

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

**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Parapiptadenia rigida*
(Bentham) Brenan**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paula Kielse Vargas do Nascimento

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

*Cada árvore é um ser
para ser em nós. Para ver uma árvore
não basta vê-la, a árvore é uma lenta reverência,
uma presença remanescente, uma habitação perdida
e encontrada. À sombra de uma árvore o tempo já
não é o tempo, mas
**a magia de
um instante
que começa sem fim.***

(António Ramos Rosa)

**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Parapiptadenia rigida*
(Bentham) Brenan**

por

Paula Kielse Vargas do Nascimento

Dissertação de mestrado apresentada ao 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

Orientador: Elci Terezinha Henz Franco

Santa Maria, RS, Brasil

2008

N244r	Nascimento, Paula Kielse Vargas do, 1975- Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Parapiptadenia rigida</i> (Bentham) Brenan / por Paula Kiese Vargas do Nascimento ; orientador Elci Terezinha Henz Franco. – Santa Maria, 2008. 76 f. ; il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2008. 1. Engenharia florestal 2. Angico-vermelho 3. Espécie nativa 4. Micropropagação 5. Cultura de tecidos 6. Fitorreguladores I. Franco, Elci Terezinha Henz, orient. II. Título CDU: 581.1
-------	--

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2008

Todos os direitos autorais reservados a Paula Kielse Vargas do Nascimento. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor. End.eletr. paulakielse@yahoo.com.br

Aos meus pais, a base de tudo, pelo exemplo de vida, de amor e de muito trabalho.

A minha filha Carolina: a flor do Cerrado que embeleza a minha vida.

Ao querido Vinicius por tudo que representa para mim.

Ao José Maria pelo apoio e amizade.

Dedico

AGRADECIMENTOS

O ano de 2006 foi marcado por importantes acontecimentos na minha vida, dentre eles, o ingresso no mestrado. Agradeço ao Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade, e à CAPES, pelo fornecimento do apoio financeiro indispensável para esta pesquisa.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Dr.^a Elci Terezinha Henz Franco, especialmente pela disponibilidade para realizar este trabalho. Obrigada pelo incentivo, pelas críticas e sugestões, pela amizade e confiança.

Agradeço a Dr.^a Juçara Terezinha Paranhos, com sua valiosa contribuição nas diferentes etapas desta pesquisa. Ms. Vanessa do Amaral, obrigada por me fornecer o suporte necessário para o início da minha trajetória biotecnológica e pela amizade construída no entremeio dessa caminhada. Agradeço à laboratorista Tânia pela prontidão em auxiliar e, acima de tudo, pela boa convivência e companheirismo; e às estagiárias Ana Paula e Débora, pela ajuda inestimável na realização dos experimentos.

Agradeço a minha filha, Carolina a flor mais linda do cerrado, por tanto amor e dedicação, você é o meu orgulho. Ao Vinicius por me conduzir de forma tão carinhosa em todos os momentos da minha vida, você é a nossa estrela repleta de amor, sabedoria e compreensão.

Agradeço aos meus pais por tanto amor e dedicação. Vocês são maravilhosos!

Meu terno agradecimento à tia Loide, por todo o apoio e carinho em todas as etapas da minha vida; a Vânia Maria Lourenço, por toda atenção e carinho, é muito bom ter você sempre presente; aos meus 'irmãos' Paulo Vitor, Patrícia, Gui e Giovana pela inestimável amizade. Agradeço ainda aos meus irmãos Cláudio e Andrey, homens de bom coração, que com fé e perseverança escrevem a sua história; às minhas cunhadas Liliane e Nayane; ao José Maria, Izabel, Otávio e Kathy; e as minhas queridas sobrinhas Julia e Ana Luísa!

Não posso deixar de agradecer os amigos distantes, em especial aos calangos Madalena, Débora Mabel, Henrique (Bronquinha), Pedrão, Miriam, Anna Paula, Eduardo Braga, Julio Sam, Cibelli Severo, Diogo Kurihara, Cláudio Augusto, Natália, Alexandre (Pedra), Dani (Baiana), Dani (mudinha), Vânia e Hercília, pela maravilhosa convivência, amizade e carinho.

Pois é, existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes apenas por cruzarem o nosso caminho. Conheci pessoas maravilhosas durante a realização deste mestrado, pessoas especiais, que me receberam com carinho e amizade. Dessa forma, agradeço ao professor Dr. Solon Longhi; aos funcionários do Viveiro Florestal, Hélio, Seu João, Gervásio e Maria; aos colegas "regressionais"; ao Eduardo Frassetto; e aos parceiros de camperizada Fabricia e Cuca.

Gostaria de fazer um agradecimento especial 'As Sofias' (Lu Chami, Camilete, Michel, Ju e Ana Carolinda) pelo carinho, pela amizade, pela simplicidade de cada gesto. Ao querido amigo Evaldo, agradeço por toda a atenção e por ter me conduzido a uma das artes que mais aprecio, a música gaúcha.

Finalmente, agradeço a Luiz Marengo, Joca Martins, Alex Hohenbergger, João de Almeida Neto, Adair de Freitas, Pirsca Grecco, César Oliveira, Rogério Melo, Cristiano Quevedo, Ângelo Franco, Maria Luiza Benitez, Miguel Marques, *Miguel Bicca*, Dante Ledesma e Mercedes Sosa, pela agradável parceria durante todo o meu processo criativo.

É isso aí...

Quien tenga un sueño, lo sueñe, pero no lo haga sin amor.

(Rogério Ávila e Luciano Gomes)

RESUMO

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

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan

AUTORA: PAULA KIELSE VARGAS DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: ELCI TEREZINHA HENZ FRANCO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de março de 2008.

A *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan é uma espécie florestal nativa que pode ser utilizada na restauração de matas ciliares e recuperação de áreas degradadas. Este trabalho visa ao desenvolvimento da regeneração *in vitro* da *P. rigida* utilizando explantes de plântulas assépticas. No experimento 1, sementes de *P. rigida* foram desinfestadas em 0; 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio, durante 5, 10, 15 e 30 min. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, sendo quatro repetições por tratamento, cada repetição com cinco sementes. Avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas aos 10, 20 e 30 dias, e a porcentagem de sementes desinfestadas aos 30 dias. No experimento 2, realizou-se a indução de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal utilizando 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP ou KIN. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 16 tratamentos, com cada tratamento constituído de cinco repetições, cada repetição com seis frascos. Aos 60 dias avaliou-se a porcentagem de explantes com broto, o comprimento dos brotos, o número de folhas por broto, o aspecto morfológico dos brotos, a porcentagem de explantes com calo na base e o tamanho dos calos. O experimento 3, enraizamento de explantes, foi dividido em dois testes. No teste 1 utilizaram-se segmentos nodal cotiledonar e nodal advindos da fase de indução de brotos e, no teste 2, brotos provenientes de segmento nodal cotiledonar. Para indução rizogênica foram utilizadas as doses de 0; 0,25; 1,0; 1,75 mg.L⁻¹ de AIB. O delineamento foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos, sendo, no teste 1, cada tratamento composto por quatro repetições, com três tubos por repetição e, no teste 2, por quatro tratamentos, cada tratamento constituído de quatro repetições, com cinco tubos por repetição. Aos 60 dias foi avaliada a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por explante, o comprimento da raiz mais longa, a porcentagem de explantes com calo na base e o tamanho médio dos calos. No experimento 4, as plantas regeneradas a partir dos diferentes tipos de explantes foram transferidas para substrato composto por Plantmax[®] e vermiculita e, aos 60 dias, avaliadas quanto a porcentagem de sobrevivência. Os dados obtidos, nos diferentes experimentos, foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e ao teste de Tukey. No experimento 1, a maior porcentagem de germinação ocorreu em sementes embebidas em água com tween 20, durante 30 min., seguido do tratamento utilizando 2,5% de hipoclorito de sódio, por 30 min., com 76 e 70% de sementes germinadas respectivamente. A maior porcentagem de sementes desinfestadas (81%) ocorreu no tratamento com 2,5% de hipoclorito de sódio, durante 30 min. No experimento 2, foi verificado que a dose de 0,50 mg.L⁻¹, independente do tipo de fitorregulador, promoveu maior tamanho dos brotos (0,50 cm) e maior número de folhas por broto (3,60 folhas). No experimento 3, o maior número de raízes foi observado em segmentos nodal cotiledonar inoculados em meio contendo 1,0 mg.L⁻¹ de AIB (2,35 raízes). No experimento 4, a maior sobrevivência durante o processo de aclimatização (68%) ocorreu em plantas regeneradas a partir de segmento nodal cotiledonar em meio contendo 1,0 mg.L⁻¹ AIB. O segmento nodal cotiledonar é o melhor tipo de explante para a regeneração *in vitro* de *P. rigida* se comparado ao segmento nodal.

Palavras-chave: angico-vermelho, espécie nativa, micropropagação, cultura de tecidos, fitorreguladores.

ABSTRACT

Master Thesis
Program Graduate of Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

***IN VITRO* REGENERATION OF *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan**

AUTHOR: PAULA KIELSE VARGAS DO NASCIMENTO

ADVISER: ELCI TEREZINHA HENZ FRANCO

Place and date of defense: Santa Maria, March 04th, 2008.

The *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan is a native forest specie that can be used in the restoration of gallery forests and degraded areas. This work has the objective to develop the regeneration *in vitro* of *P. rigida* using explants of aseptic seedlings. In experiment 1, seeds of *P. rigida* were disinfected in 0.0, 2.5 and 5.0% of sodium hypochlorite during 5, 10, 15 and 30 minutes. A design completely randomized was used with 12 treatments and four repetitions by treatment, each repetitions had five seeds. It was evaluated the percentage of seeds sprouted at 10, 20 and 30 days, and the percentage of seeds aseptic in 30 days. In experiment 2, shoots of cotyledonal nodal segment and nodal segment were induced using 0.0, 0.25, 0.50 and 1.0 mg.L⁻¹ of BAP or KIN. The design was completely randomized and 16 treatments were used, each treatment was constituted by five repetitions with six bottles each. The percentage of explants with shoots, the size of shoots, the number of leaves per shoots, the morphologic appearance of shoots, the percentage of callus on the base of explants and the size of callus were availed at 60 days. In experiment 3, named by rooting of explants, two tests were performed. Test 1 used cotyledonal nodal segment and nodal segments, both from shoots induction phase, and test 2 used shoots from cotyledonal nodal segment. At experiment 3, it was used IBA with concentration of 0, 0.25, 1.0 and 1.75 mg.L⁻¹ and a design completely randomized, with 8 treatments. Test 1 was constituted by four repetitions with three bottles per repetition and test 2 was constituted by four treatments, each treatments constituted by four repetitions with five bottles per repetition. The percentage of rooting, the number of roots per explants, the length of the longest root, the percentage of explants with callus on the base and the average size of callus were availed at 60 days. In experiment 4, the plants were transferred to the substrate composed by Plantmax[®] and vermiculite, and the percentage of survival was availed at 60 days. The analysis of variance, the Tukey test and the regression analyzes were applied on data obtained from all experiments. In experiment 1, the highest percentages of germinations (76%) were found in the treatment with water and Tween 20 during 20 minutes. The second higher was the treatment with 2.5% of sodium hypochlorite during 30 minutes (70%). The highest percentage of disinfected seeds (81%) occurred in treatment with 2.5% of sodium hypochlorite during 30 minutes. In experiment 2, the dose of 0.50 mg.L⁻¹ formed the largest size sprouts (0.50 cm) and the biggest number of leaves for sprout (3.60 leaves), independent of kind of phytohormones. Experiment 3 presented the biggest number of roots was observed in segments cotyledonal nodal cotyledonary inoculated in medium containing 1.0 mg.L⁻¹ of IBA (2.35 roots). In experiment 4, the highest percentage of survival was in plants derived from cotyledonal nodal segment in medium of rooting containing 1.0 mg.L⁻¹ AIB. The segment cotyledonal nodal is better kind of explant for regeneration *in vitro* of the *P. rigida* than nodal segment.

Key words: angico-vermelho, native specie, micropropagation, tissue culture, phytohormones.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – *Parapiptadenia rigida*: (A) árvore; (B) filotaxia e floração; (C) aspecto do fruto maduro; (D) sementes; (E) aspecto da casca do fuste; e (F) aspecto da madeira 23
- FIGURA 2 – Esquema do seccionamento realizado para obtenção dos explantes utilizados no teste de indução de brotos: (A) plântula de *Parapiptadenia rigida* germinada *in vitro* em meio WPM (LLOYD e McCOWN, 1980); (B) segmento nodal; (C) segmento nodal cotiledonar. Santa Maria, RS, 2008 32
- FIGURA 3 – Esquema dos tratamentos para a indução de raízes em segmentos nodal cotiledonar, nodal e brotos de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio $\frac{1}{4}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado e diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, 2008 35
- FIGURA 4 – Porcentagem de sementes de *Parapiptadenia rigida* desinfestadas, em função dos tratamentos com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão, avaliadas 30 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008 38
- FIGURA 5 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida*: (A) avaliação aos 10 dias; (B) avaliação aos 20 dias; (C) avaliação aos 30 dias, de acordo com os tratamentos utilizados para desinfestação. Santa Maria, RS, 2008 40

FIGURA 6 –	Porcentagem média de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> com broto, em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN), independente da dose, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	41
FIGURA 7 –	Tamanho médio de brotos formados em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), independente do tipo e da dose de fitorreguladores, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	43
FIGURA 8 –	Brotos formados em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), avaliados aos 60 dias após a inoculação: (A) broto em segmento nodal cotiledonar inoculado em meio contendo 0,50 mg.L ⁻¹ de cinetina (KIN); (B) broto em segmento nodal inoculado em meio contendo 1,0 mg.L ⁻¹ de KIN. Santa Maria, RS, 2008. Barra = 1cm	43
FIGURA 9 –	Tamanho médio de brotos formados em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L ⁻¹ , independente do tipo de fitorregulador, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	45
FIGURA 10 –	Brotos formados em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) e avaliados 60 dias após a inoculação: (A) brotos malformados em segmento nodal cotiledonar em meio contendo 1,0 mg.L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); (B) brotos normais formados em segmento nodal cotiledonar (esquerda) e nodal (direita) em meio contendo 1,0 mg.L ⁻¹ de cinetina (KIN). Santa Maria, RS, 2008. Barra = 1 cm	47

FIGURA 11 –	Porcentagem média de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> com calo na base, inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), independente da dose, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	48
FIGURA 12 –	Porcentagem média de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> com calo na base, inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L ⁻¹ , independente do tipo de fitorregulador, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	49
FIGURA 13 –	Tamanho médio de calos formados na base de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L ⁻¹ , independente do tipo de fitorregulador, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	49
FIGURA 14 –	Porcentagem de enraizamento de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ¼ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de 1,5 g.L ⁻¹ de carvão ativado e diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB), avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	50
FIGURA 15 –	Enraizamento em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> inoculados em meio ¼ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB), avaliado aos 60 dias após a inoculação: (A) raízes em segmento nodal cotiledonar (1,0 mg. L ⁻¹ de AIB); (B) raiz em segmento nodal (1,75 mg. L ⁻¹ AIB); (C) raiz em segmento nodal cotiledonar (1,0 mg. L ⁻¹ AIB); (D) calos formados na base de segmento nodal cotiledonar (0,25 mg. L ⁻¹ de AIB). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, 2008	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição geográfica e alguns nomes populares comumente utilizados para a <i>Parapiptadenia rigida</i>	21
TABELA 2 – Concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão utilizados na desinfestação de sementes de <i>Parapiptadenia rigida</i> . Santa Maria, RS, 2008	31
TABELA 3 – Tratamentos utilizados no teste de indução de broto em segmentos nodal cotiledonar, nodal e brotos de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de diferentes doses das citocininas 6- benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN). Santa Maria, RS, 2008	33
TABELA 4 – Porcentagem média de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> com broto, inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN), independente da dose, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	42
TABELA 5 – Número médio de folhas em brotos de <i>Parapiptadenia rigida</i> obtidas de segmentos inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função do tipo de fitorregulador e das doses de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	46

