

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

**CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE
Eugenia involucrata DC. E *Handroanthus
chrysotrichus* (MART. ex DC) MATTOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Ferreira Paim

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE
Eugenia involucrata DC. E *Handroanthus chrysotrichus*
(MART. ex DC) MATTOS**

Aline Ferreira Paim

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

Orientadora: Profa. Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS, Brasil

2011

P143c Paim, Aline Ferreira
Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. e
Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC) Mattos / por Aline Ferreira Paim.– 2011.
79 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Lia Rejane Silveira Reiniger
Coorientador: Maristela Machado Araujo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2011

1. Espécies florestais 2. Silvicultura 3. Auxinas 4. Citocininas 5.
Segmentos nodais 6. Segmento apical caulinar 7. Epicótilo 8.
Multiplicação *in vitro* I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II. Araujo, Maristela
Machado III. Título.

CDU 630.232

Ficha catalográfica elaborada por Simone G. Maisonave – CRB 10/1733

Biblioteca Central UFSM

Revisão de Português: Melissa Heberle

©2011

Todos os direitos autorais reservados a Aline Ferreira Paim. A reprodução de partes ou do
todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Avenida Roraima, nº 1000, prédio 77, sala 36. Santa Maria, RS, Brasil, CEP:
97105-900;

Endereço Eletrônico: 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 Dissertação de Mestrado**

**CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE
Eugenia involucrata DC. E *Handroanthus chrysotrichus*
(MART. ex DC) MATTOS**

elaborada por
Aline Ferreira Paim

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dra.
(Presidente/Orientador)

Rejane Flores, Dra. (IF Farroupilha)

Maristela Machado Araujo, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 18 de julho de 2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Ana e aos meus avós Ana Carolina e Jango (*in memoriam*), pelos maiores bens que poderiam me conceder: o amor e o estudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por tudo que tenho de bom e pela felicidade de ter vencido mais uma etapa!

A minha mãe Ana, exemplo de mulher forte e batalhadora, pelo amor e carinho incondicionais e por todos os esforços para que eu alcançasse meus objetivos e realizasse meus sonhos. Tudo que já conquistei foi porque você estava ao meu lado!

Aos meus avós, Ana Carolina e Jango (*in memoriam*), pelo amor, carinho, conselhos, orações e todo o apoio. Vozinho, onde quer que tu estejas, muito obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, Naiara e Guilherme, pelo incentivo, carinho e por sempre estarem ao meu lado, tornando minha vida mais alegre.

Ao Lourenço, pelo amor, compreensão e paciência em todos os momentos. Pela força e otimismo, pelos anos de convivência e por todos os momentos de felicidade!

A minha orientadora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela grande oportunidade de realização deste trabalho; por todo conhecimento, tempo e carinho a mim dedicados. Pelo esforço diário para atender as aspirações minhas e de meus colegas, para que atingíssemos nossos objetivos; pelo exemplo de mulher forte e profissional competéssima. Lia, muito obrigada por tudo, mas em especial pela tua amizade!

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

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

À colega Aline Ritter Curti, pela amizade de anos, pelo carinho e pelo companheirismo em todos os momentos, por estar sempre disposta a ajudar e, em especial, pela imensa colaboração na execução deste trabalho. Também pelo conhecimento compartilhado, pelas horas e horas de conversas, nem sempre relacionadas ao estudo, e pelo simples fato de ser quem é!

Ao colega Enrique Asterio Benitez León, que também não mediu esforços para colaborar na execução do meu trabalho. Pelos conselhos e conhecimento compartilhados, muitas vezes através do “MSN”; pelas conversas regadas a muitas risadas, mas, principalmente, pela amizade e pelo carinho!

Aos colegas de Laboratório, Danieli, Iana, Caroline, Marta, Márcio, Mariane, Leonardo e Franciele, pela ajuda, conversas, convivência e amizade.

Ao professor Dr. Diego Pascoal Golle, pela colaboração, pelas dicas e amizade!

À Tita, secretária do PPGEF, por toda ajuda e esclarecimento prestados, mas principalmente pelo carinho, amizade e paciência!

Aos meus amigos de todas as horas: Lúcio, Lílian, Camila, Clair, Kelen, Gabriele, Fabiano, Cristiane, Bruna e Lívia, pelo incentivo e apoio, alguns à distância; sobretudo por me deixarem fazer parte de suas vidas!

A todos que torceram e acreditaram em mim e que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Nunca serei grata o suficiente em relação a todos vocês.

Mesmo assim, muito obrigada!

“Ando devagar porque já tive pressa,
E levo esse sorriso, porque já chorei demais,
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou
Nada sei...”

(Almir Sater)

RESUMO

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

CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE *Eugenia involucrata* DC. E *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

AUTORA: ALINE FERREIRA PAIM

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de julho 2011.

Eugenia involucrata DC. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos são espécies florestais nativas com importância econômica, silvicultural e ecológica. Possuem problemas quanto a sua propagação via sementes, pois estas são recalcitrantes, perdendo a viabilidade em poucas semanas após a coleta. Além disso, existem poucas informações sobre a propagação vegetativa dessas espécies. Considerado o exposto, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar metodologias que possam contribuir para a micropropagação *in vitro* de *E. involucrata* e de *H. chrysotrichus*. Para a multiplicação de *E. involucrata* foram testadas diferentes fontes (BAP, CIN, TDZ e 2iP) e concentrações (0; 16 e 32 μM) de citocininas adicionadas ao meio nutritivo MS/2. Também foi testado o efeito de TDZ (16 e 32 μM) combinado a GA₃ (0; 10; 20 e 40 μM), acrescentados em meio MS/2, na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais. Ainda para *E. involucrata*, foi avaliado o efeito de ANA (0; 0,5 e 1 μM) combinado a TDZ (0; 16 e 32 μM), acrescentados ao meio MS/2. Por fim, para esta espécie, testou-se o efeito de diferentes concentrações de TDZ (0; 16 e 32 μM) adicionadas ao meio MS/2, na multiplicação de segmentos apicais caulinares obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Para *H. chrysotrichus*, foram testados diferentes tipos de explantes (segmento apical caulinar e epicótilo) e meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2), na presença e ausência de carvão ativado, bem como o efeito de BAP (0; 2; 4; 8 e 16 μM) na multiplicação *in vitro* dessa espécie. Para multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata*, as citocininas testadas são dispensáveis, uma vez que favorecem o crescimento de contaminação bacteriana. Elevados índices de contaminação acarretam reduzida sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais; o estabelecimento *in vitro* para essa espécie é comprometido pela ocorrência de clorose foliar e intumescimento dos explantes. Já para *H. chrysotrichus*, o segmento apical caulinar apresenta desenvolvimento superior ao do epicótilo na sobrevivência e no estabelecimento *in vitro*; há elevado intumescimento *in vitro* dos explantes na ausência de fitorreguladores. No estabelecimento *in vitro* em meio WPM/2 na presença de 0,05 μM de ANA, os segmentos apicais caulinares são mais eficientes sob concentrações reduzidas de BAP; há maior calogênese em epicótilos à medida que aumenta a concentração de BAP, ocorrendo o contrário para o segmento apical caulinar.

Palavras-chave: auxinas; citocininas; segmentos nodais; segmento apical caulinar; epicótilo; multiplicação *in vitro*.

ABSTRACT

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

CONTRIBUTIONS TO MICROPROPAGATION OF *Eugenia involucrata* DC. AND *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

AUTHOR: ALINE FERREIRA PAIM

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, July 18, 2011

Eugenia involucrata DC. and *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos are native species with economic, ecological and silvicultural. They have problems with their spread via seeds, because they are recalcitrant and lose viability within a few weeks after collection. In addition, there is little information about the propagation of these species. Therefore, the general objective of this study was to evaluate methodologies which may contribute to micropropagation of *E. involucrata* and *H. chrysotrichus*. For multiplication of *E. involucrata* were tested different sources (BAP, KIN, 2iP and TDZ) and concentrations (0, 16 and 32 μM) of cytokinins added to the nutrient medium MS/2. Also, we tested the effect of TDZ (16 or 32 μM) combined with GA₃ (0; 10; 20 and 40 μM) added in medium MS/2, on *in vitro* multiplication of nodal segments. Even for *E. involucrata*, we examined the effect of NAA (0; 0,5 and 1 μM) combined with TDZ (0; 16 and 32 μM), added to the medium MS/2. Finally, for *E. involucrata*, we tested the effect of different concentrations of TDZ (0; 16 and 32 μM) added to the nutrient medium MS/2, on the multiplication of shoot apices of seedlings germinated *in vitro*. For *H. chrysotrichus* were tested different types of explants (shoot apical segments and epicotyl) and nutrient media (WPM, MS, WPM/2 and MS/2) in the presence and absence of activated charcoal as well as the effect of BAP (0; 2; 4; 8 and 16 μM) on *in vitro* multiplication of this species. For *in vitro* multiplication of nodal segments of *E. involucrata* the cytokinins tested are dispensable; cytokinins favor the growth of bacterial contamination, high levels of contamination reduce *in vitro* survival and establishment of nodal segments; the *in vitro* establishment for this species is impaired by the occurrence of leaf chlorosis and swelling of the explants. As for *H. chrysotrichus*, the shoot apical segments show the highest development in the *in vitro* survival and establishment than of epicotyl; there is a high *in vitro* swelling of the explants in the absence of growth regulators; in the *in vitro* establishment in medium WPM/2 in the presence of 0,05 μM shoot apical segments are more efficient under low concentrations of BAP; there is greater calli formation in epicotyl with increase the concentration of BAP, the opposite was true for the shoot apical segment.

Keywords: Auxins. Cytokinins. Nodal segments. Shoot apical segment. Epicotyl. *In vitro* multiplication.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A) Plantas doadoras de explantes de *Eugenia involucrata* DC., de 5 a 6 anos de idade, mantidas em casa de vegetação. B) Brotações jovens coletadas para posterior isolamento dos segmentos nodais. Santa Maria, RS, UFSM, 201127
- Figura 2 – A) Plântulas germinadas *in vitro* a partir de sementes de *Eugenia involucrata* DC. B) Segmentos apicais caulinares em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2). Linha vertical = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 201134
- Figura 3 – Segmento nodal de *Eugenia involucrata* DC. estabelecido *in vitro*, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocininas. Linha vertical = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 201137
- Figura 4 – Tipos de explantes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos utilizados nos ensaios de multiplicação *in vitro*. A) Plântula germinada *in vitro*, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), após 20 dias de cultivo. B) Cortes realizados para isolar o segmento apical caulinar e o epicótilo. Santa Maria, RS, UFSM, 2011 52
- Figura 5 – Aspecto de epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, que apresentaram intumescimento *in vitro* aos 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS. Em detalhe, o princípio de desenvolvimento das gemas preexistentes nos explantes. Linha vertical = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2011 61
- Figura 6 – Estabelecimento *in vitro* (%) de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP (μM) e 0,05 μM de ANA . Santa Maria, RS, UFSM, 2011 66
- Figura 7 – Formação de calos (%) em segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP (μM) e 0,05 μM de ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2011 68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Médias de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., após 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.....35
- Tabela 2 – Médias de contaminação bacteriana de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.....38
- Tabela 3 – Médias de intumescimento de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.....39
- Tabela 4 – Médias de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* que emitiram brotações e número de brotos por segmento nodal (NºB/EXP) de *Eugenia involucrata* DC., após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 201140
- Tabela 5 – Médias de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. que apresentaram contaminação fúngica, em porcentagem, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de ANA e de TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 201144
- Tabela 6 – Médias de segmentos apicais caulinares de *Eugenia involucrata* DC. que apresentaram oxidação fenólica, em porcentagem, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de 0; 16 ou 32 µm de TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 201147

- Tabela 7 – Médias de sobrevivência (%SOBR), de estabelecimento *in vitro* (%ESTAB) e de número de folhas por explante (N^oF/E) em segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, aos 30 dias de cultivo, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2) acrescidos de carvão ativado. Santa Maria, RS, UFSM, 201158
- Tabela 8 – Médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, em porcentagem, de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2). Santa Maria, RS, UFSM, 201160
- Tabela 9 – Médias de oxidação fenólica e clorose foliar, em porcentagem, de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2). Santa Maria, RS, UFSM, 201163
- Tabela 10 – Médias de número de brotos por explante (N^oB/E), número de explantes que emitiram brotações (N^oEEB) e número de folhas por explante (N^oF/E) em segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2). Santa Maria, RS, UFSM, 201164

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981).....	79
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Descrição das espécies	18
2.1.1 <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	18
2.1.2 <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC) Mattos.....	20
2.2 Cultura de tecidos - Micropropagação	21
2.3 Meios nutritivos	22
2.4 Reguladores de crescimento	23
3 CAPÍTULO I	26
MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Eugenia involucrata</i> DC	26
3.1 Objetivo	26
3.2 Material e Métodos	26
3.2.1 Desinfestação superficial e obtenção dos explantes.....	26
3.2.2 Efeito de diferentes fontes de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	28
3.2.3 Efeito de TDZ e GA ₃ na multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	30
3.2.4 Efeito de ANA combinada a TDZ na multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	31
3.2.5 Efeito de TDZ na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares de origem seminal de <i>E. involucrata</i>	33
3.3 Resultados e discussão	35
3.3.1 Efeito de diferentes fontes de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>E. involucrata</i>	35
3.3.2 Efeito de TDZ e GA ₃ na multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>E. involucrata</i> ..	43
3.3.3 Efeito de ANA combinada a TDZ na multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>E. involucrata</i>	44

3.3.4 Efeito de TDZ na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares de origem seminal de <i>E. involucrata</i>	47
3.4 Conclusões	49
4 CAPITULO II	51
MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (MART. ex DC) MATTOS	51
4.1 Objetivo	51
4.2 Material e Métodos	51
4.2.1 Obtenção do explantes.....	52
4.2.2 Efeito dos diferentes meios nutritivos acrescidos de carvão ativado no estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares e epicótilos de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC) Mattos.....	52
4.2.3 Efeito dos diferentes meios nutritivos no estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares e epicótilos de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC) Mattos	55
4.2.4 Efeito de BAP na multiplicação de segmentos apicais caulinares e epicótilos de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC) Mattos.....	56
4.3 Resultados e discussão	58
4.3.1 Efeito dos diferentes meios nutritivos acrescidos de carvão ativado na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares e epicótilos de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC) Mattos	58
4.3.2 Efeito de diferentes meios nutritivos no estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos apicais caulinares e epicótilos de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC) Mattos	61
4.3.3 Efeito de BAP na multiplicação de segmentos apicais caulinares e epicótilos de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	66
4.4 Conclusões	71
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO	80

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal cada vez mais vem ocupando lugar de destaque na economia brasileira. São crescentes os investimentos em pesquisas nesta área, visando ao desenvolvimento de tecnologias que atendam às necessidades da cadeia produtiva de maneira mais rápida, econômica e sustentável.

