

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

**QUALIDADE DE SEMENTES, MICROPROPAGAÇÃO,  
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E ISOLAMENTO DE DNA  
GENÔMICO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.**

**TESE DE DOUTORADO**

**Enrique Asterio Benítez León**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**QUALIDADE DE SEMENTES, MICROPROPAGAÇÃO,  
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E ISOLAMENTO DE DNA  
GENÔMICO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.**

**Enrique Asterio Benítez León**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lia Rejane Silveira Reiniger**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

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

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado**

**QUALIDADE DE SEMENTES, MICROPROPAGAÇÃO,  
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO DE  
*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.**

elaborada por  
**Enrique Asterio Benítez León**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Engenharia Florestal**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Leandro Vieira Astarita, Dr. (PUCRS)**

**Caroline Borges Bevilacqua, Dr<sup>a</sup> (Embrapa – CT)**

**Berta Heinzmann, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

**Maristela Machado Araújo, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

**Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela saúde e pela fortaleza para superar as dificuldades.

Ao meu amado filho Diego Enrique. Nenhuma palavra jamais poderá expressar o meu agradecimento pelo amor demonstrado nos momentos difíceis e o meu orgulho pela tua força, e por nunca ter desistido de lutar ao meu lado.

A minha amada Juliana, pelo seu amor, dedicação, carinho e apoio constantes durante todos os momentos, tornando muito mais agradável esta etapa. Sem você, com certeza, teria sido muito mais difícil conseguir superar as dificuldades, e os bons momentos não teriam tido o mesmo sentido.

Aos meus estimados pais Gilberto e Cornelia, por terem continuamente me incentivado a seguir adiante, buscando as vitórias como fruto do meu próprio esforço, sempre respeitando e ajudando ao próximo, e colocando Deus em primeiro plano.

A minha irmã e grande amiga Griselda, e ao meu sobrinho Eduardo, por sua dedicação e auxílio em tudo que sempre precisei, e principalmente, pelo cuidado e carinho dedicados ao meu filho na minha ausência.

A querida Giulia, a minha filha que já veio pronta, obrigado pelo carinho, companhia e bons momentos compartilhados.

A minha prezada Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Lia Rejane Silveira Reiniger, por sua paciência, apoio e dedicação, e principalmente, por sua amizade. Desde o início, trabalhar com você me proporcionou imensurável aprendizado profissional e pessoal.

As minhas queridas colegas e, sobretudo, amigas Aline Ritter Curti e Aline Ferreira Paim, agradeço pelos momentos inesquecíveis que vivenciamos juntos, e por sua colaboração em todas as atividades de laboratório.

Aos colegas de laboratório, Carla Moro, Karol Buuron da Silva, Clarissa Stahl Gomes, Jaqueline Ottonelli, Charlene Moro Stefanel, Silvia Machado dos Santos, Iana Somavilla, Danieli Ferneda Candido, Júlio Rieger Lucchese e Leonardo Severo da Costa, pelo auxílio prestado nas diferentes atividades durante a realização dos experimentos, e por sua amizade.

A UFSM por disponibilizar a estrutura e os recursos necessários para o desenvolvimento do curso de doutorado, e aos docentes do PPGEF pelos ensinamentos proporcionados.

A *Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias*, pelos primeiros incentivos à minha jornada acadêmica e científica, e pelo apoio proporcionado no decorrer deste período.

À CAPES, que por meio do Programa de Estudante Convênio de Pós- Graduação (PEC-PG), proporcionou o apoio financeiro para a realização do curso.

A todo pessoal do Departamento de Fitotecnia da UFSM, especialmente ao seu João, que sempre arranhou um “jeito” para resolver os problemas.

Ao Instituto Regional de Desenvolvimento Rural da UNIJUI, pelo apoio na coleta de sementes para realização de um dos experimentos.

Ao setor de Floricultura do Colégio Politécnico da UFSM, por disponibilizar espaço para realização de parte dos experimentos de aclimatização *ex vitro*.