TABELA 6 – Número de raízes, comprimento da raiz mais longa e tamanho de calo em segmentos nodal cotiledonar e nodal de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio ¼ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de ácido indolbutírico (AIB), avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008	53
TABELA 7 – Porcentagem de sobrevivência de plantas de <i>Parapiptadenia rigida</i> regeneradas <i>in vitro</i> , após 60 dias de aclimatização, em função da origem (segmento nodal cotiledonar ou nodal) e das doses de AIB (0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L ⁻¹) utilizadas durante a fase de enraizamento. Santa Maria, RS, 2008	56

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE A – Análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* submetidas a 0; 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 5, 10, 15 e 30 min., avaliadas 30 dias após a inoculação 69
- APÊNDICE B – Análise de variância da porcentagem de sementes de *Parapiptadenia rigida* assépticas, submetidas a 0; 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 5, 10, 15 e 30 min., avaliadas 30 dias após a inoculação 69
- APÊNDICE C – Análise de variância da porcentagem média de explantes de *Parapiptadenia rigida* com formação de broto, em meio ½ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitorregulador (BAP ou KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação 69
- APÊNDICE D – Análise de variância do tamanho de brotos formados em segmento nodal cotiledonar e nodal de *Parapiptadenia rigida*, meio ½ WPM, em função do tipo de fitorregulador (BAP ou KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação..... 70
- APÊNDICE E – Análise de variância do número de folhas em brotos de *Parapiptadenia rigida* em explantes inoculados em meio ½ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitorregulador (6-benzilaminopurina - BAP ou cinetina - KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação 70

APÊNDICE F –	Análise de variância da porcentagem de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> com calo na base, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitorregulador (6-benzilaminopurina - BAP ou cinetina - KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L ⁻¹), avaliados aos 60 dias após a inoculação ..	70
APÊNDICE G –	Análise de variância do tamanho do calo na base de explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitorregulador (6-benzilaminopurina - BAP ou cinetina - KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L ⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação	71
APÊNDICE H –	Análise de variância da porcentagem de enraizamento em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio $\frac{1}{4}$ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias após a inoculação	71
APÊNDICE I –	Análise de variância do número de raízes em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> , inoculados em meio $\frac{1}{4}$ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias após a inoculação	71
APÊNDICE J –	Análise de variância da porcentagem de formação de calo em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> em meio $\frac{1}{4}$ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias pós a inoculação	72

APÊNDICE K – Análise de variância do tamanho de calo formado em explantes de <i>Parapiptadenia rigida</i> em meio ¼ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias após a inoculação	72
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Considerações sobre a espécie	20
2.2	Desinfestação e germinação de sementes <i>in vitro</i>	22
2.3	Seleção de explantes	24
2.4	Meio de cultura e fitorreguladores	25
2.5	Aclimatização	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Local do estudo	30
3.2	Meio de Cultura e condição de cultivo	30
3.3	Material vegetal	30
3.4	Experimento 1 – Efeito de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfestação e germinação de sementes	31
3.5	Experimento 2 – Efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN) na indução de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal	32
3.6	Experimento 3 – Efeito do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de segmentos nodal cotiledonar, nodal e brotos	34
3.7	Experimento 4 – Aclimatização das plantas regeneradas <i>in vitro</i>	36

3.8	Análise estatística	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Experimento 1 - Efeito de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfestação e germinação de sementes	37
4.2	Experimento 2 – Efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN) na indução de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal	41
4.2.1	Porcentagem de explantes com brotos.....	41
4.2.2	Tamanho dos brotos	42
4.2.3	Número de folhas e aspecto morfológico dos brotos	45
4.2.4	Formação de calo na base dos explantes.....	47
4.3	Experimento 3 – Efeito de diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de explantes	50
4.3.1	Teste 1 – Enraizamento de segmentos nodal cotiledonar e nodal	50
4.3.2	Teste 2 – Enraizamento de brotos	53
4.4	Experimento 4 – Aclimatização das plantas regeneradas <i>in vitro</i>	55
5	CONCLUSÃO	57
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7	APÊNDICES	69

1 INTRODUÇÃO

Na cultura de tecidos de plantas, a micropropagação é a tecnologia de maior destaque, servindo de mecanismo de propagação eficiente e com aplicação prática reconhecida. Tem sido considerada uma importante tecnologia para a propagação de várias espécies lenhosas, possibilitando a multiplicação (GUPTA et al., 1993; RIBAS, 1999), a fixação de genótipos superiores em gerações subseqüentes (HARTMANN et al., 1997), a utilização de menor quantidade de material vegetal, além de promover uma maior uniformidade das plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A micropropagação é realizada partindo do cultivo de plantas ou partes de plantas, denominados explantes, em meio de cultura apropriado e asséptico, sob condições de temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância controlados em sala de crescimento (THORPE et al., 1991). É uma tecnologia que se baseia na teoria da totipotência, formulada por Haberlandt (1902), em que todas as células vivas têm a capacidade de reproduzir um organismo inteiro, desde que possuam as informações genéticas necessárias para que sofram transformações morfogênicas, originando órgãos ou tecidos vegetais.

A morfogênese é a conseqüência da integração entre os processos de divisão e diferenciação celular. Os genes responsáveis pela diferenciação de tecidos e órgãos se localizam nas células somáticas que, sob condições adequadas de cultivo, são expressos (GUERRA et al., 1998). A atividade e expressão morfogênica de certos genes pode seguir diferentes rotas: organogênese, calogênese ou embriogênese somática, sendo o controle da morfogênese realizado por fatores internos, como características genótípicas e condições fisiológicas; e fatores externos, a exemplo dos meios de cultura e fitorreguladores (TRAN THANH VAN, 1980).

A micropropagação constitui uma estratégia importante para solucionar problemas no âmbito da propagação, assim como do melhoramento genético clássico e da biotecnologia de plantas, podendo ser uma excelente opção para contornar dificuldades de enraizamento de algumas espécies (BONGA e VON ADERKAS, 1992), além de ser base para o melhoramento genético e conservação de germoplasma (GIACOMETTI, 1990). Atualmente, a maior concentração da atividade de micropropagação reside na limpeza clonal e na produção de mudas de

espécies ornamentais herbáceas e arbustivas. Para a mangabeira (*Hancornia speciosa*), por exemplo, o uso de marcadores moleculares e da cultura de tecidos pode diminuir o tempo de avaliação dos indivíduos obtidos nos cruzamentos e auxiliar na seleção dos genitores, definindo as plantas que serão cruzadas (EMBRAPA, 2006). A aplicação da micropropagação também se destaca pela possibilidade de propagação de novas cultivares por hibridação, na recuperação de substâncias farmacêuticas, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, assim como no auxílio na salvaguarda do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana (FRANÇA, 2001).

Na área florestal, é uma tecnologia bastante recente, servindo como ferramenta básica aos programas de melhoramento de espécies comerciais exóticas, com a maximização ou manutenção do valor genético do clone a ser propagado. O melhoramento do pinus (*Pinus elliottii* e *Pinus taeda*), nos Estados Unidos, e da acácia-negra (*Acacia mearnsii*), na África do sul, tem contribuído significativamente à silvicultura intensiva do país (BRANDT e MARSCHELAK, 2006). No Brasil, os estudos de micropropagação são quase que exclusivamente direcionados ao *Pinus* spp. e *Eucalyptus* ssp. Paula (2007) menciona que a micropropagação do *Eucalyptus* spp. tem sido utilizada em três principais situações: 1) quando a espécie possui dificuldade de propagação pela macropropagação; 2) quando a árvore selecionada não permite o uso satisfatório de outras técnicas de propagação vegetativa em seu resgate e multiplicação vegetativa; 3) quando se deseja propagação em larga escala em menor espaço de tempo, abreviando o seu uso comercial.

Em consequência da ênfase atual nos problemas ambientais, em especial a necessidade de recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem natural, tem crescido o número de trabalhos de micropropagação com espécies florestais nativas, a exemplo da *Cedrela fissilis* (NUNES et al., 2002; AMARAL, 2006), *Cedrela odorata* (LAMEIRA et al., 2000), *Swietenia macrophylla* (LOPES, 2000), *Acacia mearnsii* (COUTO et al., 2004), *Schizolobium amazonicum* (CORDEIRO et al., 2004), *Didymopanax morototoni* (FRANCO et al., 2006; MANTOVANI, 1997) e *Miconia* sp. (CID et al., 1997).

Dessa forma, a utilização de tecnologias que otimizem a propagação da *P. rigida* é de fundamental importância ecológica, econômica e social, sendo a reposição dessa espécie uma necessidade reconhecida, especialmente em razão do

seu papel pioneiro em áreas abertas, possibilitando a reposição de mata ciliar e a recuperação de áreas degradadas.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste estudo visa ao desenvolvimento de um protocolo de obtenção de plantas de *Parapiptadenia rigida* utilizando explantes excisados de plântulas assépticas germinadas *in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

- a) Verificar o efeito de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfestação e germinação de sementes *in vitro*;
- b) Verificar o efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN) na indução de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal;
- c) Avaliar o efeito de diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de segmento nodal cotiledonar, nodal e brotos;
- d) Aclimatizar plantas obtidas *in vitro* em substrato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações sobre a espécie

A *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan é uma espécie florestal da família Mimosaceae (Leguminosae: Mimosoideae) que possui uma ampla dispersão geográfica e uma variedade de nomes comuns (Tabela 1). A árvore (Figura 1A) pode atingir 30 m de altura e 110 cm de diâmetro na idade adulta, possui copa corimbiforme com folhas compostas, alternas, bipinadas, de coloração verde-escura, com 3 a 6 pares de pinas opostas; cada pina com 12 a 30 pares de folíolos (Figura 1B) (LORENZI, 2000). Possui floração intensa e anual que ocorre de fevereiro a março, em Minas Gerais e São Paulo; de outubro a dezembro, no Paraná; de novembro a dezembro, em Santa Catarina e, de outubro a janeiro, no Rio Grande do Sul. Os frutos secos e deiscentes (Figura 1C) amadurecem de outubro a novembro, em Minas Gerais; de junho a novembro, em São Paulo; março a setembro, no Paraná; de maio a agosto, em Santa Catarina e, de maio a julho, no Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2003).

A reprodução se inicia após o terceiro ano de idade da planta. As sementes (Figura 1D) são anemocóricas, variando de 20 a 47 mil sementes por quilo. O armazenamento é realizado em câmara fria sob temperatura de 4 °C e umidade relativa de 96%. Não é necessária a quebra de dormência, sendo observado índices médio de germinação superiores a 56% (CARVALHO, 2003). Estudos de germinação de sementes de *P. rigida* indicam perda de viabilidade aos 60, 90 ou 120 dias quando as sementes são estocadas em ambientes não-controlados. Além disso, apesar da árvore produzir anualmente grande quantidade de sementes viáveis, em virtude do comportamento recalcitrante com relação ao armazenamento, essas perdem a viabilidade em um curto período de tempo, mesmo quando armazenadas sob condições de umidade elevada (CARVALHO, 2003), dificultando sua propagação via sexuada.

A casca (Figura 1E) é rica em tanino, sendo aproveitado em curtumes (LORENZI, 2000). É utilizada pela medicina popular e indústria farmacológica, atuando no combate a disenterias, raquitismo, reumatismo, hemorragias, afecções bronco-pulmonares, sinusite e asma, assim como na cura de inchaço das pernas. A

goma resinosa que exsuda da casca, pode ser utilizada como expectorante (CARVALHO, 2003).

Tabela 1 – Distribuição geográfica e alguns nomes populares comumente utilizados para a *Parapiptadenia rigida*

Localização geográfica	Nome popular
No Brasil	
Bahia	angelim-amarelo, angico, angico-cedro, angico-verdadeiro, angico-vermelho.
Paraná	angico-cambi, corocaia, frango-assado, gorucaia, gurocaia, monjoleiro, angico-vermelho, guarucáa, guarucaia.
Mato Grosso do Sul	angico-vermelho, curupáí, gorocaia, guaiçara, angico-do-campo, brincos-de-sagüi.
Minas Gerais	angico-branco, angico-de-curtume.
Rio de Janeiro	angico-amarelo, angico-ferro, cambuí.
Rio Grande do Sul	angico, angico-roxo, angico-vermelho.
Santa Catarina	angelim-amarelo, angico, angico-sujo, angico-do-banhado, angico-dos-montes, angico-vermelho.
São Paulo	angico-branco, angico-preto, guarucáa, guarucaia, angico-vermelho.
No exterior	
Argentina	Anchico colorado, curupay-rá
Bolívia	Kari kara
Paraguai	Kurupay'ra
Uruguai	Anchico

Fonte: Carvalho, 2003.

Fenner et al. (2006) realizaram levantamento bibliográfico etnobotânico de plantas utilizadas pela população brasileira no tratamento de infecções fúngicas, citando a *P. rigida* como uma das espécies com reconhecido potencial antifúngico. Apesar da sua vasta aplicação medicinal, a *P. rigida* possui química pouco conhecida. Gomes et al. (2007) utilizaram técnicas cromatográficas dos extratos

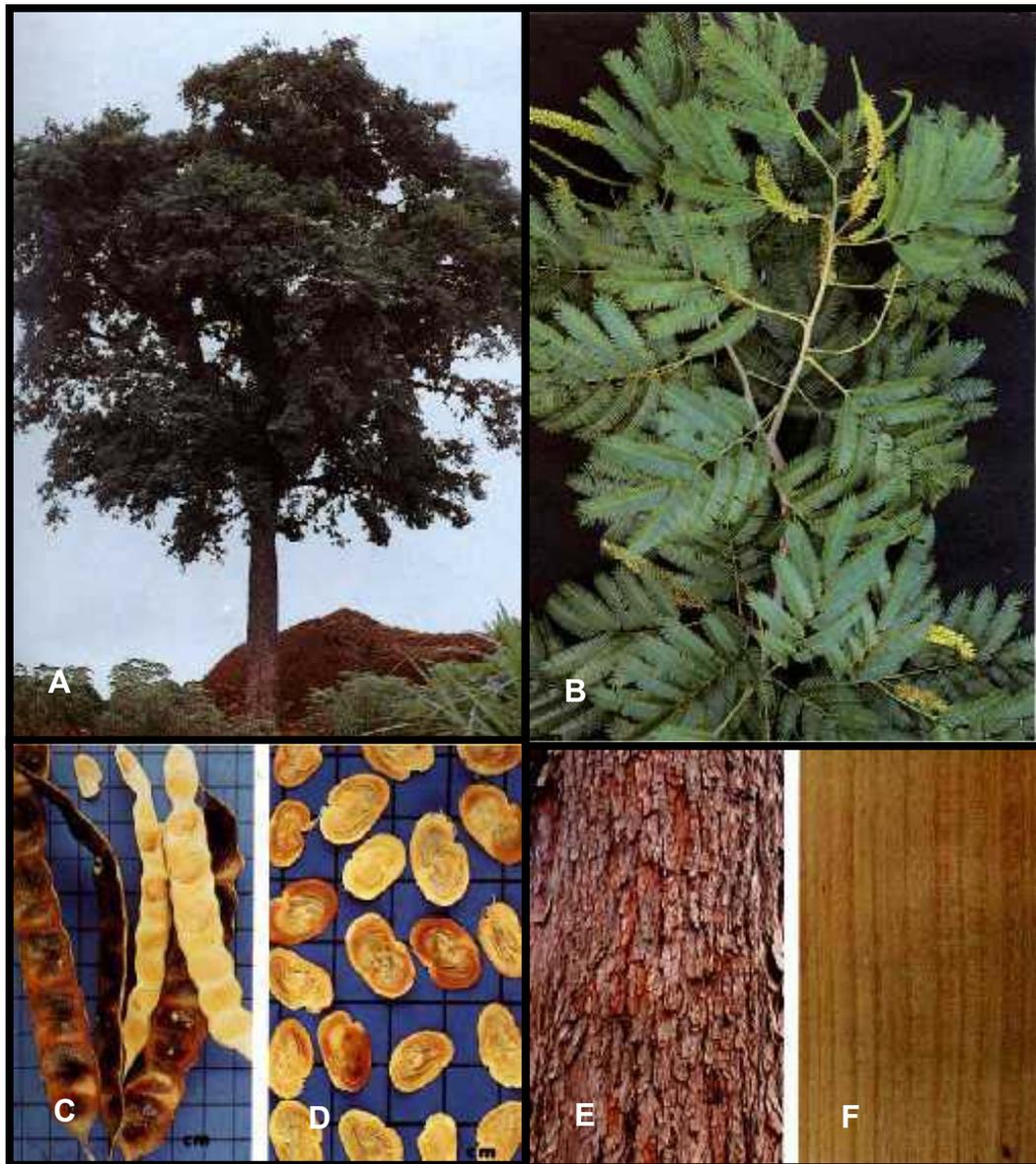
metabólicos da raiz e galhos, isolando de doze substâncias: sitosterol, betulina, lupeol, 3,4 diidroxibenzoato de metila, 4 hidroxil 3,5 dimetilbenzaldeído, phidroxibenzaldeído, isoliquiritigenina, liquiritigenina, tetrahidroxiflavanona, diidroxiflavanona, triidroxiflavona e L₂O metilchiroinositol.