Os estudos podem ser desenvolvidos em diversas áreas do conhecimento científico para atingir esses objetivos, entre as quais se pode destacar a do melhoramento genético florestal, que possui um amplo leque de alternativas que podem contribuir significativamente no incremento da atividade silvícola relacionada a espécies exóticas e nativas. Nesse contexto, a biotecnologia pode ser utilizada para a obtenção de ganhos em produtividade e sustentabilidade, frente à excessiva demanda por produtos oriundos de espécies florestais. A cultura de tecidos, em particular, constitui-se em ferramenta de grande impacto, em meio às técnicas biotecnológicas que, muitas vezes, fornecem alternativas, e até mesmo soluções únicas, em determinadas situações.

A micropropagação, por sua vez, sobressai-se entre as demais técnicas de cultura de tecidos, pela importância na multiplicação e na conservação *ex situ* de muitas espécies florestais, principalmente naquelas com sementes recalcitrantes. Entretanto, as espécies lenhosas requerem o desenvolvimento de estudos específicos, que assegurem o desenvolvimento de metodologias eficientes, as quais possam garantir a superioridade dos indivíduos obtidos pela cultura de tecidos.

Um caso bastante frequente no estudo de espécies arbóreas é a perda da viabilidade das sementes pouco tempo após sua coleta, comumente observada em muitas espécies nativas, como *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos (Ipê-amarelo). Em consequência, a micropropagação emerge como 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. Entretanto, ainda não se tem informações suficientes referentes às técnicas de propagação vegetativa visando à obtenção de mudas de qualidade das espécies em questão.

Para *Eugenia involucrata*, já foram realizados alguns ensaios, por Golle (2010), sendo obtidas informações relacionadas ao estabelecimento, multiplicação, calogênese e organogênese *in vitro*. Contudo, em relação a *Handroanthus chrysotrichus*, não há estudos realizados.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar o comportamento *in vitro* dessas espécies, com relação ao uso de diferentes tipos de explante, meios nutritivos, fontes e concentrações de fitorreguladores no estabelecimento e multiplicação *in vitro*.

O trabalho está dividido em dois capítulos, organizados de acordo com a fase do cultivo *in vitro* e os fatores que foram estudados, a saber:

- no capítulo I foi avaliado o efeito de diferentes fontes e concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eugenia involucrata*. Foi testado o efeito da auxina Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA) combinada a Thidiazuron (TDZ) ou a Ácido Giberélico (GA₃). Adicionalmente, foi avaliado o efeito de TDZ na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares isolados de plântulas provenientes de germinação *in vitro*;

- no capítulo II foi avaliado o efeito de diferentes tipos de explantes e meios nutritivos, na presença e ausência de carvão ativado, no estabelecimento *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus*, bem como o uso de 6- Benzilaminopurina (BAP) e ANA na multiplicação *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição das espécies

2.1.1 *Eugenia involucrata* DC.

Eugenia involucrata, popularmente conhecida como Cerejeira, Cerejeira-do-mato, Cerejeira-da-terra ou Cerejeira-do-rio-grande, pertence à família Myrtaceae. Esta inclui cerca de 140 gêneros e mais de 3000 espécies, sendo a América tropical e Austrália seus dois principais centros de dispersão (JOLY, 1993; RIBEIRO, 1999; SILVA et al., 2003; SILVA, et al., 2005). Tem ocorrência natural em vários estados brasileiros e países da América do Sul, sendo amplamente encontrada na floresta semidecídua de altitude (LORENZI, 1992).

Dentre todos os gêneros da família Myrtaceae que englobam espécies frutíferas, apenas quatro gêneros (*Myrciaria*, *Acca*, *Psidium* e *Eugenia*) têm importância econômica (MANICA, 2002). O gênero *Eugenia*, em particular, está entre os mais importantes, com espécies de valor comercial, nutritivo e potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos (DONADIO, 1997; SILVA et al., 2003).

A espécie *E. involucrata* tem potencial para aproveitamento comercial, e seu fruto pode ser consumido *in natura* ou utilizado para o processamento na forma de doces, geleias, licores, sucos e, ainda, pode ser usada na produção de mel. Também é considerada uma espécie com características rústicas, ornamentais e com boa formação de copa, podendo ser utilizada no paisagismo, principalmente na arborização urbana. Na silvicultura, destacam-se a excelente qualidade e durabilidade de sua madeira, considerada densa e muito resistente. Tem sido utilizada na construção civil, na produção de cabos de ferramentas, para lenha e carvão (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2008).

Além das características silviculturais e econômicas, possui, também, uma importância ecológica, uma vez que é dispersada pela avifauna e adequada à

recuperação de áreas degradadas, possuindo, adicionalmente, propriedades medicinais, como as ações digestiva, antidiarreica e antirreumática (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Algumas espécies dessa família podem, ainda, apresentar elevadas concentrações de compostos fenólicos. Esses compostos possuem propriedades antioxidantes, que podem estar relacionadas com o retardamento do envelhecimento celular e a prevenção de algumas doenças (VELIOGLU et al., 1998).

Muitas espécies de *Eugenia*, a despeito de sua importância ecológica e do potencial de exploração comercial, apresentam baixa densidade de ocorrência. Tal fato dificulta a obtenção de sementes em quantidade que permita a produção de mudas em larga escala, seja para aproveitamento comercial, com o plantio de pomares de produção de frutas, seja para aproveitamento em programas de repovoamento vegetal (SILVA et al., 2005).

Além disso, a espécie apresenta dificuldade em sua propagação, o que representa um obstáculo ao seu aproveitamento econômico, ecológico e silvicultural. Suas sementes são recalcitrantes e não mantêm o potencial germinativo durante o armazenamento, iniciando-se sua inviabilização já nas primeiras semanas, após a coleta (WIELEWICKI et al., 2006; CARVALHO, 2008).

Existem alguns relatos sobre a propagação de *E. involucrata*, através da estaquia e sementes, sendo a segunda forma a mais recomendada (SANCHOTENE, 1989). O cultivo *in vitro* é um método viável para a propagação de diversas espécies frutíferas, podendo ser utilizado também com as espécies nativas, proporcionando uma produção de mudas com alta sanidade, além de acelerar os métodos de propagação convencional (RIBEIRO et al., 2006). Entretanto, os estudos sobre a propagação dessa espécie ainda são incipientes e técnicas de cultura de tecidos poderiam auxiliar na propagação da espécie por clonagem *in vitro* (GOLLE, 2010).

2.1.2 *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

A espécie *Handroanthus chrysotrichus*, conhecida popularmente como Ipê-amarelo, é uma espécie arbórea pertencente à família Bignoniaceae, a qual é composta por cerca de 120 gêneros e 800 espécies. Apresenta distribuição pantropical, com maior número de espécies no Neotrópico; somente poucos táxons ocorrem em regiões temperadas. As espécies dessa família são encontradas em diferentes tipos de ambientes, desde os cerrados abertos até as florestas úmidas e perenifólias (SILVA; QUEIROZ, 2003).

No Brasil são encontrados, aproximadamente, 48 gêneros com diversas espécies distribuídas ao longo de todo o país. O gênero *Handroanthus* ocorre no Brasil, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. No Brasil, pode estender-se desde a Amazônia e o Nordeste até São Paulo.

Trata-se de uma espécie caducifólia, sua folhagem é renovada anualmente; as folhas caem no inverno e aparecem logo após a floração que, normalmente, ocorre no período de julho a outubro. Os frutos amadurecem no período de outubro a dezembro, produzindo grande quantidade de sementes leves e aladas, que são dispersas rapidamente (LORENZI, 1992).

Indivíduos da espécie *H. chrysotrichus* possuem a tendência de crescer retos e sem bifurcações quando plantados em reflorestamento misto combinado com espécies pioneiras (PINTO; RODIGHERI, 2001).

A espécie pode ser amplamente utilizada na arborização urbana e em projeto paisagístico de parques e jardins em função de sua beleza e porte. Além disso, várias espécies do gênero *Handroanthus* desempenham importante papel na natureza, com suas flores melíferas suprimindo as necessidades de insetos, aves e até mesmo de primatas e ungulados. Também se trata de uma espécie que costuma povoar as beiras dos rios, sendo, portanto, indicada para recomposição de matas ciliares, áreas degradadas e de preservação permanente (LORENZI, 1992).

A madeira é pesada, muito dura e resistente ao apodrecimento e ao ataque de fungos e cupins, podendo ser usada para fins mais nobres, como serraria, laminação, indústria moveleira, entre outros (SOUZA et al., 2005a).

Em geral, as espécies desse gênero produzem grande quantidade de sementes leves, aladas, com pequenas reservas, e que perdem a viabilidade em poucos dias após a sua coleta, sendo consideradas recalcitrantes. A curta longevidade natural das sementes *H. chrysotrichus* está ligada à pequena quantidade de substâncias de reserva armazenadas na semente e ao elevado teor de óleo em sua composição química. Adicionalmente, ocorrem anos com baixa ou nenhuma produção de sementes, o que limita a dispersão natural da espécie, bem como sua utilização em viveiros para reflorestamento e comércio de mudas (SOUZA et al., 2005b).

2.2 Cultura de tecidos - Micropropagação

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como a manutenção, propagação e regeneração de certas partes da planta (células ou tecidos) em ambiente asséptico e em condições controladas (*in vitro*), constituindo uma das áreas de maior êxito da biotecnologia vegetal (MROGINSKI et al., 2004).

As técnicas de cultura de tecidos vêm sendo utilizadas de diferentes formas para o desenvolvimento de cultivares superiores de plantas (GOLLE et al., 2009). Dentre estas, a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Tem especial destaque porque pode permitir a manutenção e multiplicação rápida de mudas, a partir de um genótipo superior, em períodos de tempo e espaço físico reduzido, além de assegurar um material livre de patógenos (SARTORETTO et al., 2008). A micropropagação é uma ferramenta que tem sua aplicabilidade baseada na teoria da totipotência celular, a qual estabelece, a qualquer parte do vegetal, potencial para regenerar os órgãos que lhe faltam, desde que sejam fornecidas as condições adequadas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de grande número de variáveis, tais como antecedentes genéticos, tipos de tecidos ou explantes, componentes nutricionais, reguladores de crescimento e ambientes de

cultivo (GIRI et al., 2004). Uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as exigências para seu cultivo *in vitro* também tendem a serem únicas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.3 Meios nutritivos

Os meios nutritivos podem ser definidos como uma formulação de sais inorgânicos e componentes orgânicos necessários para nutrição e manutenção dos cultivos *in vitro*. Basicamente, os meios nutritivos são compostos de uma fonte de carbono, nutrientes minerais (macro e micronutrientes), vitaminas, substâncias reguladoras de crescimento e agentes gelificantes (MROGINSKI et al., 2004).

Os meios nutritivos são utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas, fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *in vivo* são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (CALDAS et al., 1998).

Tendo em vista a ampla diversidade metabólica dos propágulos, existem vários tipos de meios nutritivos para satisfazerem as variadas exigências nutricionais. Em função disso, estes se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Além dos nutrientes, é preciso fornecer condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos explantes, tais como pH, pressão osmótica, umidade, temperatura, atmosfera (aeróbia, microaeróbia ou anaeróbia), dentre outras.

A composição dos meios nutritivos utilizados para a micropropagação varia de acordo com as espécies e as diferentes etapas do processo, ou seja, estabelecimento, multiplicação e enraizamento. De maneira geral, utiliza-se um meio básico composto de macro e micronutrientes, suplemento de ferro, vitaminas, água,

fontes de carboidratos, mio-inositol e, quando necessário, outros compostos orgânicos (como aminoácidos) e outras substâncias quimicamente indefinidas (como água de coco, extrato de malte, de frutas e de legumes) e, também, reguladores de crescimento. A formulação MS de Murashige e Skoog, publicada em 1962, é a mais utilizada para diferentes processos da cultura de tecidos, incluindo a micropropagação (SEREJO et al., 2006). No entanto, existem formulações específicas para determinadas espécies, como o meio *Woody Plant Medium* – WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), mais usual em espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998, GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.4 Reguladores de crescimento

Os hormônios de plantas (também chamados de fitormônios) são compostos orgânicos sintetizados em uma parte da planta e translocados para outra parte, em que, em baixa concentração, causam uma resposta fisiológica (promoção ou inibição). Já o termo regulador de crescimento é normalmente empregado para compostos naturais (fitormônios e substâncias naturais de crescimento) ou sintéticos (hormônio sintético e regulador sintético) que exibem atividade no controle do crescimento e desenvolvimento da planta.

A adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo tem como objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que foram isolados da planta matriz, bem como estimular o alongamento ou a multiplicação da parte aérea (CALDAS et al., 1998). Em relação à fase de enraizamento, os principais reguladores de crescimento utilizados são pertencentes ao grupo das auxinas (GOLLE, 2010). A auxina Ácido 3-Indolacético (AIA) foi o primeiro hormônio vegetal descoberto e tem importante papel na regulação do crescimento da planta. Baixas concentrações de auxina são necessárias para haver crescimento radicular, embora altas concentrações atuem como inibidores do crescimento das raízes. Esta substância também tem importante papel em outros processos fisiológicos, como: alongamento celular, regulação da dominância apical,

inibição de raízes laterais, abscisão foliar, formação de botões florais e desenvolvimento do fruto (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O efeito das auxinas também pode ser influenciado pelo seu balanço em relação às citocininas. A relação auxina/citocinina pode influenciar a morfogênese em cultura de tecidos. De modo geral, na ausência de citocinina praticamente não se observa ocorrência de divisão celular. Altos níveis de auxina em relação aos de citocinina promovem a formação de raízes, enquanto altos níveis de citocinina em relação aos de auxina estimulam a formação da parte aérea (brotações). Uma relação intermediária favorece o crescimento do tecido não diferenciado, comumente referido como calo (BARRUETO CID, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004).

As citocininas são hormônios que participam na regulação de muitos processos na planta, incluindo divisão celular, morfogênese, maturação de cloroplastos crescimento celular e senescência. Tais substâncias têm também profunda influência na taxa de síntese de proteínas e no tipo de proteína produzido pelas células (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Outro grupo de reguladores de crescimento usado em cultura de tecidos vegetais é o das giberelinas. As giberelinas podem influenciar o alongamento dos internódios em certas espécies de plantas, mas também participam da regulação dos processos de mudança na juvenildade e determinação do sexo da flor, promoção do “pegamento” e crescimento do fruto, e na germinação de sementes. (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, esse grupo de fitorreguladores, pode ser usado na indução da embriogênese somática, no entanto, seu efeito é altamente variável de uma espécie para outra ou de tecido para tecido (CARVALHO et al., 2006).

Existem várias substâncias que pertencem a cada uma dessas classes de reguladores e que são usadas, de acordo com o objetivo do estudo, nos meios de cultura. As várias auxinas (Ácido alfa-Naftaleno Acético – ANA, Ácido Indolacético – AIA, Ácido 3-Indol Butírico – AIB e Ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético – 2,4-D, entre outras) dão respostas diferentes *in vitro*, sendo que ANA é bastante utilizado em meios de isolamento, porém, se adicionado em concentrações acima de alguns décimos de miligrama, tende a estimular a formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De maneira semelhante, as citocininas (6-Benzilaminopurina – BAP, Zeatina – ZEA, Cinetina – CIN; Thidiazuron – TDZ, entre outras) também provocam respostas

diferenciadas, sendo que BAP induz à formação de grandes números de brotos e à alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (CALDAS et al., 1998). ZEA é uma citocinina de ocorrência natural, ao contrário de CIN, que é um regulador sintético. No entanto, estas duas citocininas têm estruturas moleculares similares, e ambas podem estimular a divisão de células vegetais maduras juntamente com uma auxina (TAIZ; ZEIGER, 2004). Já a citocinina TDZ promove o crescimento e a rediferenciação de tecidos, sendo, por esta razão, comuns em trabalhos de cultura de tecidos (MATSUMOTO, 2000).

Em relação às giberilinas, são conhecidos mais de 125 compostos relacionados, sendo estes definidos mais por sua estrutura química do que por sua atividade biológica (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dentro desse grande grupo, está o Ácido Giberélico (GA_3), que pode ser usado para promover o alongamento de caules (MATSUMOTO, 2000). No entanto, poucas culturas *in vitro* mostram respostas a esse regulador, sendo que a resposta do tecido pode depender da utilização da giberelina apropriada para cada espécie e cada fase de desenvolvimento (CALDAS et al., 1998).

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

3 CAPÍTULO I

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Eugenia involucrata* DC.

3.1 Objetivo

Este trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento sobre a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais e segmentos apicais caulinares de *Eugenia involucrata* DC.

3.2 Material e Métodos

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, em Santa Maria, RS.

3.2.1 Desinfestação superficial e obtenção dos explantes

Nos ensaios, foram utilizadas, como plantas doadoras de explantes, espécimes de *E. involucrata* (Figura 1), cultivados em casa de vegetação, com cinco a seis anos de idade. Estas plantas estão se desenvolvendo em vasos plásticos com 22 cm de altura e 24 cm de diâmetro (capacidade para aproximadamente 8 L), contendo substrato Plantmax Florestal®, cobertas com sombrite a 50%, sendo que, em épocas de maior calor, é instalada, no teto da casa de vegetação, uma manta de tecido não tecido (TNT) branco. Além de irrigações periódicas, cada planta recebeu,

semanalmente, 150 mL de solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20) na concentração de $1,5 \text{ g L}^{-1}$. Visando efetuar um pré-tratamento das plantas, na tentativa de obter maior controle em relação a contaminação por microrganismos, foram realizadas pulverizações semanais com solução de Cercobin700PM® (Thiophanato Metílico) a $1,5 \text{ g L}^{-1}$ e Sulfato de Estreptomicina a 100 mg L^{-1} .

Nos três primeiros ensaios descritos na sequência, foram utilizados, como explantes, segmentos nodais de ramos que apresentavam aspecto semilenhoso. Os explantes de *E. involucrata* foram selecionados nas matrizes doadoras de acordo com seu vigor e qualidade sanitária, dando-se prioridade para aqueles que se apresentaram inteiros, sem manchas e ataque de pragas. Os segmentos nodais foram coletados e armazenados em recipientes contendo, aproximadamente, 1 L de água destilada, acrescida de 1 g L^{-1} de Captan® (Dicarboximida) e 100 mg L^{-1} de Sulfato de Estreptomicina, sendo acrescentadas três gotas de detergente para surfactar a tensão superficial.

No Laboratório, os explantes foram lavados cuidadosamente com o auxílio de detergente comercial, em seguida foram imersos em etanol a 70% (v/v) durante 30 segundos, seguido de um enxágue em água destilada e autoclavada. A seguir, na capela de exaustão, os explantes foram imersos em solução de Biclreto de Mercúrio (HgCl_2) a 0,05% (p/v), onde permaneceram por 10 minutos. Na sequência, os explantes foram enxaguados com água destilada e autoclavada e, na câmara de fluxo laminar, foram expostos à solução de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v), obtida por meio da diluição de NaOCl (P.A.) a 10%, acrescida de três gotas de detergente comercial, durante 15 minutos. Posteriormente, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada e autoclavada, e permaneceram, durante a inoculação, em água destilada e autoclavada contendo 1 g L^{-1} de Ácido Ascórbico, visando a inibição da oxidação fenólica.

Para a inoculação *in vitro*, utilizaram-se como explantes apenas os segmentos nodais, cujo tamanho foi padronizado em, aproximadamente, 1 cm. O corte da parte basal foi realizado em bisel, para aumentar a área de contato com o meio nutritivo.



Figura 1 – A) Plantas doadoras de explantes de *Eugenia involucrata* DC., de 5 a 6 anos de idade, mantidas em casa de vegetação. B) Brotações jovens coletadas para posterior isolamento dos segmentos nodais. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

3.2.2 Efeito de diferentes fontes de citocininas na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eugenia involucrata* DC.

Os segmentos nodais foram inoculados, sob câmara de fluxo laminar, em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), conforme estudo preliminar desenvolvido por Golle (2010), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar acrescido das diferentes concentrações de reguladores de crescimento, as quais constituíram os tratamentos. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 4x3, em que os níveis do fator “A” referiram-se às fontes (1-Fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) ureia Thidiazuron – TDZ; 6-Furfurilaminopurina – CIN; 6-Benzilaminopurina BAP e Isopenteniladenina – 2iP) e os níveis do fator “B”, às concentrações de citocininas (0; 16 e 32 µM), sendo o tratamento zero a testemunha, totalizando 12 tratamentos. Foram utilizadas cinco repetições, cada

uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três segmentos nodais, totalizando 60 unidades experimentais e 180 explantes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e uma camada de polivinilcloro (PVC).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C}\pm 3$, fotoperíodo de 16 h, 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 efetuadas após 30 e 60 dias. Após 30 dias, foram consideradas as variáveis: sobrevivência *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes e vivos); estabelecimento *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes) – todas expressas em porcentagem. Após 60 dias, as variáveis observadas foram: intumescimento dos explantes; explantes que formaram calo; contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes); contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes); explantes que emitiram brotações – todas expressas em porcentagem; e número de brotos por explante.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão dos experimentos foi medida através da acurácia seletiva (AS) calculada por $\sqrt{1 - 1/f_{cal}}$. Essa estatística, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1 - 1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo.

3.2.3 Efeito de TDZ e GA₃ na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eugenia involucrata* DC.

Os segmentos nodais foram inoculados, sob câmara de fluxo laminar, em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), conforme estudo preliminar desenvolvido por Golle (2010), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar acrescido das diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, sendo ANA fixo (0,05 µM), as quais constituíram os tratamentos. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 2x4, em que os níveis do fator "A" referiram-se às concentrações de TDZ (16 e 32 µM) e os níveis do fator "B" às diferentes concentrações de GA₃ (0; 10; 20 e 40 µM), totalizando oito tratamentos. Foram realizadas cinco repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes, totalizando 40 unidades experimentais e 120 explantes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e uma camada de PVC.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C±3, fotoperíodo de 16 h, e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram efetuadas após 30 e 60 dias. Após 30 dias, foram consideradas as variáveis: sobrevivência *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes e vivos); estabelecimento *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes) – todas expressas em porcentagem. Após 60 dias as variáveis observadas foram: intumescimento dos explantes; explantes que formaram calo; contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos

explantes); explantes que emitiram brotações – todas expressas em porcentagem; e número de brotos por explante.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e quando o valor de F foi significativo, foi utilizada, para tratamento qualitativo, a comparação das médias através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão dos experimentos foi medida através da AS calculada por $\sqrt{1-1/f_{cal}}$. Essa estatística, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo.

3.2.4 Efeito de ANA combinada a TDZ na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eugenia involucrata* DC.

Os segmentos nodais foram inoculados, sob câmara de fluxo laminar, em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), conforme estudo preliminar desenvolvido por Golle (2010), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, acrescido das diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, as quais constituíram os tratamentos. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 3x3, em que os níveis do fator “A” referiram-se às concentrações de ANA (0; 0,5 e 1 µM) e os níveis do fator “B” às diferentes concentrações de TDZ

(0; 16 e 32 μM), sendo o tratamento zero a testemunha, totalizando nove tratamentos. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura e três explantes, totalizando 45 unidades experimentais e 135 explantes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e uma camada de PVC.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C}\pm 3$, fotoperíodo de 16 h, 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 efetuadas após 30 e aos 60 dias. Após 30 dias, foram consideradas as variáveis: sobrevivência *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes e vivos); estabelecimento *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes) – todas expressas em porcentagem. E, aos 60 dias, as variáveis observadas foram: intumescimento dos explantes; explantes que formaram calo; contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes); explantes que emitiram brotações – todas expressas em porcentagem; e número de brotos por explante.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão dos experimentos foi medida através da AS calculada por $\sqrt{1-1/f_{cal}}$. Essa estatística, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo.

3.2.5 Efeito de TDZ na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de origem seminal de *E. involucrata*

Foram utilizados, como explantes, segmentos apicais caulinares isolados a partir de plântulas germinadas *in vitro* aos 45 dias após inoculação das sementes em meio nutritivo (Figura 2). As sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO/Florestas em Santa Maria, RS, e são provenientes da produção de 2010. Na UFSM, permaneceram armazenadas em sacos de papel na geladeira, a 8-10°C, de novembro de 2010, até a utilização nos ensaios, que ocorreu no mesmo mês.

No Laboratório, foi realizada a desinfestação superficial das sementes de *E. involucrata*. Primeiramente, estas foram imersas em etanol a 70% (v/v) durante 30 segundos, seguidas de um enxágue em água destilada e autoclavada. A seguir, na câmara de fluxo laminar, foram expostas à solução de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) a 2% (v/v), obtida por meio da diluição de NaOCl (P.A.) a 10%, acrescida de três gotas de detergente comercial, durante 15 minutos. Posteriormente, as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada.

A germinação e a multiplicação *in vitro* ocorreram em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), conforme estudo preliminar desenvolvido por Golle (2010), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar acrescido das diferentes concentrações da citocinina, as quais constituíram os tratamentos. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, unifatorial com três tratamentos, que corresponderam às concentrações de TDZ avaliadas, a saber: 0; 16 e 32 µM. Foram empregadas cinco repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura e quatro explantes, totalizando 15 unidades experimentais e 60 explantes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e uma camada de PVC.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C}\pm 3$, fotoperíodo de 16 h, 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 efetuadas após 30 e 60 dias. Após 30 dias, foram consideradas as variáveis: sobrevivência *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes e vivos); estabelecimento *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes) – todas expressas em porcentagem. Após 60 dias, as variáveis observadas foram: explantes que apresentaram clorose foliar; intumescimento dos explantes; explantes que formaram calo; contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes, em porcentagem); contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes, em porcentagem); explantes que emitiram brotações – todas expressas em porcentagem; e número de brotos por explante.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão dos experimentos foi medida através da AS calculada por $\sqrt{1 - 1/f_{cal}}$. Essa estatística, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo.

