buscar melhorias no desenvolvimento qualitativo do sistema radicular formado nas condições *in vitro*. Aliado a isso, recomendam-se estudos adicionais quanto à aclimatização *ex vitro* do material vegetal micropropagado, tendo em vista que esta fase não foi superada de maneira satisfatória, no presente estudo, com esta espécie.

E por fim, os estudos de anatomia foliar forneceram informações importantes, que indicam a ocorrência de diferenças anatômicas entre os tecidos vegetais de *Handroanthus chrysotrichus*, cultivados em diferentes ambientes (*in vivo*, *in vitro* ou

aclimatizado). Este estudo teve um caráter mais exploratório, haja vista que são poucos os relatos referentes a estes aspectos para a presente espécie. Contudo, sugerem-se que mais pesquisas, aliando os estudos de anatomia vegetal e a micropropagação, sejam realizados objetivando obter informações mais precisas a esse respeito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. C. et al. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biologic Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.

ALMEIDA, L. V. de. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2012.

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

ANDRADE, F. H. N. de et al. Tempo de redução de exposição ao thidiazuron na organogênese *in vitro* de mamoeiro. In: Congresso Brasileiro de Mamona V; Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, II e I Fórum Capixaba de pinhão manso, Guarapari. Desafios e oportunidades: **Anais...** Campina Grande: Embrapa algodão, p. 43, 2012.

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

ANDRADE, W. F. et al. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação e interesse ecológico. 2. ed. Porto Alegre: Pallotti, 2002. 326 p.

BANDEIRA, J. de M. et al. Rooting and acclimatization of the Japanese plum tree, cv. América. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 2, p. 597-603, 2012.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustred genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 241 p.

BARRIA, M. J. Etileno em plantas superiores: Síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L. P. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 01, p. 102-125, 2005.

BARRUETO CID et al. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, NL, v. 56, p. 17-23, 1999.

BARRUETO CID, L. P. Citocininas em plantas superiores: Síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L. P. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, p. 58-79, 2005.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, p. 51-66, 2010.

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

BENNETT, I. J. et al. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v. 74, p. 53-58, 1994.

BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciencia Agrotécnica**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R. de C.; MARTINS CORDER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 28, n. 4, p. 493-498, 2004.

BORGES, S. R. et al. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.

BORGO, M.; PETEAN, M. P.; HOFFMANN, P. M. *Handroanthus chrysotrichus* – Ipê-amarelo. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília-DF, 936p., 2011.

BOTELHO, L. da S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para plântulas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009, 365p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservação-e-promoção-da-diversidade-genética/plantas-para-o-futuro>> Acesso em: 03 jun, 2014.

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

CABEL, S. R. **Micropropagação de cinamomo (*Melia azedarach* L.)**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CABRAL, E. L., BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook. F. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 340-345.

CALVETE, E. O. et al. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.

CALVETE, J. J. et al. Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. **Proteome Res.**, v. 8, p. 3055–3067, 2009.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. de. Microrganismos assintomáticos do cultivo *in vitro*: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 221-260, 2010.

CANDIDO, D. F. **Cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert: Multiplicação, senescência foliar e calogênese.** 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

CARVALHO, A. C. P. P. de et al. Panormama da microrpropagação no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais. In: JUNGHANS, T. C.; SOUZA, A. da S. **Aspectos práticos da microrpropagação de plantas.** Cruz das Palmas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 13-42, 2009.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p. 7-14, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 3, 1. ed., 2008. 593p.

CHAGAS JÚNIOR, J. M. das; CARVALHO, D. A. de; MANSANARES, M. E. A família Binoniaceae Juss (ipês) no município de Lavras, Minas Gerais. **Cerne**, v. 16, n. 4, p. 517-529, 2010.

CHENNA, P. H. et al. Preparation and cytotoxicity toward cancer cells of mono (arylimino) derivatives of α -lapachone. **Journal Medical Chemistry**, v. 44, p. 2486-2489, 2001.

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

CORDEIRO, M. C. R. O diagnóstico molecular aplicado à cultura de tecidos vegetais. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, p. 235-246, 2010.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido.** 1993. 113f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, SP, 1993.

CURTI, A. R. **Contribuições para a microrpropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.** 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)– Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.

CURTI, A. R. **Formação de raízes em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.** 2014. 130 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 314-320, 2014.

CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DEGAN, P. et al. Influência de método de secagem de sementes de Ipê branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 92-496, 2001.

DOSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.

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

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: Efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 293-295, 2002.

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

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** 2. ed. Pelotas: UFPEL, 1995. 178 p.

FANTINEL, V. S.; OLIVEIRA, L. M. de; MUNIZ, M. F.B.; ROCHA, E. C. da. Detecção de fungos e transmissão de *Alternaria alternata* via sementes de ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 7, n. 2, 2013.

- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke A. C. Smith – Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.
- FERMINO JUNIOR, P. C.; NAGAO, E. O.; SCHERWIAMI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.
- FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. SISVAR versão 5.1. Lavras: UFLA, 2006. (Software). www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989, 570p.
- FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo – *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nilchols. **Informativo técnico rede de sementes da Amazônia**, n. 5, p. 1-3, 2004.
- FERREIRA, R. A., et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. envelhecidas artificialmente. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 1, p. 82-86, 2004.
- FLÔRES, A. V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) em função das concentrações do meio MS. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 4, p. 549-553, 2011.
- FLÔRES, A. V. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. Dissertação de mestrado. 73f. 2007. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.
- FLÔRES, A. V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.
- FRÁGUAS, C. B., PASQUAL, M., PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: Efeito de cinetina e do ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica. Monograph**, v. 25, 1992, 370p.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae, Part I. Tribes Crescentieae and Tourrettieae. **Flora Neotropica Monograph**, v. 25, 1980, 130p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. 2 vol. Edington: Exegetics, 1993.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v. 18, p. 115-135. 2004.

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

GOLLE, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2013.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

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: SPI/Embrapa – CNPH, v. 1, p. 183-230, 1998.

GROSE, S. O; OLMSTEAD, R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, v. 32, n. 3, p. 660-670, 2007.

GUTIÉRREZ, I. E. M. de et al. Multiplicação *in vitro* de *Tairira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 143-151, 2013.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 105-120, 2006.

HINOJOSA, G. F. Auxina em plantas superiores: Síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L. P. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, p. 58-79, 2005.

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

KAGEYAMA, P. Y.; MARQUEZ, F. C. M. Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial (gênero *Tabebuia*). **Circular Técnica**, n. 126, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1981.

KEVERS, C. et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 77, p. 181-191, 2004.

LAZAROTTO, M. et al. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, 2012.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604-607, 2002.

LEE, D. W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

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 Agrotécnica**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.

LE MOS, E. E. P. de. Organogênese. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, p. 103-127, 2010.

LEÓN, E. A. B. **Qualidade de sementes, micropropagação, conservação *in vitro* e isolamento de DNA genômico de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.** 2014. 207 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

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

LIMA, V. V. F. de et al.. Germinação de espécies arbóreas de floresta estacional decidual do vale do rio Paraná em Goiás após três tipos de armazenamento por até 15 meses. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 89-97, 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

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

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. São Paulo, Instituto Plantarum, v. 1, 2008, 61p.

MACIEL, C. G. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos (ipê-amarelo). In: 4º Congresso Florestal Paranaense. **Anais...** Curitiba-PR, 2012.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios da biotecnologia em plantas**: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 344 p., 1994.

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

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. Respostas morfogênicas em explantes foliares de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 3, p. 269-272, 2000.

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

MARTINS, J. P. R. et al. Alterações na anatomia caulinar de ipê-amarelo em diferentes condições de pré-aclimatização em tubos de ensaio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 7, n. 3, p. 502-507, 2012.

MARTINS, L.; LAGO, A. A. do; CÍCERO, S. M. Conservação de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande – PB, v. 16, n. 1, p. 108-112, 2012.

MÁXIMO, W. P. F. et al.. Influência da cinetina na multiplicação *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus* Mattos. In: XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA. **Anais...** Lavras-MG, 2010.

MORI, N. T. **Variabilidade genética entre e dentro de subpopulações de ipê-roxo *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos e seu sistema reprodutivo.** 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010.

MORALES, C. F. G. et al. Efeito de BAP e TDZ na calogênese e orgaogênese em internódios de macieira cv. gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, 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.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requiremen of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. p. 1155-1169.

NASCIMENTO, A. da C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. Micropropagação de Uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): Efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde**. Mossoró-RN. v. 3, n. 2, p. 20-26, 2008.

NENARTAVIS, E. G. **Estudos sobre indução, manutenção e estabilidade genética na calogênese *in vitro* de *Caesalpinea echinata* Lam. (pau-brasil).** 2010. 82 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

NEVES, G. et al.. Viabilidade e longevidade de sementes de *Tabebuia aurea* Benth. & Hook. submetidas a diferentes métodos de armazenamento. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 737-742, 2014.

NICIOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] – Fabaceae.** 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NUÑES, V. et al. Neutralization of edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Brothrops asper* venom by stracts of plants used by healers in Colombia. **Brasilian Journal Medical Biology Research**, v. 37, n. 7, p. 969-977, 2004.

OLIVEIRA, A. K. M. de; SCHELEDER, E. J. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex.DC.) Standl. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 32, n. 6, p. 1011-1018, 2008.

OLIVEIRA, J. P. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Influência genotípica e clonal de genótipos de bananeiras micropropagadas a partir de gemas florais masculinas **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, volume especial, p. 558-563, 2011.