A madeira (Figura 1F) possui densidade de 0,85 g.cm⁻³, sendo muito resistente e com alta durabilidade sob condições naturais. Pode ser utilizada na fabricação de vigas, caibros, ripas, marcos de portas, janelas, tábuas para assoalhos e caixilharia. Na carpintaria é utilizada para a fabricação de carrocerias, parquetes, vigamentos de pontes, bolas de boliche, dormentes, mourões, estacas, esteios, chapas compensadas, postes e peças torneadas (LORENZI, 2000).

2.2 Desinfestação e germinação de sementes *in vitro*

A germinação é um fenômeno biológico influenciado por fatores externos e internos, que ocorre partindo da embebição da absorção de água pela semente, processo eminentemente físico, que provoca o início dos processos metabólicos e decréscimo na resistência do tegumento, favorecendo a emissão da radícula (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Para que o processo de germinação ocorra é necessário que as sementes estejam viáveis, não sejam dormentes, e que as condições ambientais sejam favoráveis (FERREIRA e BORGHETTI, 2004). Portanto, o estabelecimento de protocolos de germinação de sementes *in vitro* possui relevante importância para a micropropagação, tendo em vista a utilização de sementes cultivadas *in vitro* para a obtenção de plântulas assépticas como fonte de explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Estudos de germinação *in vitro* de sementes de espécies lenhosas têm sido realizados por diversos autores. Coelho et al. (2001) testaram a influência do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), na forma sólida e líquida, na germinação de sementes de sucupira-branca (*Pterodum pubescens*). Nogueira et al. (2004) verificaram a influência dos meios de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) e MS, além de diferentes doses de 6-benzilaminopurina (BAP) na germinação *in vitro* do murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*). Franco e Ferreira (2002) testaram diferentes tratamentos pré-germinativos em sementes de caixeta (*Didymopanax morototoni*) que pudessem otimizar o processo germinativo.



Fonte: Lorenzi, 2000.

Figura 1 – *Parapiptadenia rigida*: (A) árvore; (B) filotaxia e floração; (C) aspecto do fruto maduro; (D) sementes; (E) aspecto da casca do fuste; e (F) aspecto da madeira.

Para que as sementes possam originar plântulas normais, livres de patógenos e adequadas para utilização como fonte de explante, se faz necessário o estabelecimento de métodos confiáveis de assepsia, eliminando a possibilidade de ocorrência de explantes contaminados. Dessa forma, é reconhecida a necessidade de utilização de produtos que visem à eliminação ou diminuição de patógenos presentes de forma endógena e/ou exógena nas sementes (FERREIRA, 1989), sendo o etanol e o hipoclorito de sódio (NaOCl) substâncias eficientes para essa finalidade (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O etanol atua como um germicida

e, por ser surfactante, favorece a ação de outros produtos, entretanto, em concentrações superiores a 80%, pode desidratar rapidamente o tecido, além de não ser eficiente na desinfestação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Durante o preparo da solução desinfestante à base de cloro, é comum a adição de detergente comum ou Tween 20, favorecendo o contato das substâncias com o tecido (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Além disso, o tratamento com fungicidas tem promovido resultados satisfatórios, com conseqüente aumento no total de plântulas assépticas partindo de sementes previamente tratadas (CASTELLANI, 1996). O Benomil[®] é um fungicida comumente utilizado na agricultura, na proteção de culturas contra um grande número de doenças e no controle de contaminantes em sementes e explantes na cultura de tecidos.

2.3 Seleção de explantes

O estabelecimento *in vitro* dos explantes corresponde à primeira etapa de um sistema de micropropagação, com início na seleção dos explantes mais adequados para a posterior multiplicação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O tipo de explante deve ser escolhido de acordo com a capacidade de se adaptar às condições *in vitro* (ABBOTT, 1987), sendo mais recomendados explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático, pois estes apresentam uma maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Dessa maneira, os potenciais de regeneração dependem, além do tipo de explante, do estágio do órgão utilizado, sendo tecidos jovens mais aptos à clonagem do que os maduros, pois à medida que a especialização avança durante o desenvolvimento do tecido ou do órgão, a resposta aos estímulos fornecidos durante o cultivo se tornam menos intensas (XAVIER et al., 2002). A dificuldade de controlar a presença de microorganismos interna e externamente em explantes de tecidos maduros (BONGA e VON ADERKAS, 1992; GRICOLETTO, 1997) torna a utilização de explantes excisados de plântulas provenientes de sementes germinadas *in vitro* mais eficiente (WELANDER, 1983).

Várias partes da planta podem ser utilizadas como fonte de explante, a exemplo de raízes e folhas (MANTOVANI, 1997), segmentos nodal e nodal cotiledonar (FRANCO et al., 2006). Na micropropagação, a utilização de segmentos nodais é um método direto de regeneração de plantas, baseado na indução do

crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas. Os segmentos nodais contendo as gemas axilares são isolados e inoculados *in vitro*, sendo estas estimuladas a crescer dando origem a brotos, e estes, por sua vez, podem ser isolados e manipulados como microestacas ou multiplicados de modo a formar tufos (DEBERCH e READ, 1991). Esse tipo de explante possui um alto grau de atividade meristemática e, por isso, maior plasticidade *in vitro*, sendo utilizado com sucesso na micropropagação de algumas espécies, a exemplo da *Ficus carica* (FRÁGUAS et al., 2004), *Feijoa sellowiana* (DAL VESCO e GUERRA, 1999) e *Cordia trichotoma* (MANTOVANI et al., 2001).

2.4 Meio de cultura e fitorreguladores

O sucesso da regeneração *in vitro* de plantas pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles, o genótipo, o tipo e tamanho do explante, o meio de cultura, além do tipo e da dose de fitorreguladores, os quais se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (GASPAR et al., 1996; MOREIRA-DIAS et al., 2001).

O meio de cultura utilizado na micropropagação possui substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, suprindo as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998). As soluções nutritivas são compostas basicamente por macronutrientes (N, P, Ca, K, Mg e Fe); micronutrientes (Mn, Zn, B, Cu, Cl e Mb); sacarose, como a principal fonte de carbono; fitorreguladores; e vitaminas, cuja função principal é servir como fonte de nitrogênio (GRAÇA e TAVARES, 2000; CALDAS et al., 1998). Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares, que compõem o meio de cultura, não exercem somente um efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996).

Dentre os meios mais empregados na cultura de tecidos vegetais estão o MS e o WPM. O meio WPM, em razão da sua menor concentração de nitrogênio e potássio e menor força iônica total (HARRY e THORPE, 1994), promove bons resultados em espécies lenhosas (AMARAL, 2006; PEREZ-PARRON et al., 1994; RIBAS, 1999). Além do tipo de meio, a composição mais diluída deste tem sido estudada, tanto para a germinação de sementes quanto para a multiplicação e enraizamento de brotos (FRÁGUAS, 2004; SOUZA et al., 2003; RIBAS, 1999;

MANTOVANI et al., 2001). A concentração de sais no meio de cultura pode ser adequada de acordo com cada espécie, podendo a redução da concentração iônica favorecer o processo de micropropagação (GUERRA e NODARI, 2007), contudo, a diluição excessiva pode levar à deficiência mineral na planta. Os micronutrientes, em virtude de sua baixa concentração original, na maioria dos trabalhos, não necessitam de diluição (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os hormônios vegetais podem ser definidos como substâncias naturais (fitohormônios) ou sintéticas (fitorreguladores) que são adicionados ao meio de cultura, com a finalidade de induzir modificações nos padrões de crescimento e desenvolvimento do explante (TERMIGNONI, 2005). Dessa forma, a adição de fitorreguladores ao meio supre prováveis deficiências das quantidades de fitohormônios nos explantes da planta mãe, induzindo os processos de dediferenciação e rediferenciação, com conseqüente formação de tecidos e órgãos. Dentre os fitorreguladores utilizados na cultura de tecidos, as citocininas e auxinas possuem maior destaque, atuando na formação de raízes, parte aérea e calo (CALDAS et al., 1998; PASQUAL, 2001).

Skoog e Miller (1957), em trabalho clássico, inocularam medula de tabaco em meios de cultura com diferentes doses da auxina ácido indol acético (AIA) e da citocinina cinetina (KIN). Quando as doses de auxina e citocinina eram iguais, induziam a formação de calos no tecido. Quando as doses de AIA eram superiores às de KIN, as culturas formavam raízes, e quando as doses de KIN eram superiores às de AIA, a resposta morfogênética estava associada à formação de parte aérea. Dessa forma, partindo desse estudo, foi possível o desenvolvimento dos protocolos regenerativos *in vitro*.

As citocininas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular (TAIZ e ZEIGER, 1991). Além disso, para a formação de novas partes aéreas, as gemas axilares precisam ser estimuladas a crescer, por meio da quebra da dominância apical, principalmente pela aplicação de citocininas exógenas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Esse processo pode estar relacionado com a diferenciação dos tecidos vasculares, tendo em vista que a quebra de dominância apical ocorre concomitante ao crescimento e a união de células do xilema (METIVIER, 1986). Dentre as citocininas, o 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido a mais utilizada na indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Alguns dados sugerem que essa citocinina seja a mais indicada para promover a proliferação de

partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro*, mostrando-se muito eficiente na formação de brotos em explantes de diversas espécies lenhosas, a exemplo da *Swietenia macrophylla* (SCHOTTZ et al., 2007), *Cabralea canjerana* (ROCHA, 2007) e *Ficus carica* (FRÁGUAS et al., 2004).

As auxinas atuam na expansão e no alongamento celular, ajudando na divisão celular em cultura de tecidos, sobretudo no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). O ácido indolbutírico (AIB) é um dos fitorreguladores mais empregados e eficientes na indução de raízes em explantes (DUTRA et al., 1998; ROSS, 1992) em razão da sua fotoestabilidade, além de ser imune à ação biológica (HOFFMANN et al., 1996). A ação da auxina ocorre antes do primeiro evento de formação do primórdio radicular, ou seja, pouco antes da desdiferenciação e formação de um locus meristemático, sugerindo que a função da auxina no enraizamento esteja associada somente à indução radicular e não ao posterior desenvolvimento (BLAKESLEY et al., 1991).

Para estabelecer condições que favoreçam a iniciação de raízes, é necessário que existam interações entre fatores endógenos fixos, provavelmente enzimas ou nutrientes facilmente translocáveis (HARTMANN et al., 1997). Algumas hipóteses têm explicado o mecanismo de ação das auxinas no enraizamento, sendo os principais enfoques relacionados com as relações dos ácidos nucléicos e proteínas, modificações na parede celular, secreção de íons hidrogênio e estimulação na atividade enzimática (CASTRO, 1979). O enraizamento *in vitro* pode ocorrer quando as raízes são formadas na parte aérea, sendo chamado de processo direto, ou quando são formadas partindo de calo, denominando-se de processo indireto. Em ambos os casos, se não houver uma ligação vascular eficiente entre a parte aérea e a parte subterrânea, a aclimatização da muda é dificultada, podendo comprometer sua sobrevivência.

Na micropropagação, o enraizamento de brotos de espécies lenhosas, originários da fase de multiplicação, tem sido otimizado com a utilização do AIB (PERES e KERBAUY, 2000), justificando a sua maior aceitação para tais espécies. Na regeneração de caixeta (*Didymopanax morototoni*), foi verificado um maior enraizamento utilizando 1 mg.L⁻¹ de AIB (MANTOVANI et al., 1999), já para o urucuzeiro (*Bixa orellana*), somente as doses acima de 1 mg.L⁻¹ de AIB resultaram em porcentagens de enraizamento satisfatórias (ALMEIDA et al., 1995). Entretanto, algumas espécies de plantas lenhosas não formam raízes adventícias por diversos

fatores, dentre eles, a alta atividade de enzimas que inativam a auxina por degradação oxidativa (NORMANLY, 1997), a presença de citocininas (substâncias inibidoras da iniciação radicular), pela falta de resposta do tecido à auxina acumulada (TREWAVAS, 1981) ou pela rápida perda da capacidade morfogênica dos tecidos com o seu envelhecimento, dificultando o processo de enraizamento (THORPE et al., 1991).

A utilização de carvão ativado no meio de cultura de enraizamento também pode ser benéfica, pois simula condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor pela redução da incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular, além de adsorver substâncias tóxicas, especialmente fenóis e/ou quinonas que podem afetar o enraizamento do explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Mantovani et al. (2001) obtiveram maior enraizamento de brotos de caixeta (75%) em meio composto por 0,50 mg.L⁻¹ de AIB, acrescido de 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado.

2.5 Aclimatização

A aclimatização é o processo no qual as plantas produzidas *in vitro* são preparadas para serem retiradas do meio de cultura e se adaptarem a um novo ambiente (MARCHANT, 1982). As plantas passam de um ambiente com grande umidade relativa (aproximadamente 100%), para um ambiente que requer aumento da taxa de transpiração (DESJARDINS et al., 1987), com conseqüente aumento da possibilidade de estresse hídrico. Dessa forma, a retirada da planta do cultivo *in vitro* é um processo que exige cautela e, se realizado de forma inadequada, pode ocasionar perda das plântulas, inviabilizando o processo de produção de mudas.

A sobrevivência de plantas obtidas por meio da cultura de tecidos pode ser afetada por fatores morfológicos e estruturais, tendo em vista que a morfologia interna das plantas regeneradas *in vitro* é, num primeiro momento, muito diferente daquelas cultivadas em condições *ex vitro*. A grande dificuldade dessa etapa se deve ao processo de controle de perda de água, pela baixa umidade do ar em relação às condições *in vitro* (MARCHANT, 1982). Além disso, a necessidade de passar de um regime heterotrófico, tendo em vista que uma fonte de carbono é sempre adicionada ao meio de cultura, para um regime autotrófico, no qual a planta

deve produzir seu próprio carboidrato por meio da fotossíntese, é outro fator que dificulta a adaptação das plantas (KOZAI e SMITH, 1995).

Inicialmente, as plântulas desenvolvidas *in vitro* possuem folhas com estômatos pouco funcionais, em consequência da alta umidade relativa no interior dos frascos. Essa alteração pode ocasionar estresse hídrico, quando as plântulas são transferidas para condições naturais, afetando drasticamente o crescimento (DEBERGH, 1991). Além disso, plântulas desenvolvidas em cultura de tecidos possuem folha com cutícula mais delgada e com pouca capacidade fotossintética, sendo menos adaptadas às condições *ex vitro* a que serão submetidas no processo de aclimatização (PIERIK, 1990).

A aclimatização de espécies herbáceas pode ser facilitada pela presença de proteínas que protegem os tecidos contra o estresse hídrico (WISNIEWSKI et al., 1996). Para espécies lenhosas é um processo mais complexo, sendo, muitas vezes, necessária a realização de uma etapa de pré-aclimatização, tornando as raízes obtidas *in vitro* mais resistentes (McCOWN, 1988 *apud* SANCHEZ, 1996). Rocha et al. (2007) realizaram aclimatização de plântulas micropropagadas de *Cabralea canjerana*, obtendo 90% de sobrevivência aos 30 dias. Andrade et al. (2000) obteve 80% de sobrevivência na transferência de plantas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) para condições *ex vitro*. Telles e Biasi (2005), aclimatizando plantas de caqui (*Diospyrus kaki*), obtiveram maior porcentagem de sobrevivência (47%) quando estas, em casa de vegetação, foram cobertas com copos plásticos.

Embora existam algumas regras gerais como a manutenção de alta umidade relativa do ar e temperatura amena, a experiência individual, a familiarização com a espécie, a escala de trabalho e as facilidades disponíveis são os principais fatores que determinam a otimização dessa fase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), da Universidade Federal de Santa Maria.