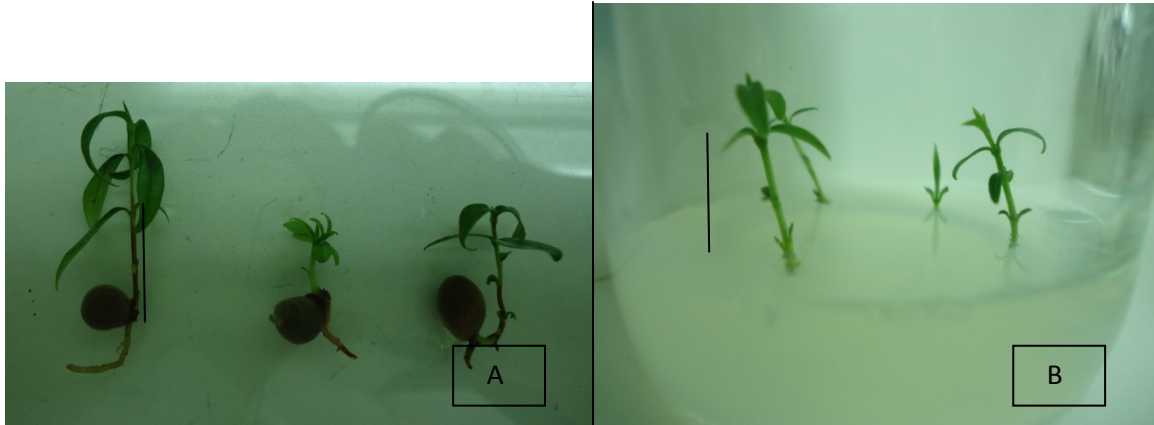


Figura 2 – A) Plântulas germinadas *in vitro* a partir de sementes de *Eugenia involucrata* DC. B) Segmentos apicais caulinares em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2). Linha vertical = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Efeito de diferentes fontes de citocininas na multiplicação *in vitro* de brotações de *E. involucrata*

Em todas as variáveis cujas análises de variância resultaram em efeito significativo do valor F foi observada uma elevada AS, permitindo depositar confiança na avaliação e nos valores genotípicos preditos com fins de seleção. Essa estatística não depende apenas da magnitude do erro experimental e do número de repetições, mas também da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação. Para valores de F menores do que um, não existe AS e o experimento não tem utilidade. Para valores de F muito grandes (tendendo ao infinito), os valores de AS tendem à unidade, casos em que existem diferenças significativas entre os genótipos (STORCK et al., 2010).

Para a sobrevivência dos segmentos nodais não houve efeito das fontes de citocininas ($p=0,8086$), concentrações ($p=0,6504$), e nem interação significativa ($p=0,8330$). Foi observada uma média geral de 67,30% de sobrevivência *in vitro* dos

explantes. Esses resultados indicam que, para a sobrevivência *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata*, as citocininas testadas são dispensáveis.

De maneira semelhante, na sobrevivência *in vitro* de segmentos nodais de *Vaccinium ashei* Reade (Mirtilo) foi verificada uma alta porcentagem (88,64%) aos 35 dias de cultivo *in vitro*, independentemente da presença de 2iP, ANA e GA₃ adicionados ao meio nutritivo WPM (ERIG; SCHUCH, 2005).

Já para o estabelecimento *in vitro*, houve efeito significativo das citocininas ($p=0,0054$; $AS=0,87$) (Tabela 1). As citocininas BAP e 2iP apresentaram o maior estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata* (Figura 3), mas não diferiram estatisticamente de CIN e da testemunha. Portanto, da mesma maneira que ocorreu com a sobrevivência, para o estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais não é necessário adicionar-se citocininas ao meio nutritivo.

Tabela 1 – Médias de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., após 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Citocinina	Estabelecimento (%)
BAP	53.40 a*
2iP	43.40 a*
CIN	36.80 ab
Testemunha	33.40 ab
TDZ	0.00 b
Média (%)	33,40
AS	0,87

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Comportamento semelhante foi verificado em segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert (Canafístula), que não foram

influenciados pelas mesmas quatro fontes de citocininas testadas no presente estudo (BAP, CIN, 2iP e TDZ) quando acrescidas ao meio nutritivo MS (CURTI, 2011). Igualmente, diferentes concentrações de BAP não tiveram efeito na sobrevivência e no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (Açoita-cavalo) (FLÔRES, 2007). No entanto, em outro estudo com esta espécie foi verificado efeito significativo para as concentrações de BAP (0,00; 0,22; 0,44 e 0,88 μM) combinadas à auxina ANA (0,00 e 0,054 μM) na sobrevivência *in vitro* de segmentos nodais, sendo observados 93,75% de sobrevivência na presença de 0,44 μM deste fitorregulador (LEÓN, 2010).

Já em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (Aroeira), segmentos nodais e apicais caulinares, cultivados em meio nutritivo MS/2, suplementado com BAP a 4,5 μM , proporcionaram a maior porcentagem de regeneração direta (90%), sendo este o tratamento selecionado para promover o estabelecimento *in vitro* dessa espécie (ANDRADE et al., 2000). Também, em *Vaccinium ashei* Reade, a maior média de estabelecimento (70,74%) foi obtida na presença de 24,6 μM de 2iP (ERIG; SCHUCH, 2005).

Os valores observados de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata* permitem ratificar a afirmação de que uma alta sobrevivência dos explantes nem sempre pode ser usada como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes fragmentos (ERIG; SCHUCH, 2003).



Figura 3 – Segmento nodal de *Eugenia involucrata* DC. estabelecido *in vitro*, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocininas. Linha vertical = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Para a contaminação bacteriana, na primeira avaliação (após 30 dias) não houve efeito das citocininas ($p=0,8695$), concentrações ($p=0,1612$) e nem interação significativa ($p=0,4059$), observando-se uma média geral reduzida, de 9,95%. No entanto, na segunda avaliação realizada (após 60 dias) foi verificado efeito significativo das concentrações de citocininas testadas ($p=0,0248$; $AS=0,86$), observando-se um aumento gradual na contaminação por bactérias com o aumento na concentração de citocininas (Tabela 2). Os resultados obtidos demonstram que essa classe de fitorreguladores favorece o crescimento desses micro-organismos.

Entretanto, é importante destacar que muitos contaminantes apareceram após algumas semanas de cultivo, o que indica a possível presença de micro-organismos endofíticos nos tecidos de explantes coletados em plantas mantidas em casa de vegetação. Apesar disso, foi possível obter estabelecimento *in vitro* de *E. involucrata*, embora as contaminações tenham inviabilizado o prosseguimento do cultivo *in vitro* nesse ensaio.

Tabela 2 – Médias de contaminação bacteriana de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Concentração de citocinina (μM)	Contaminação bacteriana (%)
0	6,60 a*
16	8,25 ab
32	26,70 b
Média (%)	13,85
AS	0,86

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Da mesma maneira, para *Hancornia speciosa* Gomes (Mangabeira), foi verificado que o estabelecimento *in vitro* de culturas via material oriundo do campo ou de casa de vegetação trouxe o problema de contaminação endógena severa (SOARES et al., 2007). Na avaliação do efeito de BAP e de Sulfato de Estreptomicina na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Mimosa scabrella* (Benth.) (Bracatinga) em meio nutritivo MS foi observado que, na ausência deste fitorregulador, não houve contaminação bacteriana. No entanto, a sua presença, a partir da concentração 5 μM , acarretou a contaminação por bactérias, atingindo valor superior a 90% quando foram acrescentados 10 μM . Esses resultados sugerem que BAP, a partir de certas concentrações, pode contribuir na multiplicação desses micro-organismos (ROSA, 2009).

Por outro lado, para a contaminação fúngica não houve efeito das citocininas ($p=0,1845$ e $p=0,2390$), concentrações ($p=0,1854$ e $0,6699$), e nem interação significativa ($p=0,9604$ e $p=0,7032$), tanto para a avaliação realizada aos 30 dias quanto aos 60 dias. Observou-se, para esta variável, uma média geral de 27,20% na primeira avaliação, e na segunda, 15%. Essa redução na média, porém, é decorrente do descarte de algumas unidades experimentais após a primeira avaliação realizada, devido à morte dos explantes pela contaminação fúngica.

Na análise da presença de intumescimento na base dos explantes foi observado efeito significativo apenas das diferentes concentrações de citocininas testadas ($p=0,0272$; $AS=0,86$) (Tabela 3). O intumescimento foi inversamente proporcional à concentração de citocininas, sendo máximo na ausência desses fitorreguladores. Nas concentrações mais reduzidas é possível que os níveis endógenos de auxinas tenham equilibrado a citocinina exógena, favorecendo o intumescimento.

Já a formação de calo nos explantes não apresentou efeito significativo para as citocininas ($p=0,3282$), para as concentrações testadas ($p=0,2554$) e nem para interação ($p=0,9587$), sendo observada uma média geral de 10% de explantes que apresentaram calogênese. Portanto, o intumescimento anteriormente observado não resultou em formação de calos.

Tabela 3 – Médias de intumescimento de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Concentração de citocinina (μM)	Intumescimento (%)
0	40,20 b
16	26,60 ab
32	14,95 a*
Média (%)	27,25
AS	0,86

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Em outro estudo de multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata*, o emprego de ANA e TDZ resultou em uma redução inicial (principalmente nas concentrações entre 2 a 16 μM de TDZ) no número de brotos emitidos, a qual foi atribuída ao intumescimento nas regiões de brotações dos

explantes, onde existiam as gemas dormentes (GOLLE, 2010). Esta redução, segundo o autor, poderia estar ligada, contudo, à concentração mais elevada (32 μM) desse fitorregulador, que propiciou o estímulo necessário para o aumento da emissão de brotações por multiplicação. Dessa forma, o referido autor pôde inferir que, nas concentrações mais reduzidas, o balanço entre auxina e citocinina não foi adequado para emissão de um número maior de brotos, pois além do aporte exógeno, é bastante provável que os explantes possuam níveis endógenos de auxinas suficientes para tornar a citocinina exógena equilibrada, favorecendo o intumescimento (GOLLE, 2010).

Para as variáveis porcentagem de explantes que emitiram brotações e número de brotos por explante, houve efeito significativo apenas das diferentes citocininas analisadas ($p=0,0064$ e $p=0,0060$, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* que emitiram brotações e número de brotos por segmento nodal (NºB/EXP) de *Eugenia involucrata* DC., após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP, 2iP, CIN ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Citocinina	Explantes que emitiram brotações	NºB/EXP
Testemunha	40,20 a*	0,47 ab
BAP	50,00 a*	0,83 a*
CIN	20,00 ab	0,33 ab
2iP	33,30 ab	0,50 ab
TDZ	0,00 b	0,00 b
Média	30,61	0,43
AS	0,87	0,87

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

A testemunha e a citocinina BAP apresentaram os melhores resultados para a emissão de brotações a partir do cultivo de segmentos nodais de *E. involucrata*, mas as médias obtidas não diferiram daquelas observadas com o emprego de CIN e 2iP, as quais por sua vez, não diferiram das de TDZ. Igualmente, em relação ao número de brotos por explante, BAP se sobressaiu, porém não diferiu da testemunha, tampouco de CIN e 2iP, apenas de TDZ. Em consequência, observa-se que as citocininas, da maneira como foram avaliadas são dispensáveis na multiplicação *in vitro* de *E. involucrata*. No entanto, faz-se necessário ampliar os estudos em relação ao efeito de diferentes citocininas e concentrações, incluindo, talvez, combinações entre elas e com outros reguladores de crescimento, visando promover uma otimização da multiplicação *in vitro* de segmentos nodais.

Para essa mesma espécie, Golle (2010) obteve uma média de 2 brotos emitidos por explante, na presença de 32 μM de TDZ combinado com 5 μM de ANA. Já, no presente estudo, a citocinina TDZ não promoveu emissão de brotações. Essa diferença de resposta pode ser atribuída ao fato de que, apesar de terem sido usadas as mesmas plantas doadoras de explantes, essas matrizes encontram-se, atualmente, em idade mais avançada, podendo, assim, serem menos responsivas aos estímulos proporcionados pelas citocininas. Além disso, a condição nutricional dessas plantas pode, também, ter influenciado o desenvolvimento dos explantes no cultivo *in vitro*, já que estas permanecem no mesmo substrato desde o plantio nos vasos (aproximadamente 6 anos). No entanto, faz-se necessário desenvolver algum estudo mais aprofundado em relação a esta questão, como por exemplo, a realização de uma análise foliar.

Em segmentos nodais de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Canjerana), inoculados em meio nutritivo MS, na presença de BAP e 2iP, foram obtidos 1,6 brotos por explante (ROCHA et al., 2007). De maneira semelhante, para *Ocotea odorifera* (Canela-sassafrás), foi observada média de 1,4 brotações formadas a partir de embriões maduros inoculados em meio nutritivo MS acrescido de carvão ativado e 5 μM de BAP (MORITZ et al., 2009). Igualmente, na micropropagação *in vitro* de *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira), em que segmentos nodais e apicais caulinares foram cultivados em meio nutritivo MS/2 suplementado com combinações de ANA com BAP e CIN, foi verificada formação de 1 broto por explante (ANDRADE et al., 2000). Já para *Acacia mearnsii* (Acácia-negra), foi testado o efeito de BAP,

BA, 2iP e CIN na proliferação de gemas axilares em segmentos nodais inoculados em meio nutritivo B5. BAP a 8,88 μM , do mesmo modo, foi a citocinina que promoveu a maior taxa de multiplicação de gemas (3,5 brotos/explante) (BORGES et al., 2004). A citocinina BAP (4,44 μM) também proporcionou os melhores resultados para *Eugenia pyriformis* Cambess (Uvaia), promovendo um maior número médio de gemas (7,9), folhas (13,8) e comprimento de brotos (1,15 cm) (NASCIMENTO et al., 2008).

3.3.2 Efeito de TDZ e GA₃ na multiplicação *in vitro* de brotações de *E. involucrata*

Para a sobrevivência *in vitro* não houve efeito de TDZ ($p=0,8734$), GA₃ ($p=0,8458$) e nem interação significativa ($p= 0,4930$), sendo obtidos, para esta variável, os mesmos valores de probabilidade de erro nas duas avaliações realizadas. Foi observada, nestas avaliações (após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*), a mesma média geral de 54,41% de sobrevivência *in vitro* dos explantes, contudo, não ocorreu estabelecimento *in vitro* dos explantes, apesar de não ter havido contaminação fúngica durante o presente ensaio.