À Prof<sup>a</sup>. Marlove Fátima Brião Muniz, à Maria e aos colegas do laboratório de Fitopatologia da UFSM, pelo apoio e auxílio na realização das análises de qualidade sanitária de sementes.

Aos professores Leandro Vieira Astarita, Maristela Machado Araújo, Berta Heinzmann, Diego Pascoal Golle, Marlove Fátima Brião Muniz e a Dra. Caroline Borges Bevilacqua por gentilmente aceitarem participar da minha banca examinadora.

Aos meus amigos Fabio Pacheco Menezes e Nathalia Riveros Ciancio, pelo apoio e por todos os bons momentos vivenciados.

Aos amigos e vizinhos Daniel S. Chagas, Rosa M. Balbuena, Ruben Boelter, Luciane Oleques, Adilson Bittencourt e Luciana Fritzen, por sua amizade e parceria em momentos importantes.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas que, de uma ou outra forma, contribuíram para a finalização do curso de doutorado. Com certeza estas páginas não seriam suficientes para expressar o meu agradecimento. Sem o apoio de cada um de vocês, esse momento não seria possível. Assim, simplesmente me resta dizer, **MUITO OBRIGADO A TODOS.**

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

**QUALIDADE DE SEMENTES, MICROPROPAGAÇÃO, CONSERVAÇÃO *IN VITRO***  
**E ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.**

**AUTOR: ENRIQUE ASTERIO BENÍTEZ LEÓN**  
**ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER**  
**Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014**

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc., é uma espécie nativa, dos Biomas Mata Atlântica e Pampa, pertence à família Malvaceae, conhecida comumente como açoita-cavalo. Considerando-se a necessidade de recuperação e restauração de áreas degradadas, a demanda crescente por sementes e mudas de espécies florestais nativas, e a contribuição de trabalhos de pesquisa com espécies nativas será de grande importância para o setor florestal e ambiental, o presente trabalho objetivou avaliar a qualidade de sementes, analisar e selecionar metodologias para a micropropagação e para a conservação *in vitro* de *Luehea divaricata* e, também, para o isolamento de DNA genômico da espécie. Foram conduzidos testes de qualidade fisiológica e sanitária de sementes conservadas em papel Kraft no interior de refrigerador, em dois períodos distintos, coletadas em diferentes pontos de ocorrência natural da espécie. No desenvolvimento de metodologias para micropropagação os estudos foram divididos em diferentes experimentos, testando-se, primeiramente, as respostas de culturas iniciadas a partir de epicótilos, aos estímulos de diferentes fontes e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro*. Na sequência, foi avaliado o efeito do tratamento “pulse” com concentrações de AIB sobre a capacidade de enraizamento *in vitro* de segmentos nodais, cultivados em meios nutritivos MS ou WPM, na presença ou ausência de carvão ativado. Na fase de aclimatização de plantas micropropagadas foram avaliados o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio nutritivo WPM, e, também, de dois tipos de substratos comerciais. Foi verificado adicionalmente, o efeito do regulador osmótico manitol, associado ou não à sacarose, sobre o desempenho *in vitro* de segmentos nodais, visando à conservação *in vitro* de germoplasma. Foram testados três protocolos para isolar DNA genômico a partir de folhas jovens, comprovou-se sua qualidade e eficiência, por meio de quantificação por espectrofotometria e digestão com a endonuclease de restrição *Hind* III. Os principais resultados obtidos demonstraram que sementes de açoita-cavalo apresentam diferenças na sua qualidade fisiológica e sanitária, e mantêm a sua viabilidade após seis meses de armazenamento em refrigerador. Para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo a adição de citocininas ao meio nutritivo é dispensável, e quando adicionadas, promovem formação de calos, indesejados nessa fase. O enraizamento *in vitro* de segmentos nodais é bem-sucedido em meio nutritivo WPM na ausência de carvão ativado e obteve-se que o tratamento “pulse” com concentrações de AIB superiores a 9µM pode otimizar o processo. A concentração 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo WPM é eficiente na formação de plantas passíveis de aclimatização utilizando-se substrato comercial Mecplant® ou H-Decker®. É possível a conservação *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo, sob condições de crescimento mínimo, pelo período de 120 dias com a utilização de manitol combinado a concentrações de sacarose de até 15 g L<sup>-1</sup>, no meio nutritivo ½MS. Os protocolos de isolamento de DNA são eficientes em obter DNA com quantidade e qualidade aceitáveis, porém, ainda com a presença de proteínas e polissacarídeos. Os resultados obtidos poderão contribuir com as informações existentes sobre a propagação *in vitro* de açoita-cavalo, apoiando programas de melhoramento, conservação de germoplasma e análise da variabilidade genética de populações naturais.