3.2 Meio de Cultura e condição de cultivo

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), com quantidade de sais específicos para cada fase do estudo. A redução da concentração salina do meio foi realizada apenas na composição dos macronutrientes, permanecendo a quantidade integral nos demais elementos. O pH foi ajustado em $5,8 \pm 0,2$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N.

Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio ou frascos, lacrados com papel alumínio e esterilizados por autoclavagem durante 20 min. à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm. Os fitorreguladores foram adicionados ao meio antes da sua esterilização.

As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica e os recipientes fechados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC). As culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de aproximadamente 1500 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes branco-frias.

3.3 Material vegetal

Frutos maduros da *Parapiptadenia rigida* foram coletados de árvores matrizes localizadas no Campus da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria está localizada aos 29° 43' 30" de Latitude Sul e 53° 45' 03" de Longitude Oeste, a uma altitude de 95 metros.

Os frutos foram submetidos a um processo de secagem, sob condições naturais, para abertura e retirada das sementes. Posteriormente, estas foram

aconditionadas em saco de papel Kraft e armazenadas em geladeira. As sementes foram utilizadas no experimento de desinfestação sob diferentes concentrações e tempos de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl).

3.4 Experimento 1 – Efeito de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfestação e germinação de sementes

As sementes foram inicialmente submetidas a um pré-tratamento de desinfestação em álcool 70% por 1 min. Em seguida, foram embebidas em hipoclorito de sódio (NaOCl), com 10% de cloro ativo, nas concentrações de 0; 2,5 e 5,0%, acrescido de três gotas de detergente Tween 20, durante 5, 10, 15 e 30 min. (Tabela 2), sendo posteriormente, submetidas a cinco enxágües em água destilada e autoclavada. Após, as sementes foram submersas em solução do fungicida Benomil® na concentração de 1 g.L⁻¹ durante 10 min. As sementes pertencentes aos tratamentos com ausência de hipoclorito de sódio permaneceram em água destilada e autoclavada, acrescida de Tween 20, durante o mesmo período de tempo dos tratamentos com a presença do agente desinfestante. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio WPM completo, acrescido de 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5 g.L⁻¹ de ágar.

Tabela 2 – Concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão utilizados na desinfestação de sementes de *Parapiptadenia rigida*. Santa Maria, RS, 2008

Tratamentos	Hipoclorito de sódio (%)	Tempo (min.)
T ₁	0,0	05
T ₂	0,0	10
T ₃	0,0	15
T ₄	0,0	30
T ₅	2,5	05
T ₆	2,5	10
T ₇	2,5	15
T ₈	2,5	30
T ₉	5,0	05
T ₁₀	5,0	10
T ₁₁	5,0	15
T ₁₂	5,0	30

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, totalizando 12 tratamentos, com quatro repetições por tratamento, cada repetição com cinco sementes. A avaliação da porcentagem de germinação das sementes ocorreu aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação, considerando a emissão de radícula como caráter germinativo. Após cada avaliação, os tubos com presença de contaminantes foram registrados e excluídos. A avaliação da porcentagem de sementes desinfestadas foi realizada aos 30 dias após a inoculação.

3.5 Experimento 2 – Efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN) na indução de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal

Neste experimento foram utilizadas plântulas de *P. rigida* com 50 dias de idade (Figura 2A). A indução de brotos foi realizada no primeiro segmento nodal (Figura 2B) e no segmento nodal cotiledonar (Figura 2C), ambos com tamanho aproximado de 1 cm (uma gema axilar).

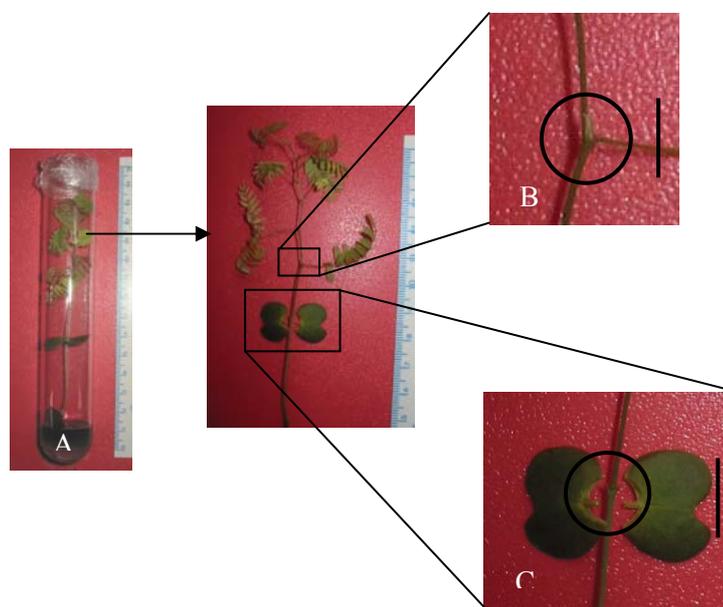


Figura 2 – Esquema do seccionamento realizado para obtenção dos explantes utilizados no teste de indução de brotos: (A) plântula de *Parapiptadenia rigida* germinada *in vitro* em meio WPM (LLOYD e McCOWN, 1980); (B) primeiro segmento nodal; (C) segmento nodal cotiledonar. Santa Maria, RS, 2008.

Para a desinfestação das sementes foi utilizada água sanitária na concentração de 2,0 a 2,5% de cloro residual total, acrescida de três gotas de Tween 20, por um período de 30 min. de imersão, seguindo os mesmos procedimentos de desinfestação descritos no item 3.4.

Os explantes foram inoculados verticalmente em frascos contendo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose e 6 g.L^{-1} de ágar, na quantidade aproximada de 30 mL por frasco. Para indução de broto foram utilizadas diferentes doses dos fitorreguladores BAP ou KIN (Tabela 3).

Tabela 3 – Tratamentos utilizados na indução de broto em segmentos nodal cotiledonar e nodal de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de diferentes doses das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN). Santa Maria, RS, 2008

Tratamentos		Doses de fitorreguladores (mg. L ⁻¹)
T ₁	Segmento nodal cotiledonar	0,00 BAP
T ₂		0,25 BAP
T ₃		0,50 BAP
T ₄		1,00 BAP
T ₅		0,00 KIN
T ₆		0,25 KIN
T ₇		0,50 KIN
T ₈		1,00 KIN
T ₉	Segmento Nodal	0,00 BAP
T ₁₀		0,25 BAP
T ₁₁		0,50 BAP
T ₁₂		1,00 BAP
T ₁₃		0,00 KIN
T ₁₄		0,25 KIN
T ₁₅		0,50 KIN
T ₁₆		1,00 KIN

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (tipo de segmento, tipo e dose de fitorregulador), totalizando 16 tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por seis frascos contendo um explante cada.

Aos 30 dias após a inoculação, os explantes foram subcultivados para meio de cultura livre de fitorreguladores, permanecendo por mais 30 dias nessas condições. As avaliações foram realizadas 60 dias após a inoculação, sendo observadas as variáveis: porcentagem de formação de brotos, tamanho dos brotos, número de folhas por broto, aspecto morfológico dos brotos, porcentagem de calos na base dos explantes e tamanho dos calos. Para a variável tamanho dos calos foram realizadas duas medições e, posteriormente, calculada a média para cada calo.

3.6 Experimento 3 – Efeito do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de segmentos nodal cotiledonar, nodal e brotos

A fase de enraizamento foi dividida em dois testes. No teste 1, a indução de raízes foi realizada em segmentos nodal cotiledonar e nodal de *P. rigida* provenientes da fase de indução de brotos em meio contendo 0,50 mg.L⁻¹ de fitorregulador, independente do tipo, sem a retirada dos brotos formados durante essa fase. No teste 2, o enraizamento foi realizado em novos brotos, com tamanho entre 0,8 e 1,0 cm, obtidos de segmento nodal cotiledonar inoculado em meio contendo 0,50 mg.L⁻¹ de KIN, por um período de 30 dias e, subcultivados por mais 30 dias em meio sem adição de fitorregulador. Dessa forma, os brotos utilizados no teste 2 não foram provenientes da fase de indução de brotos descrita no item 3.5.

Para o enraizamento, os explantes foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo meio ¼ WPM, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e as doses de 0; 0,25; 1,0; 1,75 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 3).

No teste 1, o delineamento foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (tipo de segmento e dose de fitorregulador), com quatro repetições de três tubos, contendo um explante por tubo. No teste 2, o delineamento foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco tubos por repetição, e um broto por tubo.

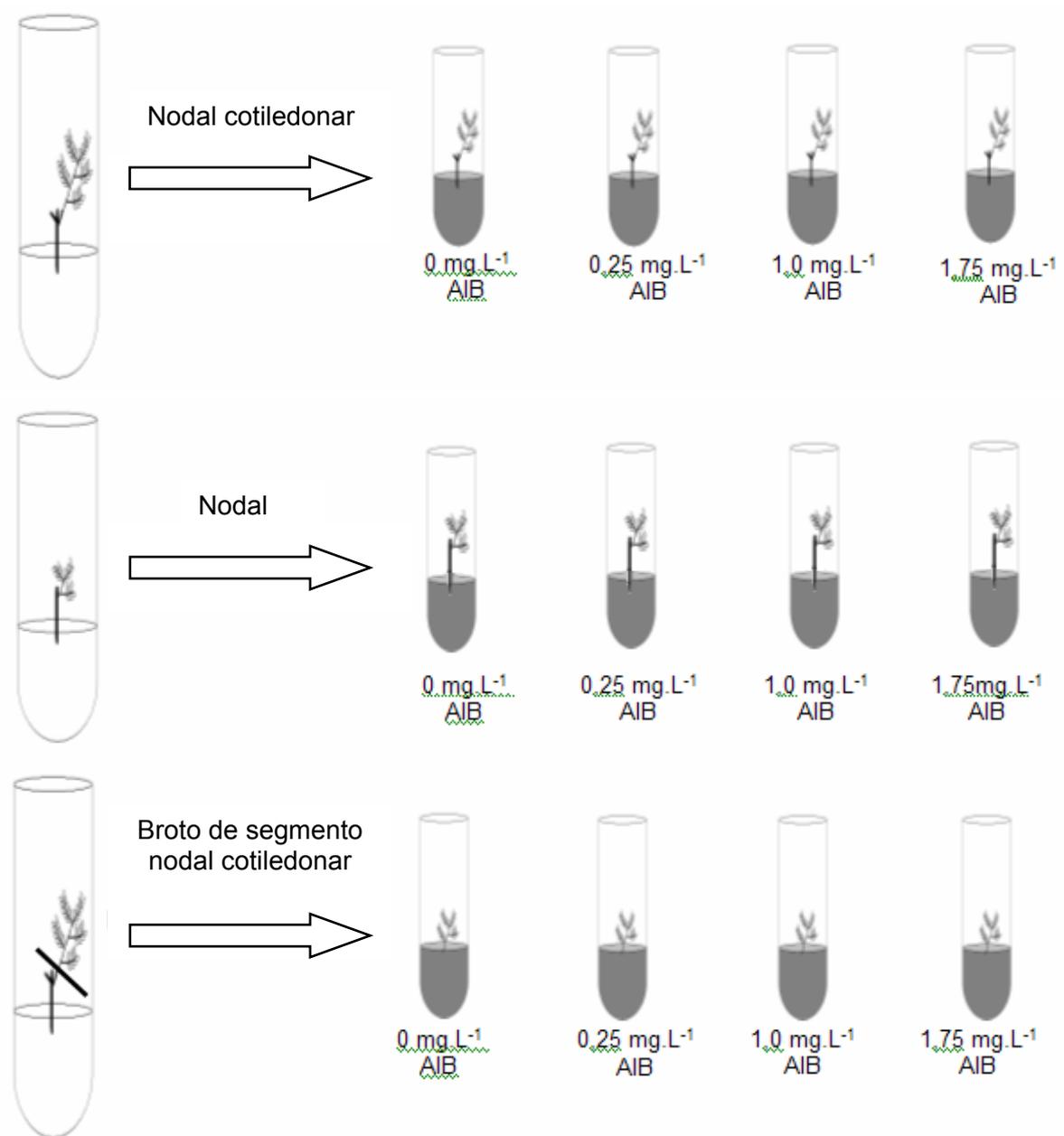


Figura 3 – Esquema dos tratamentos para a indução de raízes em segmentos nodal cotiledonar, nodal e brotos de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio ¼ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, 2008.

Aos 60 dias após a inoculação foram realizadas as avaliações para a porcentagem de enraizamento, número de raízes por explante, comprimento da raiz mais longa e tamanho dos calos formados na base dos explantes. Para a variável tamanho dos calos foram realizadas duas medições de diâmetro do calo e, posteriormente, calculada a média para cada calo.

3.7 Experimento 4 – Aclimatização das plantas regeneração *in vitro*

A abertura gradativa dos tubos foi realizada em sala de crescimento, por meio de perfurações no filme PVC, utilizando agulha descartável, por um período de cinco dias, com posterior abertura completa dos tubos, permanecendo destampados por dois dias. Em seguida, as plantas foram transplantadas para copos plásticos, contendo substrato composto de vermiculita e Plantmax[®], na proporção de 2:1 (v/v), esterilizado em autoclave por 40 min. As plantas permaneceram em sala com luminosidade, temperatura e umidade do ar sob condições naturais, sendo cobertas individualmente por garrafas plásticas por sete dias. Durante esse período, a irrigação foi realizada a cada dois dias, por meio de aspersão manual. Posteriormente, as garrafas foram substituídas por campânula plástica (miniestufa), permanecendo por 45 dias sob estas condições, com irrigação realizada três vezes por semana, por meio de aspersão manual, além da realização de rega do substrato com água corrente duas vezes por semana. Aos 60 dias, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência das plantas.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos das variáveis observadas, nos diferentes experimentos, foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, em probabilidade de 5% de erro. As análises foram realizadas com o auxílio do Sistema para Análises Estatísticas – V. 2.0 (STAT) e, para a análise de regressão e elaboração dos gráficos, o programa OriginPro 7.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1 – Efeito de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfestação e germinação de sementes

Para a porcentagem de sementes desinfestadas, os resultados da análise de variância demonstraram que, aos 30 dias de avaliação, houve interação entre os fatores concentração de hipoclorito de sódio e tempo de imersão. A maior porcentagem de sementes assépticas (81%), ocorreu no tratamento com 2,5% de hipoclorito de sódio por 30 min. (Figura 4).

Houve uma menor porcentagem de sementes desinfestadas nos tratamentos com água e Tween 20 por 5 min., seguido do tratamento com água e Tween 20 por 10 min., com 31 e 47% respectivamente (Figura 4). Resultado semelhante foi encontrado por Couto et al. (2004) na desinfestação de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*), sendo observado 11% de sementes assépticas quando não tratadas com hipoclorito de sódio. Esses dados indicam a relevante importância deste agente desinfestante no controle de patógenos em sementes cultivadas *in vitro*. Contudo, em sementes de *P. rigida*, foi observado que à medida que se aumentou o tempo de imersão em solução com água e Tween 20, ocorreu um aumento na porcentagem de sementes assépticas (Figura 4). Dessa forma, talvez o emprego de solução composta apenas por água e Tween 20, porém com maiores tempos de imersão que os utilizados, possa promover uma eficiente assepsia das sementes sem a necessidade da adição de hipoclorito de sódio (NaOCl).

Nesse estudo, foi verificada a contaminação das sementes por fungos e/ou bactérias, sendo as bactérias os patógenos com maior ocorrência. Além disso, observou-se que mesmo na presença desses patógenos, as sementes de *P. rigida* foram capazes de germinar, constatando que estes microorganismos não atuaram como fator limitante desse processo. Contudo, a presença de patógenos endofíticos em sementes é uma das mais importantes causas de perda de material vegetal, tornando estudos de desinfestação de sementes de fundamental importância quando se deseja utilizar plantas assépticas como fonte de explante. Os tratamentos de desinfestação de sementes de *P. rigida* utilizados neste experimento foram

eficientes para obtenção plantas assépticas e sua utilização como fonte de explantes.