Para a contaminação bacteriana durante a primeira e segunda avaliação (após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente), não foi verificado efeito da citocinina ($p=0,5077$ e $p=0,4080$), da giberilina ($p=0,2059$ e $0,4433$) e nem interação significativa ($p=0,4456$ e $p=0,7767$). Observou-se uma média geral, na primeira avaliação, de 38,51% de contaminação dos explantes por bactérias. Na segunda avaliação, a média foi de 42,22%. Estas médias são altas para a cultura de tecidos, podendo, assim, terem contribuído para a ausência de segmentos nodais de *E. involucrata* estabelecidos *in vitro* no presente ensaio.

Em qualquer fase do cultivo *in vitro*, a contaminação pode comprometer a micropropagação. Quando é exógena, a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é considerável, já quando a contaminação é endógena, as consequências podem ser limitantes, podendo haver perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético (SOUZA et al., 2006).

Além disso, em muitas situações, as soluções e concentrações usadas na desinfestação superficial dos propágulos, bem como os reguladores de crescimento adicionados ao meio nutritivo, podem apresentar efeito fitotóxico para os explantes, alterando o seu crescimento *in vitro* (ROSA, 2009). Esta condição foi observada na indução de alongamento *in vitro* de *E. involucrata* em outro estudo, em que, na presença de 20 μ M de GA₃, os brotos entraram em senescência e, por fim, inviabilizaram-se, demonstrando a toxidez causada por concentrações elevadas dessa giberelina (GOLLE, 2010). Entretanto, no presente ensaio não é possível afirmar esse efeito de toxicidade, já que mesmo na ausência de GA₃, também, não foi possível observar o estabelecimento *in vitro* dos propágulos.

3.3.3 Efeito de ANA combinada a TDZ na multiplicação *in vitro* de brotações de *E. involucrata*

Em relação às variáveis sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, não foi verificado efeito significativo de ANA (p=0,5320; p=0,1113; p= 0,4735 e p=0,3779, respectivamente), de TDZ (p=0,4156; p=0,7175; p=0,4735 e p=0,3779), e nem da interação em nenhuma das avaliações (p=0,5542; p=0,3457; p=0,8890 e p=0,4203) (após 30 e 60 dias, respectivamente). Para a sobrevivência *in vitro* observou-se uma média geral, após 30 dias de cultivo, de 19,26% e, após 60 dias, a média reduziu-se para 4,44%. O mesmo comportamento foi observado em relação ao estabelecimento *in vitro*, obtendo-se uma média geral de 8,13% na primeira avaliação e de 0,73%, na segunda.

Quanto à contaminação bacteriana, tanto aos 30 quanto aos 60 dias de cultivo, também não houve efeito significativo de ANA (p=0,7635 e p=0,5317), de TDZ (p=0,7998 e p=0,6335) e nem da interação (p= 0,6609 e p=0,7657. Foi observada uma elevada média geral de contaminação bacteriana (82,96% e 77,02%) nas duas avaliações realizadas. No entanto, esta pequena redução na média, obtida após 60 dias em relação à primeira avaliação, ocorreu pelo descarte de algumas unidades experimentais, logo após a primeira coleta de dados, devido à morte dos explantes causada por bactérias.

Em relação à contaminação fúngica, não foi observado efeito significativo de ANA ($p=0,1703$), TDZ ($p=0,2507$) e nem da interação ($p=0,5466$) na primeira avaliação realizada, sendo observada uma média geral de 12,56%. Entretanto, após 60 dias houve interação significativa ($p=0,0220$; $AS=0,83$) entre os fatores estudados (ANA e TDZ) para a contaminação fúngica dos explantes cultivados *in vitro* (Tabela 5). Na ausência de TDZ e na presença de 1 μM de ANA, houve a maior contaminação fúngica, cuja média diferiu significativamente de todos os demais tratamentos. O resultado obtido sugere que esses micro-organismos se beneficiaram da presença da auxina, na máxima concentração testada, e da ausência de citocinina.

Tabela 5 – Médias de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. que apresentaram contaminação fúngica, em porcentagem, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de diferentes concentrações de ANA e de TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Contaminação fúngica (%)				
TDZ (μM)	ANA (μM)			Média (%)
	0	0,5	1	
0	0,00 a A	0,00 a A	40,00 b B	13,33
16	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00
32	0,00 a A	0,00 a A	6,60 a A	2,20
Média (%)	0,00	0,00	15,53	5,18
AS			0,83	

* Médias seguidas de letras diferentes, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Para esta variável foi observada uma elevada AS, permitindo depositar confiança na avaliação e nos valores genotípicos preditos com fins de seleção.

Os resultados obtidos evidenciam, novamente, que os altos índices de contaminantes bacterianos influenciaram nas reduzidas taxas de sobrevivência e

estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais de *E. involucrata*, provocando a morte destes propágulos.

As contaminações, independentes do micro-organismo causador, são sempre um problema a ser superado pela cultura de tecidos, que visa à obtenção de mudas livres desses agentes. Todavia, o controle bacteriano na cultura de tecidos é considerado mais problemático quando comparado ao fúngico, pois, muitas vezes, sua presença não é detectada no início do cultivo *in vitro*. Além disso, algumas espécies de bactérias não crescem prontamente no meio nutritivo até que determinadas condições (nutrição, pH) sejam favoráveis ao seu desenvolvimento, permanecendo latentes no interior dos vegetais e tornando-se uma fonte importante de contaminação nos estádios mais avançados de multiplicação do material vegetal (PEREIRA; FORTES, 2003).

Embora alguns contaminantes possam agir de forma direta sobre o crescimento e o desenvolvimento dos explantes, a maioria compromete o desenvolvimento normal dos cultivos, de forma indireta, pela competição por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e pela produção de metabólitos fitotóxicos como os ácidos láctico e acético, e o cianeto, podendo ocasionar a morte da plântula (PEREIRA et al., 2003; LIMA; MORAES, 2006).

A etapa de desinfestação superficial nos programas de melhoramento de plantas é de extrema relevância, especialmente quando se trata de espécies lenhosas, pela dificuldade encontrada em promover o estabelecimento *in vitro* de explantes, obtidos a partir de plantas doadoras na natureza ou mantidas em casas de vegetação. Nesse sentido, é comum que se faça uso de antibióticos durante essa etapa. Em alguns casos, esses compostos podem ser adicionados aos meios nutritivos em elevadas concentrações. No entanto, a fitotoxicidade dessas substâncias pode ser um fator limitante a sua utilização em altas concentrações. Na maioria dos trabalhos *in vitro*, a eficiência de descontaminação não é total, pois os tecidos vegetais podem interferir no controle por meio da destoxificação dessas substâncias ou servindo como habitat para os contaminantes que se translocam por seus tecidos (PEREIRA; FORTES, 2003).

3.3.4 Efeito de TDZ na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de origem seminal de *E. involucrata*

Para a sobrevivência e o estabelecimento *in vitro*, avaliados após 30 dias de cultivo, não houve efeito significativo das concentrações da citocinina TDZ avaliadas ($p=0,7230$ e $p=0,9557$, respectivamente). Foi observada, para a sobrevivência *in vitro* dos explantes, uma elevada média geral (86,66%). Já para o estabelecimento *in vitro*, a média geral obtida foi reduzida (28,33%).

Em relação à contaminação bacteriana, não foi verificada sua ocorrência no cultivo *in vitro* na primeira avaliação realizada (após 30 dias). No entanto, após 60 dias, foi observada a presença de bactérias junto aos explantes de forma não significativa ($p=0,6186$), apresentando uma reduzida média geral de 3,33%. Para a contaminação fúngica, também, não foi verificado efeito significativo do fator principal nas duas avaliações (após 30 e 60 dias de cultivo), ambas apresentando os mesmos valores de probabilidade de erro ($p=0,3966$) e reduzida média geral (6,66%).

A reduzida contaminação por micro-organismos pode ser atribuída ao fato de que os explantes utilizados nesse ensaio tiveram origem seminal. Isso reforça a hipótese de que há maior contaminação associada aos explantes quando estes são obtidos de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, e, dessa forma, mais expostos às condições ambientais. Além disso, os segmentos apicais caulinares isolados de plântulas germinadas *in vitro* são constituídos de tecidos juvenis e menos lenhosos, que dificilmente apresentaram contaminações endógenas, dada sua juvenildade e altos índices mitóticos (GOLLE, 2010).

No caso das variáveis clorose foliar, intumescimento e calo, todas expressas em porcentagem e analisadas apenas após 60 dias de cultivo, não foi verificado efeito significativo das concentrações de TDZ ($p=0,3526$; $p=0,2134$ e $p=0,1983$, respectivamente). Para explantes que apresentaram clorose foliar obteve-se elevada média geral (68,33%). Para intumescimento dos explantes a média observada foi de 46,67%, e para calogênese, a média foi reduzida (8,33%).

Tanto para clorose foliar quanto para o intumescimento, as médias obtidas são consideradas altas, sendo prejudiciais ao desenvolvimento *in vitro* de explantes

de *E. involucrata*. Apesar de a sobrevivência ter sido alta (86,66%), o estabelecimento *in vitro* foi inferior a 30%, o que pode ser atribuído à ocorrência de clorose e intumescimento dos explantes.

Em outro estudo realizado com esta espécie, com segmentos nodais e apicais caulinares inoculados em meio nutritivo MS, MS/2 e WPM, acrescidos de 1 μM de ANA e 5 μM de TDZ, foram observados 91,92% de estabelecimento *in vitro* após 60 dias de cultivo (GOLLE, 2010). No entanto, o referido autor empregou explantes coletados de matrizes doadoras, e, no presente ensaio, os segmentos apicais caulinares foram isolados de plântulas germinadas *in vitro*. Assim, é bastante provável que as diferentes origens dos explantes possam fornecer respostas muito distintas ao cultivo *in vitro*, mesmo em se tratando da mesma espécie.

Já na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Canafístula), as concentrações de TDZ utilizadas (0; 5 ou 10 μM) promoveram altas porcentagens de brotações, apresentando clorose foliar. Observou-se que, nesses tratamentos, o desenvolvimento das brotações foi muito prejudicado e a ocorrência de clorose foliar, associada à intensa formação de calos na base, inviabilizou a posterior utilização das brotações adventícias emitidas (CURTI, 2011).

A oxidação fenólica, igualmente, apresentou efeito significativo para as concentrações de TDZ ($p=0,0401$) e elevada acurácia seletiva ($AS=0,87$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Médias de segmentos apicais caulinares de *Eugenia involucrata* DC. que apresentaram oxidação fenólica, em porcentagem, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (MS/2), acrescido de 0; 16 ou 32 μm de TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Concentração de TDZ (μm)	Oxidação fenólica (%)
0	85 b
16	25 a
32	70 a b
Média (%)	60
AS	0,87

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

A suplementação de 16 µm de TDZ no meio nutritivo reduziu a oxidação fenólica dos explantes em comparação ao tratamento testemunha, todavia, com a adição da concentração máxima da citocinina a oxidação aumentou novamente, não diferindo daquela observada em sua ausência.

A elevada oxidação fenólica observada pode estar associada às injúrias provocadas, através dos cortes realizados no isolamento dos segmentos apicais caulinares a partir das plântulas germinadas *in vitro*. Estes ferimentos nos tecidos jovens, responderam ao estresse celular causado, estimulando a atividade da fenilalanina amonialiase (PAL), enzima que atua no metabolismo de compostos fenólicos, e é aumentada pela exposição de tecidos a injúrias (TAIZ; ZIEGUER, 2004). Além disso, juntamente com outros fatores inerentes ao explante, a oxidação pode ser provocada pelos compostos presentes no meio nutritivo (LEDO et al., 2002).

Na tentativa de minimizar a ocorrência de oxidação fenólica, substâncias antioxidantes (como o ácido ascórbico) podem ser adicionadas à solução de armazenamento do material vegetal no momento de coleta e ao meio nutritivo, visando à redução deste evento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A oxidação fenólica e a contaminação microbiana são responsáveis pelo maior ou menor estabelecimento *in vitro* dos explantes (TEIXEIRA, 2005; BASSAN, 2006). Apesar disso, níveis reduzidos de contaminação e de oxidação não inviabilizam a cultura de tecidos (XAVIER et al., 2009).

3.4 Conclusões

- As citocininas, nas fontes e concentrações testadas, são dispensáveis na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata*.
- A presença de citocininas no meio nutritivo MS/2 favorece o crescimento de contaminantes bacterianos, provavelmente de origem endofítica, associados às culturas *in vitro* de *E. involucrata* iniciadas a partir de segmentos nodais isolados de plantas mantidas em casa de vegetação.

- O intumescimento dos segmentos nodais é inversamente proporcional à concentração de citocininas no meio nutritivo MS/2, sendo máximo na ausência desses fitorreguladores.
- O intumescimento dos segmentos nodais não resulta em calogênese.
- Contaminantes fúngicos, provavelmente de origem endofítica, associados às culturas *in vitro* de *E. involucrata* iniciadas a partir de segmentos nodais isolados de plantas mantidas em casa de vegetação beneficiam-se da presença da auxina ANA a 1 μM , e ausência de citocinina no meio nutritivo MS/2.
- Altos índices de contaminantes bacterianos acarretam reduzida sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata*, provocando a morte destes propágulos.
- O estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata* de origem seminal é comprometido pela ocorrência de clorose e intumescimento dos explantes.

4 CAPITULO II

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC) MATTOS

4.1 Objetivo

Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de diferentes composições de meios nutritivos e reguladores de crescimento sobre a multiplicação *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos.

4.2 Material e Métodos

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 UFSM, em Santa Maria, RS.

As sementes foram adquiridas em julho de 2009, provenientes da empresa Arbocenter Comércio de Sementes Ltda, localizada em Birigui, SP. Na UFSM, permaneceram armazenadas em sacos de papel na geladeira, a 8-10^o C, até sua utilização em ensaios realizados entre agosto de 2010 e junho de 2011.

4.2.1 Obtenção do explantes

Inicialmente, foi realizada a desinfestação superficial das sementes de *H. chrysotrichus*. As sementes foram desaladas e após colocadas em contato com o fungicida Captan® (Dicarboximida) durante 24 horas. Após este período, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à imersão em solução de etanol a 70% (v/v) durante 30 segundos, sendo, em seguida, submersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% (v/v), durante 15 minutos, e após, as sementes passaram por três enxágues com água destilada e autoclavada.