**Palavras-chave:** açoita-cavalo, melhoramento florestal, propagação vegetativa

# ABSTRACT

Doctor Thesis  
Undergraduation in Forest Engineering  
Universidade Federal de Santa Maria

## SEED QUALITY, MICROPROPAGATION, *IN VITRO* STORAGE AND ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

**AUTHOR: ENRIQUE ASTERIO BENÍTEZ LEÓN**  
**ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER**  
**Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, february 27 th 2014.**

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc., is a native species, found in the Atlantic Forest and Pampa biomes in Rio Grande do Sul state, Brazil, belonging to the Malvaceae family. Considering the need for recovery and restoration of degraded areas, the demand for seeds and seedlings of native species may register significant increases, and the contribution of research studies to native species will be of great importance for both the forestry and the environmental sectors. This study aimed to research the quality of seeds, the development of methodologies for micropropagation and *in vitro* conservation of *Luehea divaricata* and isolation of genomic DNA of the species. Physiological and sanitary quality tests of seeds stored in Kraft paper inside refrigerator, in two different periods, collected from different places of its natural habitat, were conducted. The development of methodologies for micropropagation studies were divided in different experiments, testing at first, the response of cultures initiated from epicotyl, to stimuli from different sources and concentrations of cytokinin on *in vitro* multiplication. Afterwards, the pulse effect treatment with concentrations of IBA on the rooting ability of *in vitro* nodal segments cultivated in nutrient medium MS or WPM were tested both presence or absence of activated charcoal. For acclimatization of micropropagated plants, the effect of different concentrations of sucrose in the nutrient medium WPM and two kinds of commercial substrates were evaluated. The effect of the, osmotic regulator, mannitol, presence or absence sucrose, on the performance of *in vitro* nodal segments, aimed at *in vitro* conservation of germplasm was also observed. Three protocols were tested to isolate genomic DNA from young leaves, proving its efficiency and quality by spectrophotometry quantification and digestion with the *Hind* III restriction endonuclease. The main results show that genotypes differ both in their physiological and sanitary quality, and maintain their viability after six months of storage in a refrigerator. For *in vitro* multiplication of nodal segments, the addition of cytokinins to the nutrient medium is dispensable, and when added, promote callus formation, unwanted at such stage. The rooting of nodal segments is successful in nutrient medium WPM in the absence of activated charcoal and it was found that the pulse treatment with IBA concentrations exceeding 9µM may optimize the process. The concentration of 30 g L<sup>-1</sup> sucrose in the nutrient medium WPM is effective in develop plants capable of acclimatization using either commercial substrate Mecplant® or H-Decker®. It is possible *in vitro* conservation of nodal segments under minimal growth for a period of 120 days with the use of mannitol combined with sucrose concentrations of up to 15 g L<sup>-1</sup> in the nutrient medium ½MS. The DNA isolated protocols were effective to obtain DNA concentration and quality still with the presence of proteins and polysaccharides. The results may contribute to the existing information on the *in vitro* propagation of *Luehea divaricata*, supporting breeding programs, germplasm conservation and analysis of genetic variability in natural populations.