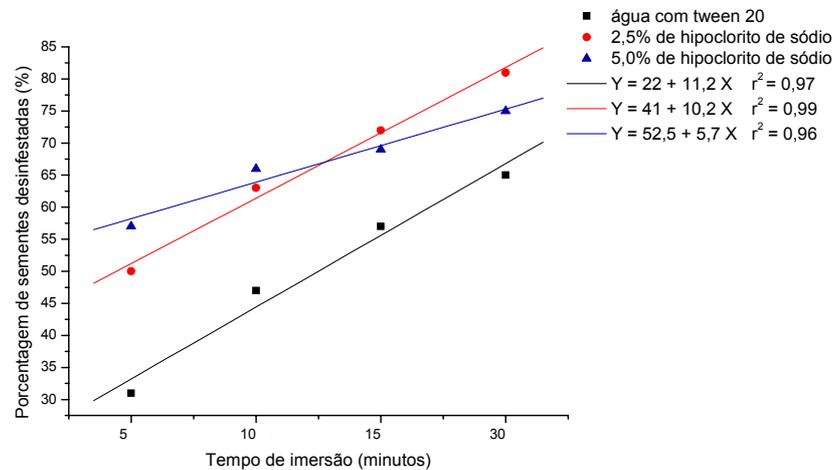


Figura 4 – Porcentagem de sementes de *Parapiptadenia rigida* desinfestadas, em função de tratamentos com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão, avaliadas 30 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

Em todos os tratamentos, a germinação das sementes de *P. rigida* teve início entre 7 e 10 dias após a inoculação, com o rompimento do tegumento das sementes e a emissão da radícula. Esta facilidade inicial de germinação pode ser justificada pela ausência de mecanismos de dormência nas sementes e, conseqüentemente, maior controle de entrada e saída de água.

Não foi observada diferença significativa para a porcentagem de germinação das sementes aos 10, 20 e 30 dias de avaliação. Aos 30 dias, os resultados da análise de variância mostraram que houve interação entre a concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de imersão, indicando que os fatores não são independentes. Dessa forma, o melhor resultado para a concentração de hipoclorito de sódio depende do tempo de imersão. As maiores porcentagens de germinação ocorreram quando as sementes foram embebidas com água e Tween 20 por 30 min., seguido do tratamento com 2,5% de hipoclorito de sódio por 30 min., obtendo-se 76 e 70% de sementes germinadas respectivamente (Figura 5). A menor porcentagem de germinação de sementes de *P. rigida* foi observada no tratamento utilizando 2,5% de hipoclorito de sódio por 5 min. (45%), seguido do tratamento com 5,0% de hipoclorito de sódio por 5 min. (51%) (Figura 5). Resultado semelhante foi obtido por Couto et al. (2004) em estudo com germinação de sementes de mogno

(*Swietenia macrophylla*), verificando 48% de germinação em sementes desinfestadas com 2,5% de hipoclorito de sódio durante 30 min. Em mogango (*Cucurbita pepo*) foi observado 36% de germinação utilizando 2,5% de hipoclorito de sódio por 20 min. (SILVA, 2005). Sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) tratadas com hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos tiveram 100% de assepsia e germinação das sementes (MARTINS-CORDER e BORGES JUNIOR, 1999). Nogueira et al. (2004), estudando germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), obtiveram a maior porcentagem de germinação (60%), utilizando somente 0,50% de hipoclorito de sódio durante 5 min. Na desinfestação de sementes de *Moringa oleifera* L., a utilização de apenas 0,25% de hipoclorito de sódio por 10 minutos foi suficiente para obtenção de 100% de desinfestação e 90% de germinação. Dessa forma, a concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição das sementes a estes compostos pode variar de acordo com a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (MONTARROYOS, 2000).

Nesse estudo, também foi observado que, independente dos tratamentos utilizados, o aumento do tempo de imersão das sementes gerou um aumento gradativo da porcentagem de sementes germinadas (Figura 5), indicando que o tempo de imersão foi um fator limitante na germinação das sementes de *P. rigida*. É sabido que a disponibilidade de água é o fator de maior influência no processo de germinação, pois, a absorção de água, promove a reidratação dos tecidos e, conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas necessárias para a retomada de crescimento do eixo embrionário. Passos (1999) realizando a germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora nítida*, verificou um máximo de 19,7% de germinação no tratamento sem a prévia embebição das sementes. FICK et al. (2007) verificaram que a embebição das sementes de louro-pardo (*Cordia trichotoma*) afetou a desinfestação, o percentual de germinação e o tempo médio de germinação. Os mesmos autores obtiveram 85% de desinfestação e 77% de germinação em sementes embebidas em água durante 24 horas, seguido da imersão por 30 min. em 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl).

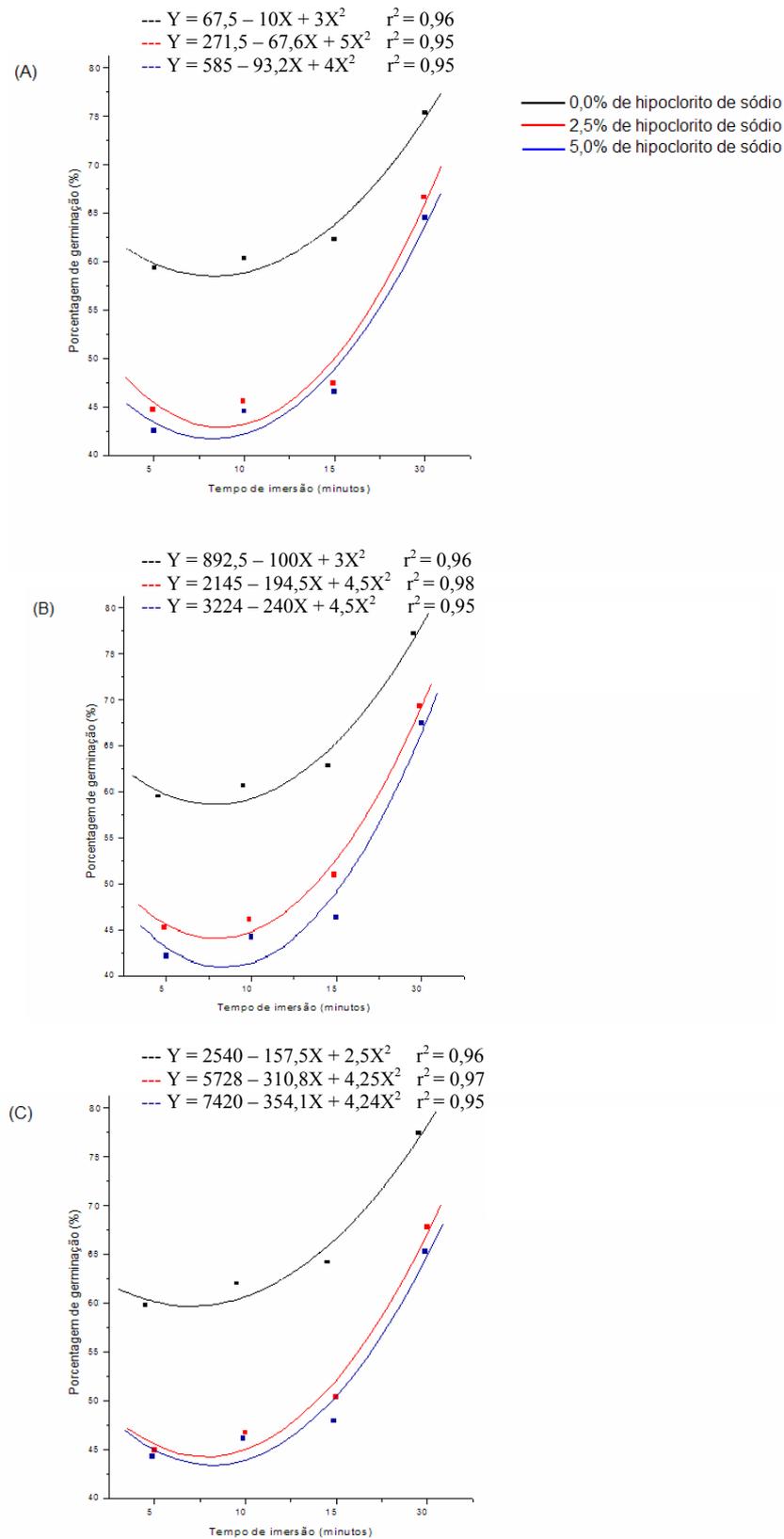


Figura 5 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida*: (A) avaliação aos 10 dias; (B) avaliação aos 20 dias; (C) avaliação aos 30 dias, de acordo com os tratamentos utilizados para desinfestação. Santa Maria, RS, 2008.

4.2 Experimento 2 – Efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN) na indução de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal

4.2.1 Porcentagem de explantes com broto

Para a porcentagem de explantes de *P. rigida* com broto, houve interação entre os fatores tipo de segmento e tipo de fitorregulador, indicando que estes não são independentes. Sendo assim, o melhor resultado para o tipo de fitorregulador depende do tipo de segmento. A maior porcentagem média de explantes com broto foi verificada em segmento nodal cotiledonar inoculado em meio com BAP (98,75%), não diferindo significativamente dos tratamentos utilizando o mesmo tipo de segmento em meio contendo KIN, independente da dose de fitorregulador (Figura 6). Por outro lado, quando o segmento nodal foi inoculado em meio contendo BAP, observou-se uma menor porcentagem de explantes com broto (80%), diferindo dos demais tratamentos. Moreira-Dias et al. (2001) em estudo com *Citrus* sp. observaram que em segmentos de caule a organogênese diminuiu em função da distância do segmento nodal cotiledonar, dessa forma, quanto mais distante deste, menor a freqüência de desenvolvimento de gemas axilares.

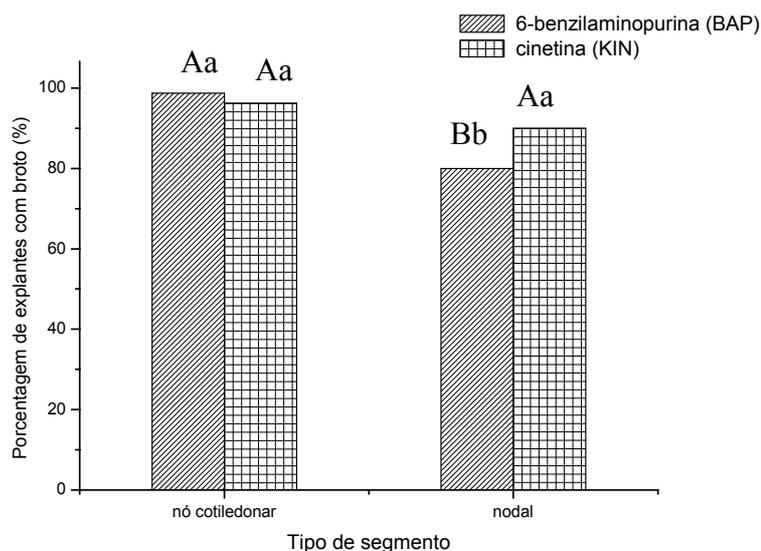


Figura 6 – Porcentagem média de explantes de *Parapiptadenia rigida* com broto, em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN), independente da dose, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

Ainda com relação à porcentagem de explantes com broto, verificou-se que houve interação entre o tipo de segmento e a dose de fitorregulador. A maior porcentagem média de explantes com broto (100%), foi observada quando o segmento nodal cotiledonar foi inoculado em meios contendo 0; 0,25; 0,50 mg.L⁻¹, independente do tipo de fitorregulador (Tabela 4). Além disso, foi verificado que o segmento nodal cotiledonar e o nodal, inoculados em meio contendo BAP ou KIN, apresentaram respostas similares quanto à formação de brotos, contudo, o segmento nodal cotiledonar inoculado em meio contendo BAP apresentou a formação de tufos e pouco alongamento de entrenós, evento não observado nos tratamentos com KIN.

A indução de brotos nos explantes ocorreu mesmo em meios com ausência de fitorregulador, sugerindo que não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para que ocorra a formação de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal de *P. rigida*. Contudo, para o segmento nodal foi observado que a presença de fitorregulador no meio favoreceu a formação de brotos (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem média de explantes de *Parapiptadenia rigida* com broto, em função do tipo de segmento e dose de fitorregulador, inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) e avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008

Doses dos fitorreguladores BAP e KIN (mg.L ⁻¹)	Tipos de segmento	
	nodal cotiledonar	nodal
0,00	100	65
0,25	100	92
0,50	100	92
1,00	90	90

4.2.2 Tamanho dos brotos

O crescimento dos brotos em segmento nodal cotiledonar foi superior ao observado em segmento nodal. Não ocorreu interação entre o tipo de segmento, tipo e dose de fitorregulador, indicando que os três fatores são independentes. No segmento nodal cotiledonar ocorreu a formação de brotos com maior tamanho médio (0,43 cm) se comparado aos obtidos em segmento nodal (0,22 cm), diferindo

estatisticamente entre si (Figuras 7, 8A e 8B). A obtenção de brotos mais alongados em explantes de segmento nodal cotiledonar, possivelmente se deve a um balanço hormonal favorável ao crescimento de partes aéreas, enquanto que nos explantes de segmento nodal esta condição pode não ter sido alcançada. Esses resultados concordam com os estudos de regeneração *in vitro* de mangabeira (*Hanconia speciosa*), observando-se também a formação de brotos maiores em segmento nodal cotiledonar, independente da dose de fitorregulador utilizada (GRIGOLETTO, 1997).

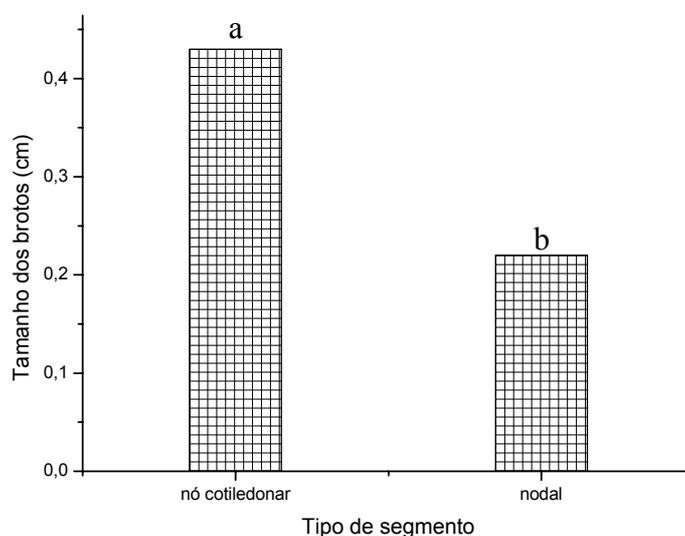


Figura 7 – Tamanho médio de brotos formados em explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), independente do tipo e dose de fitorregulador, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

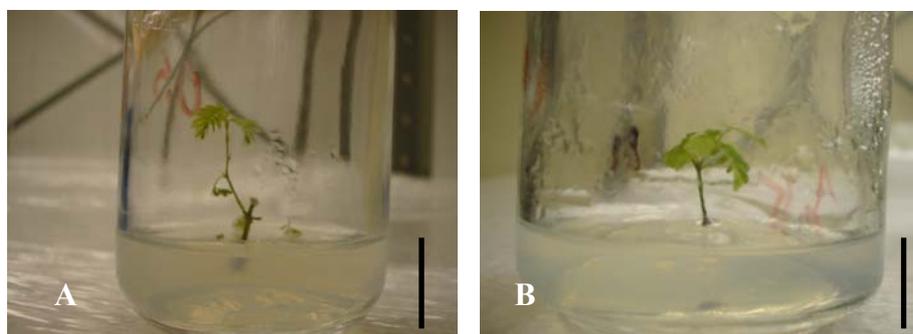


Figura 8 – Brotos formados em explantes de *Parapiptadenia rigida* inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), avaliados aos 60 dias após a inoculação: (A) broto em segmento nodal cotiledonar inoculado em meio contendo $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina (KIN); (B) broto em segmento nodal inoculado em meio contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN. Santa Maria, RS, 2008. Barra = 1cm.