Em câmara de fluxo laminar, visando à germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo meio nutritivo 'Woody Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2) (LLOYD; MCCOWN, 1981), sendo esta composição mais adequada para a germinação, conforme verificado em estudos anteriores (dados não publicados), além de 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 50 mg L⁻¹ de tiamina. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C±3, fotoperíodo de 16 h, e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

4.2.2 Efeito dos diferentes meios nutritivos acrescidos de carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroathus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

Foram utilizados, como explantes, segmentos apicais caulinares e epicótilos de *H. chrysotrichus*, isolados de plântulas germinadas *in vitro* em meio nutritivo WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) cuja concentração de sais foi reduzida à metade

(WPM/2), sendo esta composição mais adequada para a germinação, conforme verificado em estudos anteriores (dados não publicados), (Figura 4). Após esta etapa, os explantes foram inoculados no meio nutritivo, conforme o tratamento, sob câmara de fluxo laminar.

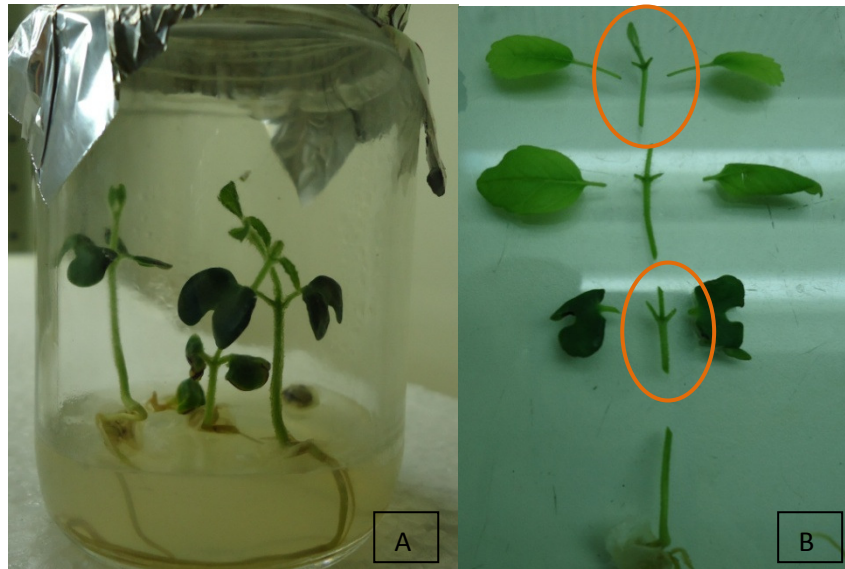


Figura 4 – Tipos de explantes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos utilizados nos ensaios de multiplicação *in vitro*. A) Plântula germinada *in vitro*, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), após 20 dias de cultivo. B) Cortes realizados para isolar o segmento apical caulinar e o epicótilo. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Foram utilizados nos ensaios os meios nutritivos básicos WPM e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), na composição normal de sais e em suas formas reduzidas, cujas concentrações de sais foram reduzidas à metade (WPM/2 e MS/2).

O meio nutritivo WPM foi acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 100 mg L⁻¹ de tiamina. Já o meio nutritivo MS foi adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e posteriormente, os meios nutritivos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

O ensaio foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, em esquema bifatorial 4x2, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2) e os níveis do fator “B”, aos tipos de explantes (segmento apical caulinar e epicótilo), totalizando oito tratamentos. Foram realizadas 10 repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 ml contendo 30 ml de meio de nutritivo e três explantes, totalizando 80 unidades experimentais e 240 explantes. Os frascos foram vedados com papel alumínio.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C}\pm 3$, fotoperíodo de 16 h, 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 efetuadas aos 30 dias, considerando-se as variáveis: sobrevivência *in vitro* dos explantes (explantes verdes e vivos); estabelecimento *in vitro* dos explantes (explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes); explantes que apresentaram clorose foliar, intumescimento dos explantes; explantes que formaram calo – todas expressas em porcentagem; número de brotos por explante e número de folhas por explante.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão dos experimentos foi medida através da AS, calculada por $\sqrt{1 - 1/f_{cal}}$. Essa estatística, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo.

4.2.3 Efeito dos diferentes meios nutritivos no estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

Foram utilizados nos ensaios os meios nutritivos básicos WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na composição normal de sais e em suas formas reduzidas, cujas concentrações de sais foram reduzidas à metade (WPM/2 e MS/2).

O meio nutritivo WPM foi acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 100 mg L⁻¹ de tiamina. Já o meio nutritivo MS foi adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar e, posteriormente, os meios nutritivos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

Este ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 4x2, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2) e os níveis do fator “B”, aos tipos de explantes (segmento apical caulinar e epicótilo), totalizando oito tratamentos. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes, totalizando 40 unidades experimentais e 120 explantes. Os frascos foram vedados com papel alumínio.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C±3, fotoperíodo de 16 h, e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram efetuadas após 30 dias de cultivo *in vitro*, levando-se em consideração as variáveis: sobrevivência *in vitro* dos explantes (explantes verdes e vivos); estabelecimento *in vitro* dos explantes (explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes); intumescimento dos explantes; explantes que formaram calo; oxidação fenólica; explantes que apresentaram clorose foliar; explantes que emitiram brotações – todas

expressas em porcentagem; número de brotos por explante e número de folhas por explante.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão dos experimentos foi medida através da AS, calculada por $\sqrt{1 - 1/f_{cal}}$. Essa estatística, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo.

4.2.4 Efeito de BAP na multiplicação de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

Os segmentos apicais caulinares e epicótilos foram inoculados, sob câmara de fluxo laminar, em meio nutritivo WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), sendo esta composição mais adequada, conforme verificado em estudos anteriores (dados não publicados), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 50 mg L⁻¹ de tiamina, acrescido das diferentes concentrações de reguladores de crescimento, sendo ANA fixo (0,05 µM), as quais constituíram os tratamentos. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 2x5, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos tipos de explantes (segmento apical caulinar e epicótilo) e os níveis do fator “B” (0, 2, 4, 8 e

16 μM), às concentrações de BAP, totalizando 10 tratamentos. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura e três explantes, totalizando 50 unidades experimentais e 150 explantes. Os frascos foram vedados com papel alumínio.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C}\pm 3$, fotoperíodo de 16 h, 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 efetuadas após 30 dias de cultivo *in vitro*, levando-se em consideração as variáveis: sobrevivência *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes e vivos); estabelecimento *in vitro* dos explantes (porcentagem de explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes); oxidação fenólica; explantes que apresentaram clorose foliar; explantes que formaram calo; explantes que formaram raízes – todas expressas em porcentagem; e número de brotos por explante.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão dos experimentos foi medida através da AS, calculada por $\sqrt{1 - 1/f_{cal}}$. Essa estatística, que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Efeito dos diferentes meios nutritivos acrescidos de carvão ativado na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

Em todas as variáveis cujas análises de variância resultaram em efeito significativo do valor F foi observada uma elevada acurácia seletiva (AS), permitindo depositar confiança na avaliação e nos valores genotípicos preditos com fins de seleção. A estatística AS não depende apenas da magnitude do erro experimental e do número de repetições, mas também da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação. Para valores de F menores do que um não existe AS e o experimento não tem utilidade. Para valores de F muito grandes (tendendo ao infinito), os valores de AS tendem à unidade, casos em que existem diferenças significativas entre os genótipos (STORCK et al., 2010).

Para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, foi observado efeito significativo apenas para o fator principal tipo de explante ($p=0,0184$; $AS=0,91$ e $p=0,0002$; $AS=0,97$, respectivamente). Também, para número de folhas por explante foi verificado efeito significativo para esse mesmo fator ($p=0,000$; $AS=0,98$). Para os meios nutritivos testados ($p=0,6403$; $p=0,5213$ e $p=0,1307$) e para interação ($p=0,1238$; $p=0,1169$ e $p=0,9180$), não foi constatado efeito significativo em nenhuma das variáveis mencionadas anteriormente. Os resultados obtidos para essas variáveis podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Médias de sobrevivência (%SOBR), de estabelecimento *in vitro* (%ESTAB) e de número de folhas por explante (N^oF/E) em segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, aos 30 dias de cultivo, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2) acrescidos de carvão ativado. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Tipo de explante	%SOBR	%ESTAB	N ^o F/E
Segmento apical caulinar	89,22 a	85,07 a	1,79 a
Epicótilo	72,55 b	58,40 b	0,65 b
Média (%)	80,88	71,74	1,22
AS	0,91	0,97	0,98

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Os resultados observados indicam que o estabelecimento *in vitro* pode ser efetuado, de maneira satisfatória, em qualquer um dos meios nutritivos testados. Em relação ao tipo de explante, o segmento apical caulinar apresentou desempenho superior no cultivo *in vitro* quando comparado ao epicótilo. O melhor desenvolvimento *in vitro* do explante contendo o ápice pode estar associado ao fato deste possuir tecido meristemático, apresentando, dessa forma, uma maior capacidade de expressar a totipotência presente nas células vegetais.

De maneira semelhante, no estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata*, os meios nutritivos MS/2 e WPM foram mais favoráveis ao desenvolvimento *in vitro* dessa espécie, em comparação ao MS. Já em relação aos tipos de explantes, os segmentos apicais caulinares apresentaram maior emissão de folhas em meio MS/2 (2,80). Os segmentos nodais, por sua vez, tiveram melhor desenvolvimento foliar em meio MS (3,55) e WPM (5,06) (GOLLE, 2010). Por outro lado, na regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida* Bretham Brenan (Angico-vermelho), o maior número médio de folhas (2,90) ocorreu em segmento cotiledonar em meio WPM/2 suplementado com 2,32 μM de CIN (KIELSE et al., 2009).

Para a espécie lenhosa *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch (Caixeta), o meio nutritivo WPM proporcionou melhores resultados de multiplicação

de brotações quando comparado ao meio MS. Na ausência da citocinina, o meio WPM proporcionou maior porcentagem de explantes com novas brotações (36,7%). Da mesma forma, a porcentagem de brotações com folhas maiores que 10 mm de comprimento foi maior no meio WPM (50,0%). Portanto, o meio nutritivo WPM foi considerado o mais recomendado para fase de multiplicação de explantes *D. morotoni* (MANTOVANI et al., 1999).

No caso das variáveis intumescimento *in vitro* dos explantes e número de brotos por explante, não houve efeito significativo do meio nutritivo ($p=0,0686$ e $p=0,3990$), do tipo de explante ($p=0,4740$ e $p=0,1137$) e nem da interação ($p=0,6671$ e $p=0,3711$). Pode-se observar uma alta média geral de intumescimento (77,10%), o que poderá comprometer o cultivo *in vitro*. Já para número de brotos por explante a média observada foi de 0,98. Este valor observado é considerado baixo e pode estar relacionado ao intumescimento dos explantes que, em muitas situações, prejudica o desenvolvimento *in vitro* da cultura.

Tal comportamento também foi observado em ensaios com *E. involucrata*, ao se testar diferentes meios nutritivos (MS, MS/2 e WPM) e tipos de explantes (segmento apical e nodal). Nesse caso, no meio WPM foi obtida a maior porcentagem de intumescimento no segmento apical (61,11%), no qual foi verificada a menor média de emissão de brotos por explante (0,55), quando comparado ao segmento nodal, cultivado neste mesmo meio e nos demais meios nutritivos testados (GOLLE, 2010).

Contudo, o intumescimento dos explantes cultivados *in vitro* pode, muitas vezes, ser um obstáculo na cultura de tecidos, impedindo o desenvolvimento dos propágulos inoculados. Entretanto, esse intumescimento, a princípio indesejado, poderá indicar uma resposta do explante ao estímulo a que este foi submetido. Na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. (Eucalipto), foi possível observar, durante o ensaio de organogênese indireta a partir de cotilédones, que a resposta morfogênica inicial foi o intumescimento dos explantes após 7 dias de cultivo *in vitro* (QUISEN, 2007)

4.3.2 Efeito de diferentes meios nutritivos no estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos

Na sobrevivência e no estabelecimento *in vitro*, os quais apresentaram mesmo valor de probabilidade de erro e acurácia seletiva ($p=0,0000$; $AS=0,99$), o segmento apical caulinar obteve desenvolvimento superior ao epicótilo, assim como verificado no ensaio anterior (Tabela 8). Foi possível observar elevada taxa de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* quando comparado ao epicótilo.

Tabela 8 – Médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, em porcentagem, de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2). Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Tipo de explante	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)
Segmento Apical Caulinar	98,35 a	88,40 a
Epicótilo	44,95 b	29,95 b
Média (%)	71,65	59,18
AS	0,99	0,99

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

No estabelecimento *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. e Zucc. (Açoitacavallo), foram testados os meios nutritivos MS e WPM, além dos explantes, segmento apical caulinar e nodal. Verificou-se que podem ser empregados tanto segmentos apicais caulinares como segmentos nodais e ambos os meios nutritivos (FLÔRES et al., 2011). Igualmente, para *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Canafístula), foram testados ápices caulinares e segmentos nodais em meios nutritivos MS e WPM. Foi observado que o segmento apical demonstrou melhor desenvolvimento *in vitro* do que o segmento nodal. Já para os meios nutritivos

testados houve maior sobrevivência e estabelecimento *in vitro* do meio MS, sugerindo que este é mais adequado para o estabelecimento de culturas *in vitro* para essa espécie (BASSAN et al., 2006).

Houve efeito significativo no caso do fator tipo de explante para quase todas as variáveis analisadas, exceto para intumescimento dos explantes ($p=0,8737$) e contaminação bacteriana ($p=0,1543$). Para todas, igualmente, não se verificou efeito significativo dos meios nutritivos e tampouco da interação entre os fatores principais ($p=0,3017$; $p=0,3969$ e $p=0,2338$; $p=0,3422$, respectivamente). O intumescimento apresentou uma elevada média geral (79,2%), ao passo que a contaminação bacteriana foi de 17,50%.