OLIVEIRA, L. M. 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. 25-30, 2007.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLMSTEAD, R. G. et al. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1731-1743. 2009.

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

PACHECO, M. V. et al. Germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook f. ex S. Moore. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 143-150, 2008.

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PARK, B. S. et al. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1152-1157, 2005.

PASA, M. da S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, 2012.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 3, p. 301-305, 1996.

PEREIRA J. E. S.; FORTES G. R. L. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 197-201, 2004.

PEREIRA, P. H.; MANSANO, V. de F. Estudos taxonômicos da tribo Tecomeae (Bignoniaceae) no Parque Nacional do Itatiaia, Brasil. **Rodriguesia**, v. 59, n. 2, p. 265-289, 2008.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: FEALQ, 2009, 451p.

PINTO, F. **Calogênese e indução de gemas axilares em mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 93-98, 2001.

PRADO, M. J. et al. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell, Tissue e Organ Culture**, Dordrecht, v. 103, p. 49-59, 2010.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B. et al. Variações na anatomia foliar de videira Niagara em diferentes sistemas de condução. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p.488-493, 2011.

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

RIBAS, L. L. F. et al. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2003.

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

RIBEIRO, A. P. **Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira**. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ROCHA, H. S. Biofábricas: Estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 121-152, 2009.

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

RODRIGUES, M. **Morfogênese *in vitro*, análise fitoquímica e caracterização anatômica de nim (*Azadirachta indica* A. Juss)**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, MG, 2009.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROGALSKI, M., GUERRA, M. P., SILVA, A. L. da. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'santa rosa: efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

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

ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Propagação *in vitro* da farinha-seca. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 45-52, 2013.

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

SANTOS, A. F. dos; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Revista Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 119-128, 2000.

SANTOS, B. R.; et al. Micropropagação de Pequi (*Caryocar basiliense* Camb.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SANTOS, D. C.; WENDLING, I.; GROSSI, F. Efeito de diferentes combinações de fitorreguladores e vitaminas no desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* de *Grevillea robusta* Cunn. **Comunicado técnico**, Colombo - PR, p. 1-6, 2004.

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

SCHOTTZ, E. de S. et al. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) from juvenile shoots. **Ciência Florestal**, v. 17, p. 109-117, 2007.

SCHUCH, M. W. et al. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar clímax. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.

SCHUCK, M. R. et al. Aclimatização de plantas micropropagadas de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) em diferentes substratos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 206-212, 2012.

SILVA, A. L. da et al. Aclimatização de clones de *Dickya maritima* em diferentes substratos – Bromeliaceae. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 495-498, 2006.

SILVA, A. M. L. da et al. Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês. **Hoehnea**, v. 36, n. 2, p. 329-338, 2009.

SILVA, C. V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-221, 2003.

SILVA, M. M. da; QUEIROZ, L. P. de. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1/2, p. 3-21, 2003.

SILVA, P. P. da et al. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 6, p. 437-443, 2010.

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

SILVA, T. dos S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, p. 1-6, 2014.

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

SOARES, F. P. et al. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.

SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003.

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

SOUZA, L. A. de; OLIVEIRA, J. H. G. de. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb e *T. chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). **Acta Scientiarum. Biologic Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 217-226, 2004.

SOUZA, V. C. de; et al. Produção de mudas de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Agropecuária Técnica**. Areia, PB - CCA/UFPB, v. 26, n. 2, p. 98-108, 2005.

SOUZA, V. C. et al.. Sanidade de sementes armazenadas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich.. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes. **Palestras e resumos...** João Pessoa-PB, p. 235, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 574 p.

STORCK, L.; FILHO, A. C.; LÚCIO, A. D.; MISSIO, E. L.; RUBIN, S. de A. L. Avaliação da precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 572-578, 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. Brasília, 2005.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, n.6, p.618- 631, 2008.

TREVIZAN, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. 192f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2005.

ULISSES, C. et al. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 86-91, 2010.

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

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. da. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 64-70, 2013.

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

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. Colombo: Embrapa Florestas. **Documentos 130**, Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2006, 54p.

WETZEL, M. M. V. da S. Fungos do armazenamento. In: SOAVE, J. E WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 2004. Cap. 9, p. 260-274.

WIELEWICKI, A. P. et al. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 191-197, 2006.

WIELEWSKI, P. **Patologias em *Tabebuia chrysotricha* (Mart ex DC.) Standl (ipê-amarelo) Bignoniaceae em Curitiba-PR**. 2001. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

WIELEWSKI, P.; AUER, C. G.; JUNIOR, A. G. Levantamento de doenças de ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha*) em Curitiba-PR. **Revista Floresta**, v. 32, n. 2, p. 277-281, 2002.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

ZIV, M. Quality of micropropagated plants: vitrification. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 27, p. 64-69, 1991.