Em função da dose de fitorregulador, a análise de regressão para o tamanho dos brotos de *P. rigida* mostrou resposta quadrática negativa, sendo observado um maior tamanho médio de brotos (0,50 cm) em explantes inoculados nos meios contendo 0,50 mg.L⁻¹, independente do tipo de fitorregulador (Figura 9). Esses resultados são semelhantes aos encontrados na multiplicação de ficus (*Ficus carica*), em que a utilização de 0,50 mg.L⁻¹ de KIN promoveu maior tamanho de brotos em segmentos nodais (NOBRE, 1998). Foi verificado um efeito negativo no tamanho de brotos formados em explantes de *P. rigida* nos tratamentos com dose de fitorregulador superior a 0,50 mg.L⁻¹, independente do tipo de fitorregulador (Figura 9). Esse evento pode ter ocorrido em consequência da indução de divisões celulares provocadas pela ação das citocininas, provocando um aumento no número de células e menor tamanho celular (TAIZ e ZEIGER, 1991). No entanto, em segmento nodal de abacateiro 'Ouro Verde' (*Persea* sp.), somente doses acima de 2,70 mg.L⁻¹ de BAP provocaram um menor tamanho de brotos (BIASI, 1993). Souza et al. (2003), estudando a multiplicação *in vitro* de arnica (*Lychnophora pinaster*), verificaram brotos mais alongados em segmento nodal inoculado em meio contendo a dose de 0,07 mg.L⁻¹ de BAP e, os menores tamanhos de brotos, em meio contendo 1,0 mg.L⁻¹ de BAP. Já Mantovani et al. (1999) verificaram que o segmento nodal de *Didymopanax morototoni* inoculado em meio com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP apresentou um maior alongamento dos brotos. Para a acácia-negra (*Acacia mearnsii*), houve um efeito negativo no crescimento dos brotos quando utilizada a dose de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (BORGES JÚNIOR et al., 2004). Machado et al. (2006) em estudo de multiplicação do porta-enxerto de videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*), observaram um menor tamanho de brotos somente em doses superiores a 2,5 µM de KIN. Dessa forma, as citocininas podem promover o crescimento dos brotos, contudo, é necessário que se adicione ao meio a dose adequada, sendo esta específica para cada espécie, genótipo, tipo de explante, dentre outros.

Apesar da indução de brotos nos explantes de *P. rigida* ter ocorrido mesmo em meios com ausência de fitorreguladores, sugerindo que não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para que ocorra a formação de brotos nos explantes, foi observado que a adição de BAP ou KIN ao meio de cultura favoreceu o alongamento destes. Além disso, foi observado que existiu grande variação quanto ao tamanho dos brotos nos tratamentos utilizados, contudo a dose de 0,50 mg.L⁻¹,

independente do tipo de segmento e da dose de fitorregulador, proporcionou uma maior uniformidade para esse parâmetro.

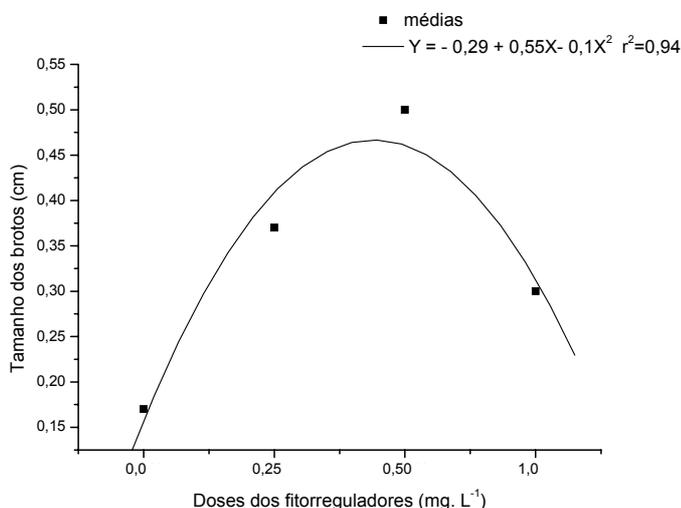


Figura 9 – Tamanho médio de brotos formados em explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹, independente do tipo de fitorregulador, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

4.2.3 Número de folhas e aspecto morfológico dos brotos

Os resultados encontrados para o número de folhas dos brotos de *P. rigida* foram semelhantes aos observados para o tamanho dos mesmos, indicando existir uma relação direta entre as duas variáveis. Sendo assim, quanto maior o tamanho do broto, maior o número de nós e, conseqüentemente, um maior número de folhas.

Houve interação entre o tipo e dose de fitorregulador. Indicando que os fatores não são independentes. O maior número de folhas ocorreu nos explantes inoculados em meio contendo a dose de 0,50 mg.L⁻¹ de KIN, independente do tipo de segmento, com 3,60 folhas por broto (Tabela 5). Mishra et al. (1999), verificaram que a utilização de 0,40 mg.L⁻¹ de KIN favoreceu o número de folhas em brotos de *Emblica officinalis*. Em segmento nodal de amora-preta (*Rubus* spp.), a dose de 22,5 µM de KIN induziu um maior número médio de folhas, com 10,2 folhas por broto (NOLASCO et al., 2005).

Tabela 5 – Número médio de folhas em brotos de *Parapiptadenia rigida* obtidas de segmentos inoculados em meio ½ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função do tipo e da dose de fitorregulador, independente do tipo de segmento, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008

Doses dos fitorreguladores BAP e KIN (mg. L ⁻¹)	Tipos de fitorregulador	
	BAP	KIN
0,00	1,32	1,32
0,25	2,36	2,90
0,50	1,83	3,60
1,00	1,51	1,80

Os brotos induzidos, tanto no segmento nodal cotiledonar quanto no segmento nodal de *P. rigida* apresentaram folhas verdes e vigorosas, exceto no caso de malformação observado em brotos advindos de segmento nodal cotiledonar inoculado em meio contendo BAP, com ocorrência de tufo e entrenós curtos. O maior grau de deformidade ocorreu em brotos provenientes de segmento nodal cotiledonar em meio contendo 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 10A). Em algumas espécies, quanto maior a dose de citocinina adicionada ao meio de cultura, maior é a ocorrência de explantes com sintomas de toxidez. O segmento nodal não apresentou qualquer tipo de anomalia em seus brotos, independente do tipo e dose de fitorregulador utilizados. Também não foi verificada anormalidade nos brotos formados em explantes inoculados em meio contendo KIN (Figura 10B).

A ocorrência de brotos com malformação quando advindos de segmentos inoculados em meio contendo BAP, provavelmente, ocorreu em consequência dessa citocinina ser mais ativa do que a KIN (GRAY e BENTON, 1991). As citocininas, como já mencionado, induzem à divisão celular aumentando o número de células, dessa forma, o aumento da dose de BAP no meio pode ter ocasionado um maior número de divisões celulares, provocando deformidades nos brotos. Em segmento nodal de *P. rigida*, as doses de BAP utilizadas não provocaram tal efeito, possivelmente em razão desse tipo de segmento apresentar menor concentração endógena de citocinina. Por outro lado, na multiplicação *in vitro* da arnica (*Lychnophora pinaster*) foi observada a formação de brotos anormais em segmento

nodal inoculado em meio contendo dose superior a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (SOUZA et al., 2003). Na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos, os tratamentos com 5 e $10 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP propiciaram intensa formação de tufos e pouco alongamento dos entrenós, com folhas pequenas e de coloração verde-escura, algumas apresentando encarquilhamento (AUGUSTO, 2001).



Figura 10 – Brotos formados em explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) e avaliados 60 dias após a inoculação: (A) brotos malformados em segmento nodal cotiledonar em meio contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP); (B) brotos normais formados em segmento nodal cotiledonar (esquerda) e nodal (direita) em meio contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina (KIN). Santa Maria, RS, 2008. Barra = 1 cm.

4.2.4 Formação de calo na base dos explantes

Para a porcentagem de calos formados nos explantes de *P. rigida* ocorreu diferença significativa apenas para o fator tipo de segmento e para o fator dose de fitorregulador. A maior frequência de calos foi observada em segmento nodal cotiledonar (68%), diferindo estatisticamente do segmento nodal (55%), independente do tipo e dose de fitorregulador (Figura 11). Em estudo de multiplicação do bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.), foi verificada a formação de calos em segmentos caulinares inoculados em meio contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, não sendo observada a formação destes quando o BAP estava ausente (OLIVEIRA et al., 2001). Em mogno (*Swietenia macrophylla*), a formação de calos nas extremidades dos segmentos de epicótilo ocorreu em diferentes tratamentos com BAP e ANA (BRUNETTA et al., 2006). Kirst e Sepel (1996) também observaram a presença de calos na base de explantes de ápices caulinares de canafístula (*Peltophorum dubium*) em tratamentos contendo BAP.

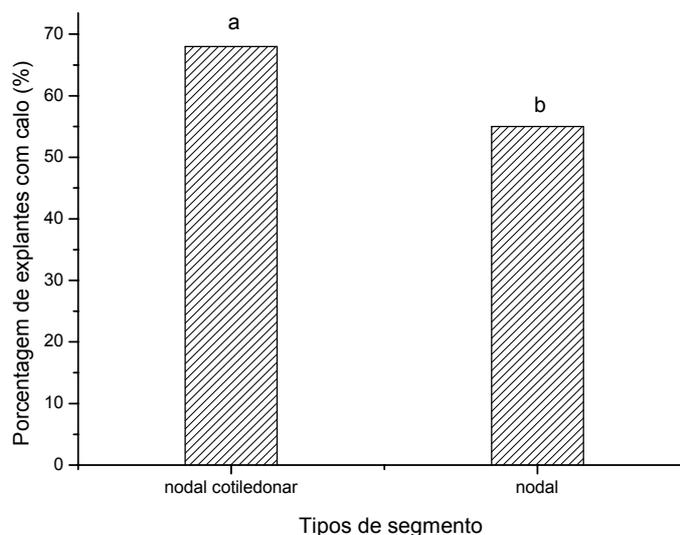


Figura 11 – Porcentagem média de explantes de *Parapiptadenia rigida* com calo na base, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), independente da dose, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

Em função da dose de fitorregulador, a porcentagem média de formação calogênica em explantes de *P. rigida* teve uma tendência crescente à medida que se aumentou a dose de fitorregulador até $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 12). A maior porcentagem média de explantes com calo ocorreu em meio contendo $0,50$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, com 70% para ambas as doses (Figura 12) e, a menor porcentagem de formação calogênica, quando estes foram inoculados em meio sem adição de fitorregulador. Em paricá (*Schizolobium amazonicum*), também foi observada uma menor freqüência de calos na base de explantes inoculados em meio com ausência de fitorreguladores e, à medida que se aumentou a dose de fitorregulador, foi verificada uma maior incidência de calos (CORDEIRO et al., 2004).

Para o tamanho médio de calo, foi verificado que ocorreu uma tendência linear crescente à medida que se aumentou a dose nos meios de cultura, sendo observados os maiores calos quando utilizado $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, independente do tipo de fitorregulador, com $0,17 \text{ cm}$ (Figura 13).

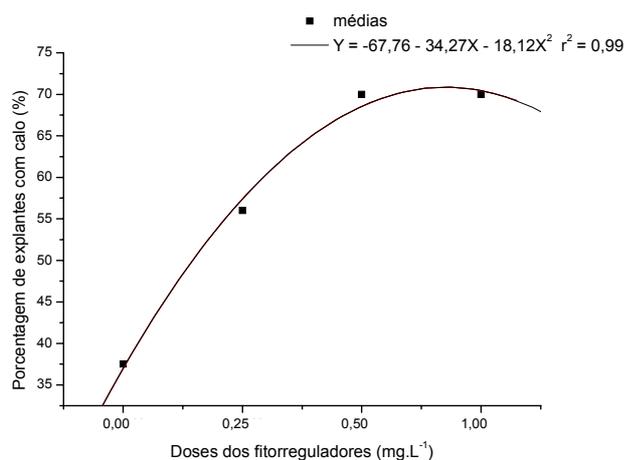


Figura 12 – Porcentagem média de explantes de *Parapiptadenia rigida* com calo na base, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹, independente do tipo de fitorregulador, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

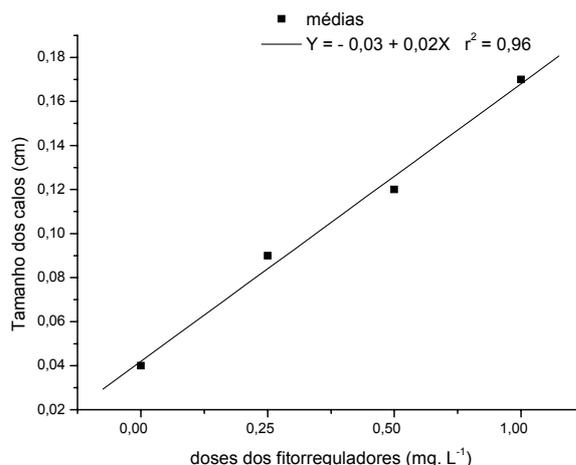


Figura 13 – Tamanho médio de calos formados na base de explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹, independente do tipo de fitorregulador, avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

Possivelmente no segmento nodal cotiledonar de *P. rigida* existam maiores níveis endógenos de auxinas que, em balanço com os níveis de BAP ou KIN adicionados ao meio, tenham promovido uma maior proliferação de calo na base desse tipo de segmento, como sugere a teoria do balanço hormonal formulada por Skoog e Miller (1957). Grattapaglia e Machado (1998) citam que na fase de multiplicação, a presença de calos em explantes não é desejável, podendo

comprometer a formação e desenvolvimento dos brotos. Esse evento foi verificado na formação de brotos de *P. rigida*, sendo observada uma menor porcentagem de explantes com broto, assim como um menor tamanho de brotos e um menor número de folhas por broto nos segmentos com maior formação calogênica, ou seja, nos explantes inoculados em meios contendo a dose de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, independente do tipo de fitorregulador.

4.3 Experimento 3 – Efeito de diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de explantes

4.3.1 Teste 1 – Enraizamento de segmentos nodal cotiledonar e nodal

Para a porcentagem de enraizamento de explantes de *P. rigida*, não houve interação entre os fatores tipo de segmento e dose de AIB, indicando que são independentes, sendo assim, o melhor resultado para o tipo de segmento não depende da dose de fitorregulador. O teste de Tukey apontou diferença significativa apenas para o fator tipo de segmento. A maior porcentagem de enraizamento ocorreu em segmento nodal cotiledonar, com 71% de explantes enraizados. Por outro lado, o segmento nodal apresentou baixo enraizamento (15%), independente da dose de AIB utilizada (Figura 14).

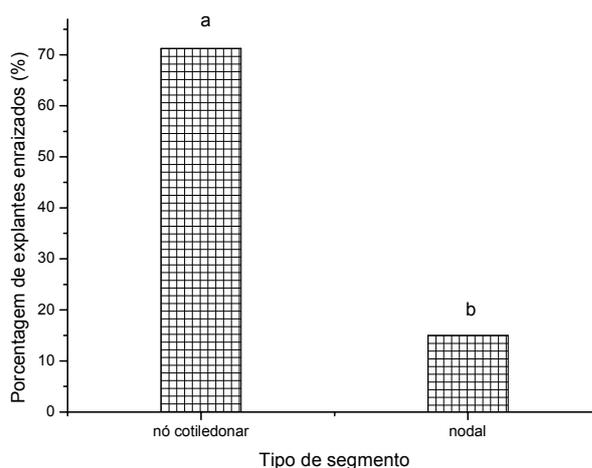


Figura 14 – Porcentagem de enraizamento de explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio $\frac{1}{4}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado e diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB), avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008.

As diferentes doses de AIB não foram capazes de promover diferenças significativas para a porcentagem de enraizamento dos explantes de *P. rigida*, contudo, foi verificada uma maior porcentagem de raízes quando utilizada a dose de 1,0 mg.L⁻¹ de AIB (60%). Esses resultados corroboram, em parte, com os obtidos no enraizamento de segmentos nodais de goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) em meio contendo 20 µM de AIB, sendo observado uma porcentagem de enraizamento de 68,9% (OLTRAMARI et al., 2000).