O intumescimento *in vitro* dos explantes, a princípio é indesejável, pois, em muitos casos, impede que a cultura seja subcultivada. No entanto, o intumescimento pode sinalizar um princípio de resposta do explante às condições em que lhe foram impostas. Na Figura 5, é possível visualizar o desenvolvimento das gemas laterais em alguns explantes intumescidos de *H. chrysotrichus*.

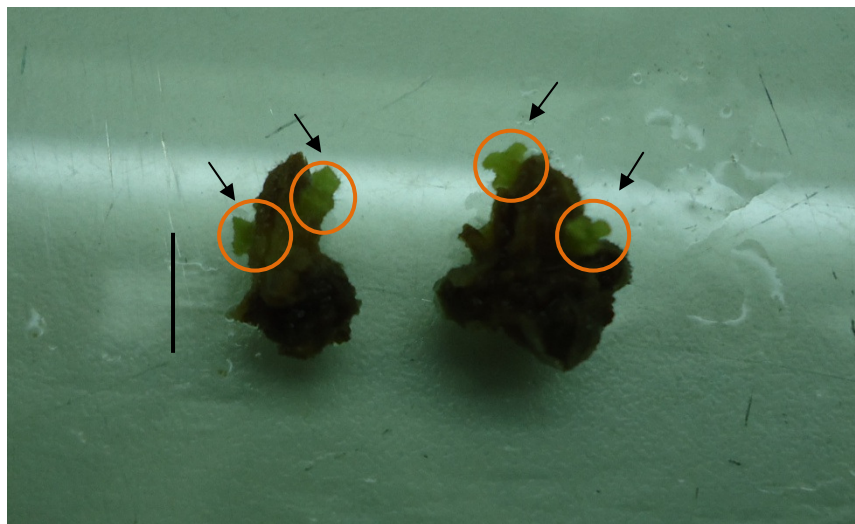


Figura 5 – Aspecto de epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, que apresentaram intumescimento *in vitro* aos 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS. Em detalhe, o princípio de desenvolvimento das gemas preexistentes nos explantes. Linha vertical = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Essa resposta também foi observada em *E. involucrata* durante a fase de multiplicação *in vitro* de segmentos nodais cultivados em meio nutritivo MS/2, ao qual foram adicionados ANA e TDZ. No estudo referido, ocorreu uma redução inicial no número de brotos emitidos, que foi associada ao intumescimento nas regiões de brotações dos explantes, onde existiam gemas dormentes. Todavia, com o aumento significativo na concentração da citocinina houve o favorecimento das brotações. O autor inferiu que, nas concentrações mais reduzidas o balanço entre auxina e citocinina não foi adequado para a emissão de um número maior de brotos, pois além do aporte exógeno, é bastante provável que os explantes possuam níveis endógenos de auxinas suficientes para tornar a citocinina exógena equilibrada, favorecendo o intumescimento (GOLLE, 2010). De maneira semelhante, durante ensaio de indução de brotações adventícias, segmentos internodais de *Ocimum basilicum* L. (Manjericão), inoculados em meio nutritivo MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) suplementado com BAP (0; 8,88 e 17,17 μ M), foi possível observar inicialmente um intumescimento das extremidades dos explantes, onde ocorreu a formação de múltiplas gemas adventícias, aos 10 dias de cultivo *in vitro*, sendo verificada a formação de brotações após 20 dias de cultivo (REBOUÇAS, 2009).

Houve efeito significativo em relação o fator tipo de explante para as variáveis oxidação fenólica ($p=0,0000$; $AS=0,99$) e clorose foliar ($p=0,0272$; $AS=0,90$) (Tabela 9). Segmentos apicais caulinares não apresentaram oxidação fenólica, mas elevada clorose foliar. Já os epicótilos manifestaram os dois fenômenos, sendo, no entanto, menos cloróticos do que os segmentos apicais.

A ausência de oxidação fenólica no segmento apical caulinar pode ser atribuída à existência de tecido meristemático, ou seja, tecido mais juvenil; portanto, sendo menos suscetível ao aparecimento de oxidação fenólica. Já que esta, de um modo geral, é associada a tecidos mais velhos, sendo também, altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado (TEIXEIRA, 2005). A clorose foliar, por sua vez, está mais relacionada a tecidos maduros ou a algum estresse como deficiência mineral, excesso de luminosidade, presença de fitorreguladores no meio nutritivo, dentre outras condições (TREVIZAN, 2005). No entanto, no presente estudo, houve maior clorose foliar no segmento apical caulinar, o qual contém o meristema apical, sendo, portanto, um tecido mais jovem. Talvez esta resposta esteja relacionada ao tempo de cultivo (30 dias) no mesmo meio nutritivo,

sugerindo que sejam realizados subcultivos e inoculação em meio nutritivo fresco em um período menor, para evitar a ocorrência desse fenômeno.

O escurecimento de explantes tem sido relatado como uma dificuldade no estabelecimento de culturas *in vitro* em algumas espécies lenhosas, como consequência de oxidações, provavelmente em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta a danos físicos, altas concentrações de reguladores de crescimento no meio nutritivo e pela oxidação de polifenóis e quinonas (OLIVEIRA et al., 2007).

De maneira semelhante, na multiplicação *in vitro* de *Cabralea canjerana* (Canjerana), foi possível obter melhores resultados com o meio nutritivo MS quando comparado ao meio WPM, o qual apresentou brotos cloróticos (ROCHA, 2005).

Por outro lado, no estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Canafístula), não foi observada a ocorrência de oxidação nos tratamentos testados, indicando que esta espécie não apresenta tendência à oxidação, provavelmente em decorrência da reduzida concentração de fenóis em seus tecidos (BASSAN et al., 2006).

Tabela 9 – Médias de oxidação fenólica e clorose foliar, em porcentagem, de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2). Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Tipo de explante	Oxidação fenólica (%)	Clorose foliar (%)
Segmento Apical Caulinar	0,00 a	71,75 b
Epicótilos	56,75 b	43,25 a
Média (%)	28,38	57,50
AS	0,99	0,90

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Para número de brotos por explante ($p=0,00221$; $AS=0,91$), número de explantes que emitiram brotações e número de folhas por explante – as duas últimas apresentando o mesmo valor de probabilidade de erro e de acurácia seletiva ($p=0,0000$; $AS=0,98$) – os segmentos apicais caulinares, também obtiveram melhor desenvolvimento *in vitro* do que os epicótilos (Tabela 10).

Tabela 10 – Médias de número de brotos por explante (NºB/E), número de explantes que emitiram brotações (NºEEB) e número de folhas por explante (NºF/E) em segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2). Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Tipo de explante	NºB/E	NºEEB	NºF/E
Segmento Apical Caulinar	2,30 a	2,25 a	4,25 a
Epicótilo	1,40 b	0,85 b	1,20 b
Média (%)	1,85	1,55	2,72
AS	0,91	0,98	0,98

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Com base nos resultados obtidos, para estas três variáveis, é possível inferir que o melhor desenvolvimento do segmento apical caulinar pode estar relacionado à presença do meristema apical. Dessa forma, este tipo de explante apresenta regiões com maior juvenilidade que os epicótilos, e assim, promovendo respostas superiores ao cultivo *in vitro* para essa espécie.

Na multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* (Açoita-cavalo), foi possível obter um maior número de brotações por segmento nodal (1,6) na ausência fitorreguladores em meio WPM, sendo esta resposta um bom indicativo para a micropropagação dessa espécie, tendo em vista a redução dos custos finais de produção de mudas micropropagadas (FLÔRES et al., 2011). Na micropropagação de *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequizeiro), em meio nutritivo WPM acrescido de

ANA a 0,27 μM e de BAP a 3,33 μM , foram obtidas 6 brotações por segmento nodal (SANTOS et al., 2006). Já na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Canafístula) foram observados 1,53 brotos por segmentos apicais caulinares na presença de 10 μM de TDZ em meio nutritivo MS (CURTI, 2011).

4.3.3 Efeito de BAP na multiplicação de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus*

Em relação à sobrevivência *in vitro* não houve efeito significativo para BAP ($p=0,6091$), para tipo de explante ($p=1808$) e nem para interação ($p=0,3246$), sendo observada uma elevada média geral de 93%.

No estabelecimento *in vitro* houve interação significativa ($p=0,0071$; $AS=0,87$), em que a equação estimada ajustou-se a um modelo cúbico (Figura 6).

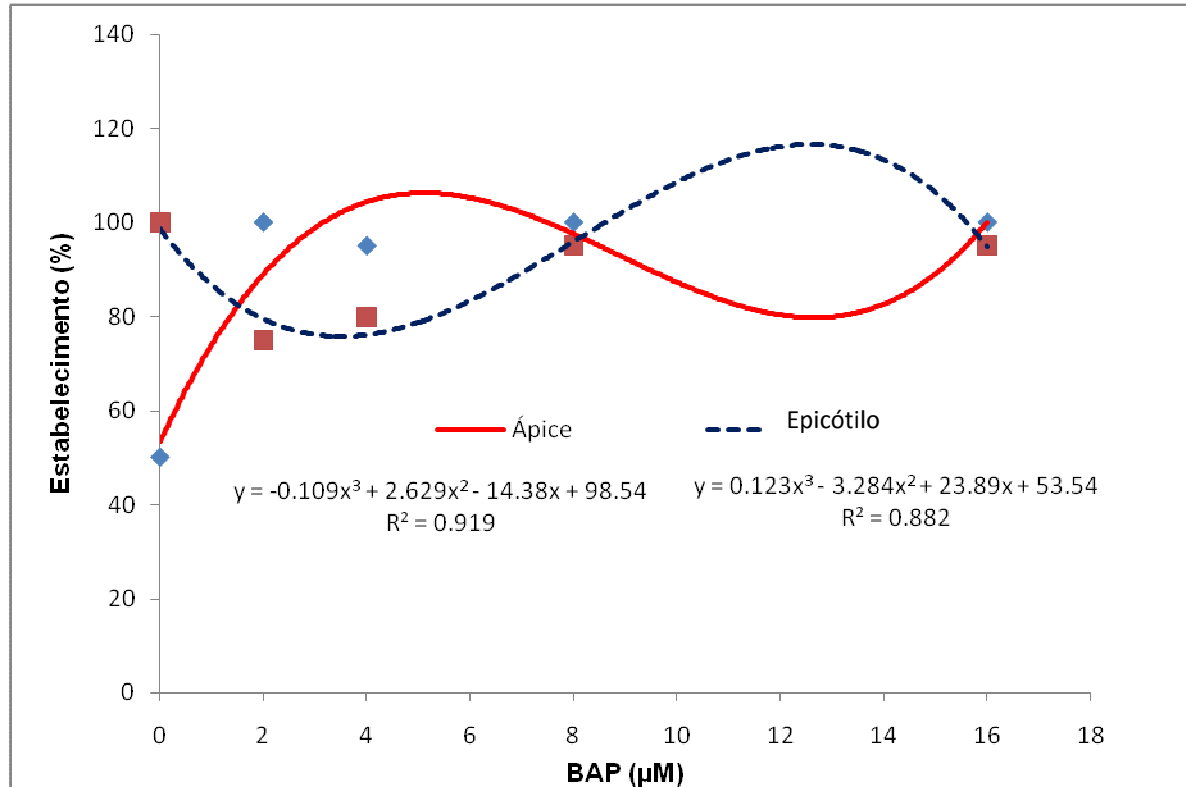


Figura 6 – Estabelecimento *in vitro* (%) de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP (µM) e 0,05 µM de ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Foi possível observar que os segmentos apicais caulinares apresentaram maior eficiência no estabelecimento *in vitro* em concentrações mais reduzidas de BAP em comparação aos epicótilos. À medida que estas concentrações foram aumentando, houve redução na taxa de estabelecimento até certo ponto, no qual esta volta a crescer a partir de 12 µM de BAP. Já para os epicótilos, o comportamento foi o oposto do ocorrido com os segmentos apicais caulinares, observando-se maior estabelecimento na presença de concentrações mais elevadas da citocinina. Estes resultados indicam, novamente, uma superioridade do explante contendo o tecido meristemático, denotando que aspectos relacionados ao tipo e a idade dos tecidos, que compõem o explante, influenciaram no desenvolvimento dos mesmos no cultivo *in vitro*.

Em *Luehea divaricata* (Açaita-cavalo), durante a fase de multiplicação *in vitro*, constatou-se que não é necessário adicionar a citocinina BAP no meio nutritivo, pois

na ausência desse regulador se observa melhor resposta dos explantes para a maioria das características avaliadas (FLÔRES et al., 2011).

Não foi verificada a presença de colônias bacterianas junto aos explantes durante o desenvolvimento do cultivo *in vitro*. Entretanto, houve contaminação fúngica, a qual não apresentou efeito significativo de BAP ($p=0,6396$), do tipo de explante ($p=0,1251$), e nem da interação ($p=0,6396$). Foi observada uma reduzida média geral (4,5%) de contaminação fúngica.

Para a oxidação fenólica e clorose foliar, também não foi observado efeito significativo de BAP ($p=0,5044$ e $p=0,6354$, respectivamente), do tipo de explante ($p=0,0614$ e $p=0,9163$), e nem da interação ($p=0,6901$ e $p=0,4862$); obtendo-se uma média geral de 24,50% para oxidação fenólica, e de 72,50% para clorose foliar, sendo esta considerada alta, podendo inviabilizar o desenvolvimento da cultura *in vitro* e impedir a realização de subcultivos. No entanto, esta resposta sugere que o tempo de cultivo *in vitro* (30 dias) no mesmo meio nutritivo pode estar acarretando brotações cloróticas nos explantes. Isto indica que devem ser realizados subcultivos e inoculações dos explantes para meio fresco antes dos 30 dias, a fim de evitar a ocorrência de clorose foliar.