**Keywords:** Brazilian tree species, forest breeding, vegetative propagation.

## LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II		Pág.
<b>Figura 1 –</b>	Porcentagem média de estabelecimento <i>in vitro</i> de culturas iniciadas a partir de epicótilos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocininas, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	79
<b>Figura 2 –</b>	Número médio de gemas formadas em culturas iniciadas a partir de epicótilos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocinina, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	81
<b>Figura 3 –</b>	Número médio de ápices caulinares formados em culturas iniciadas a partir de epicótilos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocinina, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	84
<b>Figura 4 –</b>	Número médio de folhas formadas em culturas iniciadas a partir de epicótilos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocinina, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	85
<b>Figura 5 –</b>	Porcentagem média de calos formados em culturas iniciadas a partir de epicótilos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS, acrescido de diferentes concentrações de citocinina, independentemente da fonte (BAP, CIN, 2iP e TDZ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	87
CAPITULO III		
<b>Figura 1–</b>	Porcentagem média de estabelecimento de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) (A) e da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA) ou ausência de carvão ativado (SCA) (B), em ambas independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	101
<b>Figura 2–</b>	Porcentagem média de formação de calos em segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em função da interação entre as diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) e da presença (CCA) ou ausência de carvão ativado (SCA), independentemente do meio nutritivo (MS ou WPM) empregado. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	103
<b>Figura 3–</b>	Número médio de folhas formadas em segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) (A), e da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA)	

	ou ausência de carvão ativado (SCA) (B), em ambas independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	105
<b>Figura 4–</b>	Porcentagem média de sobrevivência de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias. As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB, nos meios nutritivos MS na presença (MS + CA) e ausência (MS – CA) de carvão ativado (CA) (A), e WPM na presença (WPM + CA) e ausência (WPM – CA) CA (B). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	106
<b>Figura 5–</b>	Porcentagem média de estabelecimento <i>in vitro</i> de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, e da presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado. As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB, independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	108
<b>Figura 6–</b>	Porcentagem média de formação de calos na base de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, nos meios nutritivos MS ou WPM, independentemente da presença ou ausência de carvão ativado (A), e da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado, independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM) (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	110
<b>Figura 7–</b>	Porcentagem média de formação de raiz primária em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, e os meios nutritivos MS na presença (MS + CA) ou ausência (MS – CA) de carvão ativado (A), e WPM na presença (WPM + CA) ou ausência (WPM – CA) de carvão ativado (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	112
<b>Figura 8 –</b>	Porcentagem média de formação de raiz secundária em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, e os meios nutritivos MS na presença (MS + CA) ou ausência (MS – CA) de	

	carvão ativado (A), e WPM na presença (WPM + CA) ou ausência (WPM – CA) de carvão ativado (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014 .....	114
<b>Figura 9–</b>	Aspectos de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob o efeito de: meio nutritivo MS sem Ácido Indolbutírico (AIB) e carvão ativado (CA) (A), meio MS com 3 µM de AIB (B), meio MS com 6 µM de AIB, (C), meio MS com 9 µM de AIB (D), meio WPM sem AIB e CA (E), meio WPM com 3 µM de AIB (F), e meio WPM com 6 µM de AIB (G). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	115
<b>Figura 10–</b>	Porcentagem média de oxidação fenólica na base dos explantes em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias. As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB, independentemente do meio nutritivo empregado (MS e WPM) e, simultaneamente, da presença ou ausência de carvão ativado. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	117
<b>Figura 11–</b>	Número médio de folhas formadas em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM) e da presença ou ausência de carvão ativado (A), e em função da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado (B), independentemente, também, do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	119
<b>Figura 12–</b>	Número médio de brotos em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias e os meios nutritivos MS na presença (MS + CA) ou ausência (MS – CA) de carvão ativado (A), e WPM na presença (WPM + CA) ou ausência (WPM – CA) de carvão ativado (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	121
<b>CAPITULO IV</b>		
<b>Figura 1–</b>	Porcentagem média de estabelecimento e sobrevivência <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	136