Para o parâmetro número de raízes por explante, não houve interação entre o tipo de segmento e a dose de fitorregulador. O maior número médio de raízes ocorreu em segmento nodal cotiledonar (1,37 raízes), diferindo significativamente dos resultados observados para o segmento nodal (0,20 raiz) (Tabela 6 e Figura 15A). O baixo potencial de enraizamento observado em segmento nodal, em todos os níveis de AIB utilizados, pode ser justificado por provável efeito residual da KIN nos explantes durante a fase de indução de brotos, desta forma, esse fitorregulador pode ter estimulado maior produção de citocininas endógenas neste tipo de segmento (VANKOVA et al., 1991; GEORGE, 1996), ocasionando um efeito negativo na formação de raízes. O balanço interno entre citocinina e auxina tem um papel fundamental na indução da diferenciação celular, existindo evidências de que ambas participem da regulação do ciclo celular. A grande variação no potencial de enraizamento entre os tipos de segmento utilizados, possivelmente está relacionada à concentração interna de auxinas e citocininas no tecido dos explantes, que varia em função da região do epicótilo onde o segmento foi coletado. Alguns tecidos sintetizam a quantidade de fito-hormônio que necessitam, contudo, outros são completamente dependentes da adição de fitorregulador (PINTO e PASQUAL, 1990). É provável também que o segmento nodal de *P. rigida* possua uma maior dependência de fonte exógena de auxina se comparado ao segmento nodal cotiledonar, dessa forma, maiores doses de AIB seriam necessárias para promover respostas morfogenéticas em segmento nodal.

Em função da dose de fitorregulador, o maior número de raízes foi observado em explantes de *P. rigida* inoculados em meio contendo 1,0 mg.L⁻¹ de AIB, com 2,35 e 0,50 raízes em segmento nodal cotiledonar e nodal respectivamente (Tabela 6 e Figura 15B). Além disso, foi verificado que, independente do tipo de segmento, ocorreu o aumento do número de raízes por explante a medida em que se aumentou a dose de fitorregulador no meio de cultura, contudo, a partir da dose de 1,0 mg.L⁻¹

de AIB foi verificado um efeito negativo na formação de raízes (Tabela 6). Galston e Davies (1972), citam que quando a auxina é aplicada em partes cortadas de plantas, a maior dose aumenta o efeito até um máximo, acima do qual qualquer acréscimo se torna fitotóxico.

Com relação ao comprimento da raiz mais longa, foi verificada diferença significativa apenas para o tipo de segmento. O comprimento médio das raízes em segmento nodal cotiledonar de *P. rigida*, independente da dose de fitorregulador, foi aproximadamente cinco vezes maior do que o obtido em segmento nodal e, apesar de não existir diferença significativa para este parâmetro nas diferentes doses de AIB utilizadas, os meios com ausência de fitorregulador promoveu os maiores comprimentos de raízes, com 8,62 cm (Tabela 6).

As raízes formadas nos explantes de *P. rigida* apresentaram coloração amarelada, sendo que, no segmento nodal, estas não possuíam raízes secundárias ou pêlos absorventes. Segundo Debergh e Maene (1981), a falta de pêlos absorventes dificulta a indução de um sistema radicular eficiente *in vitro*. Por outro lado, foram observadas ramificações nas raízes formadas em segmento nodal cotiledonar (Figura 15C). Houve a formação de maiores calos em segmento nodal cotiledonar em meio contendo 0,25 e 1,0 mg.L⁻¹ de AIB, com 0,44 e 0,36 cm respectivamente (Tabela 6). Os menores calos ocorreram em explantes inoculados em meio de cultura sem adição de fitorregulador, independente do tipo de segmento. Em segmento nodal, foi verificado que a presença de calo na base do explante limitou o desenvolvimento de raízes (Figura 15D), evento não-observado em segmento nodal cotiledonar. Leonel et al. (1994) mencionaram que a formação de calo pode ser o primeiro passo para a formação do sistema radicular. Em contrapartida, a presença de calo tem sido relatada como uma desvantagem para a sobrevivência de plantas no campo, estabelecendo uma pobre conexão entre caules e as raízes (AJITKUMAR e SEENI, 1998). Em espécies florestais, a sobrevivência de plântulas não depende apenas da formação de um sistema radicular bem definido, mas também de um sistema vascular conectando o broto e a raiz, além de uma boa relação raiz/broto (SOMMER e CALDAS, 1991).

Tabela 6 – Número de raízes, comprimento de raiz mais longa e tamanho de calo em segmentos nodal cotiledonar e nodal de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio ¼ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), em função das doses de ácido indolbutírico (AIB), avaliados 60 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2008

AIB mg. L ⁻¹	Nodal cotiledonar			Nodal		
	NR	CR	TC	NR	CR	TC
0,00	1,01	8,62	0,075	0,08	2,24	0,06
0,25	1,37	4,43	0,440	0,18	0,75	0,19
1,00	2,35	4,60	0,360	0,50	0,60	0,19
1,75	0,75	3,71	0,260	0,06	0,83	0,12
Médias	1,37	5,34	0,28	0,20	1,07	0,14

NR: Número de raízes por explante; CR: Comprimento da raiz mais longa (cm); TC: Tamanho de calos na base dos explantes (cm).

Embora tenha sido possível o enraizamento de explantes de *P. rigida*, esta etapa do processo de micropropagação necessita ser incrementada, especialmente em segmento nodal, no qual foram observados baixos índices de formação de raízes adventícias. Além disso, sugere-se a realização de estudos de enraizamento em explantes advindos de meio de indução de brotos contendo BAP desde que, entre as duas fases, os segmentos sejam transferidos para meio de alongamento de brotos.

4.3.2 Teste 2 – Enraizamento de brotos

As doses de AIB utilizadas não foram eficientes na indução de raízes adventícias em brotos de *P. rigida*. Houve formação de calo na base de todos os brotos inoculados em meio contendo 0,25 mg.L⁻¹ de AIB e no meio com ausência de fitorregulador. Nas doses de 1,0 e 1,75 mg.L⁻¹ de AIB ocorreu mortalidade de 100% dos brotos. Diversas dificuldades podem ser encontradas ao longo das diferentes etapas do processo de micropropagação de algumas espécies lenhosas. Uma das limitações dessa técnica é o enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro* (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). A não-formação de raízes em brotos de *P. rigida* pode estar relacionada ao tamanho dos brotos utilizados (0,8 a 1,0 cm), sugerindo-se que outros subcultivos sejam realizados para alongamento destes e, conseqüentemente,

favorecimento do processo de formação de raízes adventícias. Além disso, é sabido que as auxinas geralmente estimulam a formação de raízes, observando-se um alto grau de enraizamento em razão da concentração endógena desse fito-hormônio que explantes juvenis tipicamente contêm, ou por causa da grande sensibilidade nesses tecidos à aplicação exógena (ARTECA, 1995). Algumas espécies, sobretudo nas fases iniciais de indução da formação das raízes, já possuem um nível endógeno de auxina suficiente, enraizando sem a necessidade de adição de fitorreguladores. Neste estudo, talvez as doses de AIB utilizadas tenham sido limitantes na formação de raízes nos brotos. Outra hipótese para a não-formação de raízes nos brotos seria a existência um provável efeito residual da KIN nos explantes durante a fase de indução de brotos, ocasionando uma maior produção de citocininas endógenas nos explantes (VANKOVA et al., 1991; GEORGE, 1996) e, conseqüentemente, um efeito negativo na rizogênese.

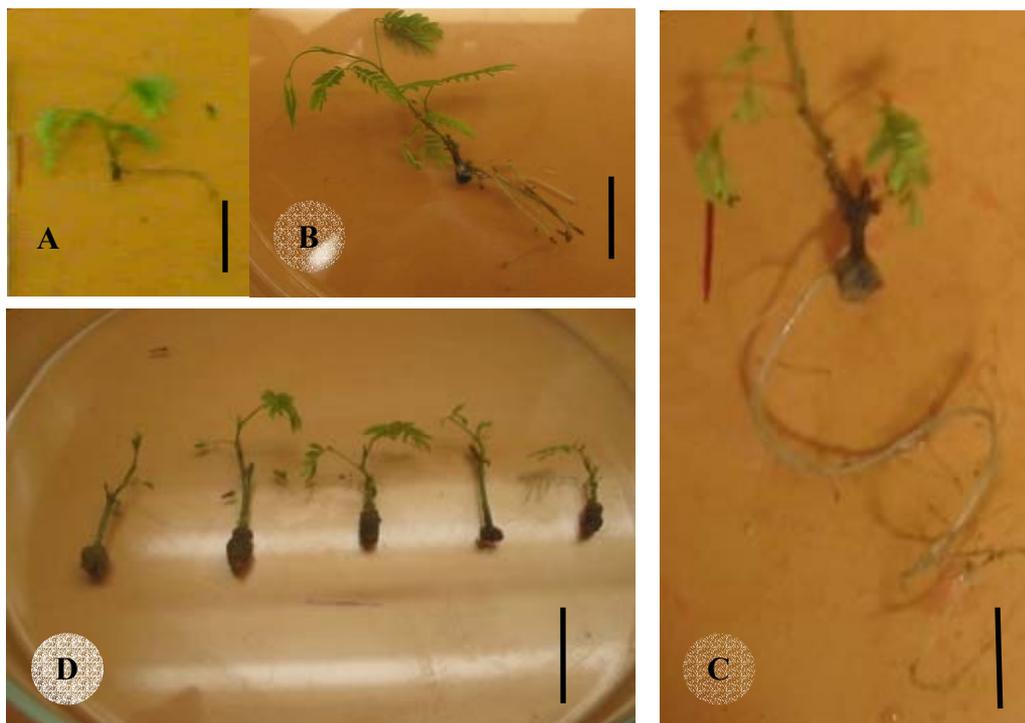


Figura 15 – Enraizamento em explantes de *Parapiptadenia rigida* inoculados em meio $\frac{1}{4}$ WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescido de diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB), avaliado aos 60 dias após a inoculação: (A) raízes em segmento nodal cotiledonar ($1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ de AIB); (B) raiz em segmento nodal ($1,75 \text{ mg. L}^{-1}$ AIB); (C) raiz em segmento nodal cotiledonar ($1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ AIB); (D) calos formados na base de segmentos nodal cotiledonar ($0,25 \text{ mg. L}^{-1}$). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, 2008.

Em brotos de cedro-rosa (*Cedrela fissilis*), provenientes de segmento nodal cotiledonar, foi observado uma porcentagem de enraizamento de 87 a 100% no tratamento com 2,5 μM de AIB (NUNES et al., 2002). Em brotos de ameixeira (*Prunus domestica* L.), obtidas por meio da cultura de meristemas, observou-se 91,11% de brotos enraizados quando utilizado 0,20 mg.L^{-1} AIB (MAGALHÃES JÚNIOR e PETERS, 1991). Para a mesma espécie, Orlov (2001) obteve 61% de enraizamento, utilizando 2 mg.L de AIB. Em brotos de caqui (*Diospyros kaki*), foi observada a formação de 2,24 e 2,90 raízes quando utilizadas as doses de 50 e 100 μM de AIB respectivamente (TELLES e BIASI, 2005). Por outro lado, Del Ponte (1999) verificou que houve formação de calos em brotos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) na dose de 0,6 mg.L^{-1} de AIB. Leite et al. (1994) não obtiveram respostas significativas ao tentaram enraizar Pereira cv. Bartlett em meio contendo AIB.

4.4 Experimento 4 – Aclimatização das plantas regeneradas *in vitro*

A fase de aclimatização é considerada limitante para a maior parte das plantas micropropagadas pelas altas taxas de perdas que podem acarretar. Neste estudo não foi possível realizar uma análise estatística devido ao alto índice de mortalidade, o que ocasionou uma acentuada redução do número de plantas.

A porcentagem de sobrevivência ao término do processo de aclimatização teve considerável variação em função do tratamento de origem das plantas. Numa amostra total de 75 indivíduos provenientes da regeneração de segmento nodal cotiledonar, independente da dose de fitorregulador utilizada na fase de enraizamento, foi observada uma porcentagem de sobrevivência de 42% (Tabela 7). O maior índice de sobrevivência (68%) ocorreu em plantas obtidas da regeneração de segmento nodal cotiledonar inoculado em meio de enraizamento contendo 1,0 mg.L^{-1} de AIB (Tabela 7). Resultado semelhante foi obtido por Rogalski et al. (2003) obtendo maior sobrevivência de plantas de *Prunus* sp. quando enraizadas em meio contendo 1,0 mg.L^{-1} de AIB. Em *cabralea canjerana* foi observada a maior sobrevivência de plantas provenientes do enraizamento de microestacas em 5 e 10 μM de AIB, com 86 e 89% de sobrevivência respectivamente.

As mudas de *P. rigida* obtidas do enraizamento de segmento nodal mostraram-se muito sensíveis à transferência para o ambiente *ex vitro*, apresentando uma porcentagem total de sobrevivência de apenas 7% (Tabela 7). As

menores porcentagens de sobrevivência ocorreram em plantas advindas da regeneração de segmento nodal em meio de enraizamento contendo 0 e 0,25 mg.L⁻¹ de AIB, com 100% de mortalidade após a aclimatização (Tabela 7).

Tabela 7 – Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Parapiptadenia rigida* regeneradas *in vitro*, após 60 dias de aclimatização, em função da origem (segmento nodal cotiledonar ou nodal) e das doses de AIB (0; 0,25; 1,0 e 1,75) utilizadas durante a fase de enraizamento. Santa Maria, RS, 2008

AIB (mg. L ⁻¹)	Sobrevivência após aclimatização (%)	
	Segmento nodal cotiledonar	Segmento nodal
0,00	33	0
0,25	20	0
1,00	68	7
1,75	35	5
Total (%)	42	7

O desenvolvimento de tecnologias de propagação *in vitro* permite uma propagação de plantas em menor espaço de tempo e com alto rendimento, contudo, para que o sistema de micropropagação seja completo é necessário que a fase de aclimatização seja bem sucedida. Esta fase é muito delicada, sendo necessário, dentre outros fatores, que a planta habite um substrato que lhe propicie condições para o seu desenvolvimento. Nesse estudo, apesar de ter sido possível a obtenção de plantas a partir da regeneração dos segmentos nodal cotiledonar e nodal, sugere a utilização de outras composições de substratos para uma possível otimização do processo de aclimatização das plântulas de *P. rigida*.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

As sementes de *Parapiptadenia rigida* podem ser desinfestadas com 2,5% de hipoclorito de sódio, com imersão durante 30 min.

Não é necessária a utilização de BAP ou KIN na indução de brotos em segmentos nodal cotiledonar e nodal de *P. rigida*.

Os segmentos nodal cotiledonar e nodal inoculados em meio contendo 0,50 mg.L⁻¹ de KIN apresentaram brotos mais alongados e com maior número de folhas.

O segmento nodal cotiledonar é o melhor tipo de explante para regeneração *in vitro* de *P. rigida* se comparado ao segmento nodal.

O maior número de raízes é obtido em explantes de *P. rigida* inoculados em meio contendo 1,0 mg. L⁻¹ de AIB.

A maior porcentagem de sobrevivência ocorre em plantas obtidas da regeneração de segmento nodal cotiledonar advindo de meio de enraizamento contendo 1,0 mg.L⁻¹ AIB.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A. J. Practice and promise of micropropagation of woody species. **Acta Horticulturae**, v. 79, p. 113-127, 1987.

AJITKUMAR D.; SEENI, S. Rapid clonal multiplication through *in vitro* axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal tree. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 422-426, 1998.

ALMEIDA, J. L. et al. Indução de enraizamento na micropropagação do urucuzeiro. **Rev. Fac. Agron.**, v. 21, p. 129-135, 1995.

AMARAL, V. F. M. Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciênc. Agrotec.**, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar. 2000.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. Pennsylvania: Chapman & Hall, 1995, 332 p.

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998, p. 261-296.

AUGUSTO, C. S. S. **Multiplicação da amoreira-preta vc. Brazos**. 2001. 132 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BIASI, L. A. **Micropropagação do abacateiro ouro verde através da cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de discos foliares**. 1993. 163 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BLAKESLEY, D., WESTON, G. D., HALL, J. F. The role endogenous auxin in root initiation. **Plant Growth Regulation**. v. 10, p. 341-353, 1991.

BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992, 236 p.

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

BRANDT, F. M.; MARSCHELAK, R. Melhoramento Florestal. Disponível em: <<http://home.furb.br/rubensm/>>. Acesso em: 15 abr. 2006.

BRUNETTA, J. M. F. C. et al. Calogênese *in vitro* segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, ago. 2006.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. F.; ELIAS, M. Meios nutritivos. In: CALDAS, L. S.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA - CNPH, v. 1, 1998, 509 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – EMBRAPA – CNPF. Colombo – PR, 2003, 1039 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed., Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588 p.