Em relação à calogênese, houve interação significativa entre os fatores principais ($p=0,0247$; $AS=0,82$), sendo o ajuste da regressão dado por um polinômio de 3º grau para as concentrações de BAP (Figura 7). Houve maior formação de calos nos epicótilos à medida que aumentou a concentração da citocinina no meio nutritivo, ocorrendo o contrário nos segmentos apicais caulinares.

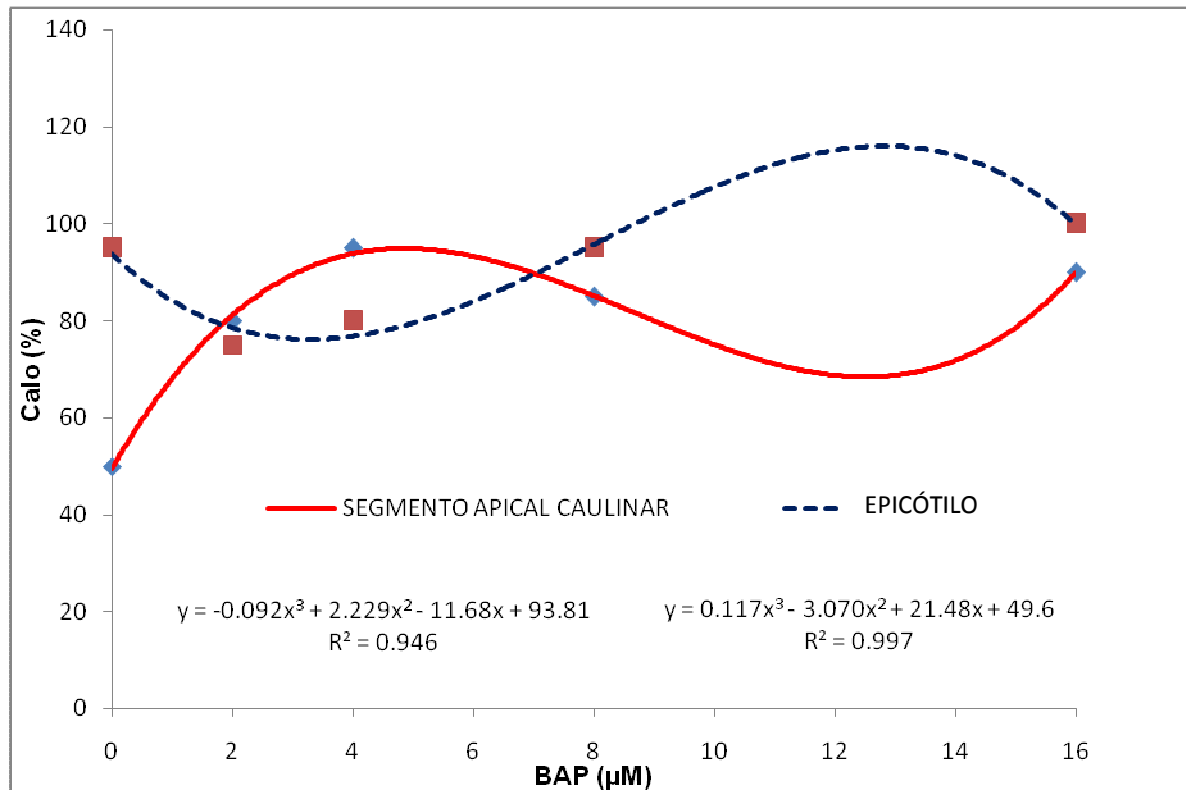


Figura 7 – Formação de calos (%) em segmentos apicais caulinares e epicótilos de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), acrescido de diferentes concentrações de BAP (µM) e 0,05 µM de ANA. Santa Maria, RS, UFSM, 2011.

Mesmo resultado foi verificado em *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá), em que, durante a fase de multiplicação *in vitro*, foi constatada maior presença de calos à medida que aumentou a concentração de BAP (CORDEIRO et al., 2004). Para *Acacia mearnsii* De Wild. (Acácia-negra) também se verificou que as citocininas (BAP, BA – 6-Benziladenosina, 2iP e CIN) utilizadas promoveram o desenvolvimento de calos em segmentos nodais inoculados em meio nutritivo B5 (GAMBORG et al., 1968), e que estes tinham maiores dimensões, principalmente nos tratamentos com concentrações elevadas de citocinina (BORGES et al., 2004). Foi observado em *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira) que as combinações de ANA (54 µM) + CIN (35 µM) e de ANA (27 µM) + BAP (22 µM), adicionadas ao meio nutritivo MS/2, induziram a formação de 62,5% de calos em segmentos cotiledonares e 85% nos internodais, respectivamente (ANDRADE et al., 2000).

Quanto ao número de brotos por explante, observou-se efeito significativo apenas para tipo de explante ($p=0,0000$; $AS=0,99$). Os epicótilos apresentaram a melhor média (1,5 broto por explante), enquanto o segmento apical caulinar formou somente 0,27 broto por explante. Esta resposta pode estar relacionada a um maior número de gemas preexistentes no epicótilo que no segmento apical caulinar, dessa forma, desenvolvendo-se maior número de brotos no explante com maior número de gemas.

Em *Cedrella fissilis* Vell. (Cedro), a adição de BAP aos meios nutritivos, tanto MS como WPM, proporcionou um aumento do número de brotações por explante. Dentre as citocininas, BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies lenhosas. Alguns dados sugerem que essa citocinina parece ser, por excelência, a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (AMARAL, 2006). A adição de BAP ($4,44 \mu\text{M}$) ao meio nutritivo WPM proporcionou maiores taxas de multiplicação e também maior expansão foliar em *Didymopanax morototoni* (Caixeta) (MANTOVANI et al., 1999). Por outro lado, no cultivo *in vitro* de *Acca sellowiana* (Berg) Burret (Goiabeira-serrana), segmentos nodais foram inoculados em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas (BAP, CIN e 2iP) em quatro concentrações (0,05; 0,5; 5 e $50 \mu\text{M}$). A adição de citocininas ao meio nutritivo não proporcionou aumento na proliferação de brotos em relação à testemunha (meio nutritivo WPM sem fitorreguladores), seja em número de brotos ou em número de nós (OLTRAMARI et al., 2000).

Para a formação de raízes não houve efeito significativo de BAP ($p=0,0607$), do tipo de explante ($p=0,2463$) e nem da interação entre os fatores principais ($p=0,2566$), observando-se uma reduzida média geral (7,79%). Tal resultado demonstra que *H. chrysotrichus* apresenta, possivelmente, aptidão para emissão de raízes *in vitro*. Entretanto, é necessária a realização de ensaios adicionais para aprimorar essa resposta.

4.4 Conclusões

- O estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares e epicótilos de *H. chrysotrichus* é igualmente satisfatório nos meios nutritivos MS e WPM em sua composição original de sais e na concentração reduzida à metade.
- Na sobrevivência e no estabelecimento *in vitro*, os segmentos apicais caulinares são superiores aos epicótilos.
- Segmentos apicais caulinares apresentam melhor desenvolvimento *in vitro* que os epicótilos.
- Segmentos apicais caulinares não apresentam oxidação fenólica, mas elevada clorose foliar na ausência de reguladores de crescimento. Já os epicótilos manifestam ambos os fenômenos, sendo, no entanto, menos cloróticos que os segmentos apicais.
- Há elevado intumescimento *in vitro* dos explantes de *H. chrysotrichus* na ausência de fitorreguladores de crescimento.
- No estabelecimento *in vitro* em meio nutritivo WPM/2 na presença de 0,05 μM de ANA, os segmentos apicais caulinares são mais eficientes sob concentrações mais reduzidas de BAP em comparação aos epicótilos.
- Há maior calogênese nos epicótilos à medida em que aumenta a concentração de BAP no meio nutritivo, ocorrendo o contrário nos segmentos apicais caulinares.
- Os epicótilos produzem maior número de brotações que os segmentos apicais caulinares em meio nutritivo WPM/2 na presença de 0,05 μM de ANA, independentemente da presença de BAP.
- Há elevada clorose foliar e moderada oxidação fenólica tanto em segmentos apicais caulinares quanto em epicótilos de *H. chrysotrichus* na presença de fitorreguladores.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo trouxe contribuições para a propagação *in vitro* de *Eugenia involucrata* e *Handroanthus chrysotrichus*. Os resultados obtidos indicam que, com alguns ajustes, é possível se obter respostas mais promissoras no cultivo *in vitro* dessas espécies.

Para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata* observou-se que nenhuma das citocininas testadas é necessária, uma vez que as médias observadas na testemunha (ausência desses fitorreguladores), em geral, não diferiram daquelas dos demais tratamentos. Entretanto, será necessário conduzir estudos adicionais, visando obter respostas mais satisfatórias de multiplicação *in vitro*. Esses estudos devem incluir combinações de citocininas e destas com auxinas, visando à otimização. Em relação aos estudos com *H. chrysotrichus*, foi possível extrair conclusões importantes sobre o tipo de explante mais adequado para o estabelecimento *in vitro*. Como os meios nutritivos apresentaram desempenho equivalente, sugere-se a utilização do meio MS reduzido à metade da concentração de sais original (MS/2), pela economia e praticidade. Mesmo assim, é recomendável a realização de mais ensaios, objetivando alcançar respostas nas demais etapas da micropropagação, como alongamento, multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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, 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, jan./mar., 2000.

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 55 - 81.

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.

BORGES, N.J.; SOBORSA, R. de; 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.

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

CARVALHO, M. F.C.; et al. **Embriogênese somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35 p. (Embrapa Algodão. Documento, 152).

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

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, jan./jun. 2004.

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

DONADIO, L.C. Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal-SP. **Acta Horticultura**, Curitiba, n.452, p.181-183, 1997.

ERIG, A. C. e SCHUCH, M. W. Estabelecimento in vitro de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**: 91-96. 2005.

ERIG, A. C. e 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, Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**: 221-227. 2003. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FLÔRES, A. V. **Introdução ao cultivo in vitro de açoita-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. e Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, jan.-mar., 2011.

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.

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

GOLLE, D.P.; et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1606-1613, ago, 2009.

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

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

JOLY, A.B. **Botânica:** introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777p.

KIELSE, P. et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rígida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1098-1104, jul, 2009.

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, dez. 2002.

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, J.D., MORAES, W.S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (musa aaa cv. caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 36 (3): 181-186. 2006.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 2:** Técnicas de produção e mercado: feijoa, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002.

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.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 83 - 105.

MORITZ, A. ET AL. Estabelecimento in vitro de *Ocotea odorífera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 59, p. 37-44, jul./dez.2009.

MROGINSKI, L. et al. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: ECHENIQUE, V. et al. **Biotecnología y mejoramiento vegetal**. INTA: Consejo Argentino para La Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2004. p.35-42.

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. Grow factor requeriment of *Citrus* tissue culture. **INTERNATIONAL CITRUS SIMPOSIUM**, 1. 1969. Eilat, Israel. **Proceedings... Eilat, Israel: ISHS 1969**. v. 3, p. 1155-1669.

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, p20-26 de abril/junho de 2008.

OLIVEIRA, F. F. M. et al. Micropropagação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, Mossoró, RS, v. 20, n. 3, p. 152-159, 2007.

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.

PEREIRA, J; FORTES, G. Toxicidade de antibióticos no cultivo in vitro da batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.38, n.11, 2003.

PEREIRA, J.E.S; MATTOS, M.L.T; FORTES, G.R.L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PINTO, A. F., RODIGHERI, H. R. Reflorestamento misto de espécies florestais nativas a pleno sol na região do norte pioneiro do Estado do Paraná. **Comunicado técnico**, 56. Embrapa Florestas. Colombo, PR. 2001.

QUISEN, R.C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 146f. Tese (doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2007.

REBOUÇAS, F.S. **Cultivo in vitro de plantas medicinais: *Ocimum basilicum* L. e *Cissus sicyoides* L.** 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2009).

RIBEIRO, J.E.L.S. **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 800p.

RIBEIRO, M. de F.; SOUZA, J. A. de; DONINI, L. P.; SOARES, G. C.; SCHUCH, M. W. **Desinfestação de explantes de cerejeira-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* dc.) visando o estabelecimento de plantas *in vitro***. XV CIC e VIII ENPOS: XV CIC e VIII ENPOS, 1, ISBN: Português, Impresso. 2006.

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 85 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

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, jan./fev. 2001.

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.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis na arborização urbana**. 2ed. Porto Alegre: SAGRA, 1989, p. 158-163.

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.

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.

SEREJO, J.A.S. et al. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p 80-97.

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, C.V.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 86 - 92, 2005.

SILVA, M.M. da S.; QUEIROZ, L.P. A Família Bignoniaceae na Região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Sitientibus série **Ciências Biológicas** 3 (1/2): 3–21. 2003.

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, jul./ago., 2007.

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, 2005a.

SOUZA, V. C. de; BRUNO, R. de L. A.; ANDRADE, L. A de. Vigor de sementes armazenadas de ipê amarelo *Tabebuia serratifolia* (VAHL.) NICH. **Revista Árvore**. Viçosa, MG, v. 29, n. 6. p. 833-841, 2005b.

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

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

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

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília:Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2005.

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.

VELIOGLU, Y.S.; et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 16, p. 4113-4117, 1998.

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**, Santa Maria, vol. 28, nº 3, p.191-197, 2006.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272 p.

ANEXO

Anexo A - Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981).

	MS (mg L ⁻¹)	WPM (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556,000
NH ₄ NO ₃	1650,000	400,000
KNO ₃	1900,000	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000	96,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000	170,000
K ₂ SO ₄	-	990,000
Micronutrientes		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	8,600
H ₃ BO ₃	6,200	6,200
KI	0,830	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,250
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
Ferro-EDTA		
Na ₂ EDTA	37,250	37,250
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850	27,850
Vitaminas		
Tiamina-HCl	0,100	1,000
Piridoxina-HCl	0,500	0,500
Ácido Nicotínico	0,500	0,500
Glicina	2,000	2,000
Mio-Inositol	100,000	100,000

*Dados adaptados de Xavier et al. (2009).