CASTENALLI, E. D. et al. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. VAR. *Variegata*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 41-44, 1996.

CASTRO, P.R.C. Mecanismo de ação auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 36, p. 621-634, 1979.

CID, L. P. B. et al. Micropropagation of *Miconia* sp. a woody melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Rev. Bras. de Fis. Veg.**, v. 9, n. 1, p. 21-25, 1997.

COELHO, M. C. F. et al. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciênc. agrotec.**, v. 25, n. 1, p. 38-48, Jan./Fev. 2001.

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

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

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

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação de goiabeira serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, p. 60-64, 1999.

DEL PONTE, E. M. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* ssp. *Globulus Labill.*** 1999. 47 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DEBERGH, P. C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 291-300, 1991.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Amscheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 14, p. 335-345, 1981.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H., **Micropropagation: technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic, 1991, p. 1-13.

DESJARDINS, Y.; GROSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex-vitro* strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 112, n. 5, p. 846-851, 1987.

DUTRA, L. F.; TONIETTO, A.; KERSTEN, E. Efeito da aplicação de ethefon em ameixeira (*Prunus salicina* Lindl) e do IBA no enraizamento de suas estacas. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 2, p. 296-304, maio/ago.1998.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Cerrados. **Programa de Melhoramento busca o lançamento de cultivares de manga**. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/materias_pripag/manga.html>. Acesso em 15 dez. 2006.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, jul./set., 2006.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FERREIRA, G. A.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. 1. ed., Editora Artmed, Porto Alegre, 2004, 324 p.

FICK, T. A. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciênc. agrotec.**, v. 28, n. 1, p. 49-55, jan./fev. 2004.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento, 3 Ed. Revista Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS; UFSC, p. 105-124, 2001.

FRANCO, E. T. H.; GAVIOLLI, L. B.; FERREIRA, A. G. *In vitro* regeneration of *Didymopanax morototoni*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 455-462, 2006.

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

GALSTON, A. W.; DAVIES, P. J. **Mecanismo de controle no desenvolvimento vegetal**. 2 ed. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1972. 171 p.

GASPAR, T. et al. A Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology**, v. 32, p. 272-289, Oct./Dec. 1996.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. The technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. EMBRAPA/ ABCTP - CNPH, Brasília, p. 19-25, 1990.

GOMES, M. S. R.; DE CARVALHO, M. G; DE CARVALHO, A. G. **Constituintes químicos isolados de *Parapiptadenia rigida* Benth. (Leguminosae:**

Mimosoideae). Disponível em: <<http://www.ice.ufrj.br/posgrad/pdf/res-16.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2007.

GRAÇA, M. E. C.; TAVARES, F. R. Propagação vegetativa de espécies florestais. In: GALVÃO, A. P. M. **Reflorestamento de Propriedades Rurais para fins Produtivos e Ambientais**. Brasília: EMBRAPA FLORESTAS, p. 175-197, 2000.

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

GRAY, D. J.; BENTON, C. M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, n. 1, p. 7-14, 1991.

GRIGOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomez (Mangabeira)**. 1997. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 533-568, 1998.

GUERRA, M. P; NODARI, R. O. **Material Didático de apoio à disciplina de biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm>. Acesso em: 14 fev. 2007.

GUPTA, P. K. et al. Forestry in the 21st Century. **BioTechnology**, v. 11, p. 454-459, 1993.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 539-560, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed., New Jersey: Prentice-Hall, 1997, 770 p.

HOFFMANN, A. et al. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319 p.

KIRST, M.; SEPEL, L. M. N. **Micropropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert a partir de ápices caulinares de plântulas**. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMAS NATURAIS DO MERCOSUL, 1. 1996, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1996. p.141-146.

KOZAI, T.; SMITH, A. L. Environmental control in plant tissue culture – general introduction and overview. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. L. **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 301-318, 1995.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, p. 41-77, 1991.

LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. R.; LOPES, S. C. Efeito da sacarose e luminosidade sobre a germinação *in vitro* de embriões de cedro. **Comunicado Técnico**, Embrapa Amazônia Oriental, n. 20, p. 1-3, 2000.

LEITE, D. L. et al. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento “*in vitro*” das cvs. de pereira “Bartlett”, “Hosui” e “Okusankichi” e do clone “OHxF97”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 16, n. 1, p. 236-241, 1994.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J. D.; CEREDA, E. Ação de fitorreguladores e ácido bórico em estacas de Lichia (*Litchi chinensis* Sonn), **Scientia Agrícola**, v. 50, n. 1, p. 33-39, 1994.

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

LOPES, S. C. **Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla*)**. 2000. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, v. 1, São Paulo, 2000.

MACHADO, M. P. et al. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira vr 043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Cienc. Agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 648-655, jul./ago. 2006.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; PETERS, J. A. Cultura *in vitro* de ameixeira: efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 57-61, 1991.

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

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; GUERRA, M. P. Micropropagação da caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl) Dene. Et Planch. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.

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

MARCHANT, B. Acclimatizing plants produced by tissue culture. **American Nurseryman**, v. 15, p. 31-33, 1982.

MARTINS-CORDER, M. P.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* De Wild. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

METIVIER, J. R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. 2.ed., São Paulo: EDUSP, v. 2, 1986, p. 93-162.

MISHRA, M. et al. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, v. 31, n. 3/4, p. 116-122, 1999.

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

MOREIRA-DIAS, J.M. et al. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v. 87, p. 275-290, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NOBRE, J. et al. *In vitro* cloning of *Ficus carica* L. adult trees. **Acta Horticulturae**, n. 480, p. 161-164, 1998.

NOGUEIRA, R. C. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.). **Ciênc. agrotec.**, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, set/out. 2004.

NOLASCO, L. L. et al. **Micropropagação *in vitro* de amoreira-preta CV Xavante**. In: XVI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Pelotas, RS, 2005. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/xivcic/arquivos/CA_01092.rtf>. Acesso em: 14 fev. 2007.

NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiology Plant**, v. 100, p. 431-442, 1997.

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

OLIVEIRA, A. K. D. et al. Multiplicação *in vitro* do Bilimbi utilizando diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, v. 14, n. 1/2, p. 37-41, dez. 2001.

OLTRAMARI, C. et al. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Cienc. Rural**, v. 30, n. 1, Jan./Mar. 2000.

ORLOV, O. L. et al. **Influência do ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de ameixas (*Prunus domestica* L.) vars. Eliscevskaia e Kantimirovskaia**. In: REUNIÃO TÉCNICA DE FRUTICULTURA, 2001, Bagé. **Anais...** Porto Alegre: FEPAGRO, 2001.

PASSOS, I. R. S. **Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp. e em *Passiflora nitida* H.B.K.** 1999. 112 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações. Lavras: UFLA/AEPE, 2001, 74 p.

PAULA, R. N. **Ferramentas e estratégias no melhoramento do eucalipto**. Revista da madeira, n. 88, 2005. Disponível em: <<http://www.remade.com.br/revista/materia>>. Acesso em: 2 jan. 2007.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Universa**, v. 8, p. 181-195, 2000.

PÉREZ-PARRON, M. A.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; PÉREZ C. Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 37, p. 297-302, 1994.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri: Mundi-Prensa, 1990, 326 p.

PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos**, Lavras: ESAL, 1990. 73 p. (Apostila).

RIBAS, L. L. F. **Morfogênese *in vitro* e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. (Peroba-rosa)**. 1999. 175 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

ROGALSKI, M. et al. Aclimatização de porta-enxerto de *Prunus* sp. micropropagados. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, n. 2, p. 279-281, Ago. 2003.

ROSS, C. W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberellins. In: SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. (Eds.). **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth, 1992, p. 357- 377.

SANCHEZ, M. C. et al. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* derived from mature trees. **Tree Physiology**, v. 16, p. 673-680, 1996.

SCHOTTZ, E. S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) a partir de material juvenil. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 2, p. 109-117, abr-jun. 2007.

SILVA, A. L. L. da et al. Germinação *in vitro* de sementes de mogango (*Curcubita pepo* L.). **Ciência e Natura**, v. 27, n. 1, p. 19-28, 2005.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-231, 1957.

SOMMER, H. E.; CALDAS, L. S. *In vitro* methods applied to forest trees. In: THORPE, T. A., (ed.). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. Academic Press, New York: 1991. p. 349-358.

SOUZA, A. V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciênc. agrotec.**, Edição Especial, p. 1532-1538, dez. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: The Benjamin/Cummings Publishings Company, 1991. 565 p.

TELLES, C. A.; BIASI, L. A. Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa-de-vegetação do caquizeiro (*Diospyrus kaki* L.). **Ciênc. agrotec.**, v. 29, n. 2, p. 481-484, mar./abr. 2005.

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

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

TRAN THANH VAN, K. Control of morfogenesis by inhrent and exogenously applied factors in thin cell layer. **Int. Rev. Cyt.**, v. 11A, p. 175-194, 1980.

TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? **Plant Cell Environment**. v. 4, p. 203–204, 1981.

VANKOVA, R. et al. Effects of synthetic cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 10, p. 197-199, 1991.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa: Editora UFV, 2002. 64 p. (Caderno Didático, 92).

WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M-26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. **Physiol Plant**, v. 58, n. 3, p. 231-238, 1983.

WISNIEWSKI M.; CLOSE T. J., ARTLIP T.; ARORA R. Seasonal patterns of dehydrins and 70-kD heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. **Physiol Plant**, v. 96, p. 496-505, 1996.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* submetidas a 0; 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 5; 10; 15 e 30 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	2	501.3050	250.6525	1.2843 NS
FATOR B	3	1192.6210	397.5403	2.0369 NS
FATOR AXB	6	3921.6292	653.6049	3.3489 *
TRATAMENTOS	11	5615.5552	510.5050	
RESIDUO	36	7026.0627	195.1684	

Média 57.4398

Coefficiente de variação 24.3216

APÊNDICE B – Análise de variância da porcentagem de contaminação de sementes de *Parapiptadenia rigida* submetidas a 0; 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 5; 10; 15 e 30 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	2	23183.3905	11591.6953	42.6242 **
FATOR B	3	3165.3253	1055.1084	3.8798 *
FATOR AXB	6	3056.1925	509.3654	1.8730 NS
TRATAMENTOS	11	29404.9082	2673.1735	
RESIDUO	36	9790.2289	271.9508	

Média 47.2101

Coefficiente de variação 34.9309

APÊNDICE C - Análise de variância da porcentagem média de explantes de *Parapiptadenia rigida* com formação de broto, em meio ½ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitoregulador (BAP ou KIN) e da dose de fitoregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSA DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	2818.9696	2818.9696	18.0692 **
FATOR B	1	446.2885	446.2885	2.8606 NS
FATOR C	3	1302.5180	434.1727	2.7830 *
FATOR AXB	1	949.8859	949.8859	6.0886 *
FATOR AXC	3	2166.5960	722.1987	4.6292 **
FATOR BXC	3	451.3555	150.4518	.9644 NS
FATOR AXBXC	3	323.7052	107.9017	.6916 NS
TRATAMENTOS	15	8459.3188	563.9546	
RESIDUO	48	7488.4553	156.0095	

Média 80.3635

Coefficiente de variação 15.5423

APÊNDICE D - Análise de variância do tamanho de brotos formados em segmento nodal cotiledonar e nodal de *Parapiptadenia rigida*, meio $\frac{1}{2}$ WPM, em função do tipo de fitorregulador (6-benzilaminopurina - BAP ou cinetina - KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSA DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.2022	.2022	21.8932 **
FATOR B	1	.0216	.0216	2.3408 NS
FATOR C	3	.5476	.1825	19.7581 **
FATOR AXB	1	.0079	.0079	.8558 NS
FATOR AXC	3	.0402	.0134	1.4489 NS
FATOR BXC	3	.0151	.0050	.5436 NS
FATOR AXBXC	3	.0063	.0021	.2282 NS
TRATAMENTOS	15	.8409	.0561	
RESIDUO	48	.4434	.0092	

Média 0.2965

Coeficiente de variação 32.4159

APÊNDICE E – Análise de variância do número de folhas em brotos de *Parapiptadenia rigida* em explantes inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitorregulador (6-benzilaminopurina - BAP ou cinetina - KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSA DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.1754	.1754	3.4360 NS
FATOR B	1	.6013	.6013	11.7755 **
FATOR C	3	2.6912	.8971	17.5682 **
FATOR AXB	1	.1555	.1555	3.0448 NS
FATOR AXC	3	.8464	.2821	5.5251 **
FATOR BXC	3	.5446	.1815	3.5554 *
FATOR AXBXC	3	.0728	.0243	.4755 NS
TRATAMENTOS	15	5.0873	.3392	
RESIDUO	48	2.4510	.0511	

Média 1.0688

Coeficiente de variação 21.1414

APÊNDICE F – Análise de variância da porcentagem de explantes de *Parapiptadenia rigida* com calo na base, inoculados em meio $\frac{1}{2}$ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitorregulador (6-benzilaminopurina - BAP ou cinetina - KIN) e da dose de fitorregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSA DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	1801.5683	1801.5683	4.0409 *
FATOR B	1	15.7912	15.7912	.0354 NS
FATOR C	3	10701.7069	3567.2356	8.0012 **
FATOR AXB	1	34.4023	34.4023	.0772 NS
FATOR AXC	3	105.4514	35.1505	.0788 NS
FATOR BXC	3	2360.4194	786.8065	1.7648 NS
FATOR AXBXC	3	1042.8130	347.6043	.7797 NS
TRATAMENTOS)	15	16062.1525	1070.8102	
RESIDUO	48	21400.2019	445.8375	

Média 53.7318; Coeficiente de variação 39.2968

APÊNDICE G – Análise de variância do tamanho do calo na base de explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio ½ WPM, em função do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), do tipo de fitoregulador (6-benzilaminopurina - BAP ou cinetina - KIN) e da dose de fitoregulador (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSA DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.0145	.0145	10.1903 **
FATOR B	1	.0015	.0015	1.0209 NS
FATOR C	3	.1135	.0378	26.5572 **
FATOR AXB	1	.0007	.0007	.4750 NS
FATOR AXC	3	.0031	.0010	.7210 NS
FATOR BXC	3	.0098	.0033	2.2965 NS
FATOR AXBXC	3	.0025	.0008	.5883 NS
TRATAMENTOS	15	.1456	.0097	
RESIDUO	48	.0684	.0014	

Média 0.1040

Coefficiente de variação 36.3076

APÊNDICE H – Análise de variância da porcentagem de enraizamento em explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio ¼ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	25312.5000	5312.5000	21.6740 **
FATOR B	3	2711.0000	903.6667	.7738 NS
FATOR AXB	3	1461.0000	487.0000	.4170 NS
TRATAMENTOS	7	29484.5000	4212.0714	
RESIDUO	24	28029.0000	1167.8750	

Média 43.1250

Coefficiente de variação 79.2445

APÊNDICE I – Análise de variância do número de raízes em explantes de *Parapiptadenia rigida*, inoculados em meio ¼ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	10.8462	10.8462	21.0023 **
FATOR B	3	4.6600	1.5533	3.0079 *
FATOR AXB	3	1.7150	.5717	1.1070 NS
TRATAMENTOS	7	17.2212	2.4602	
RESIDUO	24	12.3943	.5164	

Média 0.8897

Coefficiente de variação 80.7732

APÊNDICE J - Análise de variância da porcentagem de formação de calo em explantes de *Parapiptadenia rigida* em meio ¼ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	1756.3682	1756.3682	1.8689 NS
FATOR B	3	5680.0024	1893.3341	2.0146 NS
FATOR AXB	3	3291.5841	1097.1947	1.1675 NS
TRATAMENTOS	7	10727.9548	1532.5650	
RESIDUO	24	22555.0265	939.7928	

Média 47.6967

Coefficiente de variação 64.2729

APÊNDICE K - Análise de variância do tamanho de calo formado em explantes de *Parapiptadenia rigida* em meio ¼ WPM, em função das doses 0; 0,25; 1,0 e 1,75 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de segmento (nodal cotiledonar ou nodal), avaliados 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.1610	.1610	5.6458 *
FATOR B	3	.1906	.0635	2.2279 NS
FATOR AXB	3	.1558	.0519	1.8206 NS
TRATAMENTOS	7	.5074	.0725	
RESIDUO	24	.6845	.0285	

Média 0.2141

Coefficiente de variação 78.8948