<b>Figura 2–</b>	Número médio de folhas e número médio de segmentos nodais formados a partir do cultivo de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	138
<b>Figura 3–</b>	Porcentagem média de formação de raízes primária e secundárias, em segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	139
<b>Figura 4–</b>	Porcentagem média de clorose e abscisão foliar em segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	140
<b>Figura 5–</b>	Altura média da parte aérea e comprimento médio das raízes produzidas em segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	141
<b>Figura 6–</b>	Massa fresca média e massa seca total média dos segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	142
<b>Figura 7–</b>	Médias de sobrevivência (A), estabelecimento (B), e número de folhas (C) de plantas de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no primeiro período de aclimatização <i>in vitro</i> (sete dias de cultivo em sala de crescimento a $25\pm 3$ °C, 16h de fotoperíodo e $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa) UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	144
<b>Figura 8–</b>	Médias de sobrevivência (A) e estabelecimento (B), e número de folhas (C) de plantas de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 1º período de aclimatização <i>ex vitro</i> (sete dias de cultivo em sala de crescimento a $25\pm 3$ °C, 16h de fotoperíodo e $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa), em copos plásticos com capacidade para 250 mL, cobertos com copo plástico de mesmo volume, independentemente do substrato em que foram cultivadas. Médias de altura de plantas (D) de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação, durante 45 dias, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 1º período de aclimatização <i>ex vitro</i> (sete dias de cultivo em sala de crescimento a $25\pm 3$ °C, 16h de fotoperíodo e $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa) em copos plásticos com capacidade para 250 mL, cobertos com copo plástico de mesmo volume, em função do substrato em que foram cultivadas. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	146

**Figura 9–** Médias de sobrevivência (A), número de folhas (C) e altura (D) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 2º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo em sala de crescimento (a 25±3°C, 16h de fotoperíodo e 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa) em copos plásticos com capacidade para 250 mL, em função do substrato em que foram cultivadas. Médias de estabelecimento (B) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação, durante 45 dias, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 2º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo em sala de crescimento (a 25±3°C, 16h de fotoperíodo e 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa) em copos plásticos com capacidade para 250 mL, independentemente do substrato em que foram cultivadas. UFSM, Santa Maria, RS. 2014 ..... 148

**Figura 10–** Porcentagens médias de sobrevivência e estabelecimento (A) e número médio de folhas (B) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 3º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo casa de vegetação climatizada, em copos plásticos com capacidade para 250 mL, cobertos com copo plástico de mesmo volume, independentemente do substrato em que foram cultivadas. Altura média das plantas (C) de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação, durante 45 dias, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 3º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo em casa de vegetação climatizada, em copos plásticos com capacidade para 250 mL, em função do substrato em que foram cultivadas. UFSM, Santa Maria, RS. 2014..... 151

**Figura 11–** Porcentagens médias de sobrevivência e estabelecimento (A), altura média (B) e número médio de folhas (C) em plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função das concentrações de sacarose do meio nutritivo WPM do cultivo inicial, de 45 dias, no 4º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 28 dias de cultivo em casa de vegetação não climatizada, em vasos de 1L preenchidos com 1L de substrato, independentemente do substrato. As plantas foram submetidas, previamente, a 7 dias de aclimatização *in vitro* seguida de 21 dias de aclimatização *ex vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014..... 152

## CAPITULO V

**Figura 1–** Porcentagem média de sobrevivência de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose e manitol acrescidos ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½ MS). UFSM, Santa Maria, RS. 2014..... 165

<b>Figura 2–</b>	Porcentagem média de estabelecimento <i>in vitro</i> de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de sacarose e manitol acrescidos ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	168
<b>Figura 3–</b>	Porcentagem média de oxidação fenólica em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose acrescidas ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS) (A); e após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose e manitol (B) acrescidas ao meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	170
<b>Figura 4–</b>	Porcentagem média de formação <i>in vitro</i> de raízes em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS) (A); e ao longo de 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose e manitol em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS (B). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	172
<b>Figura 5–</b>	Porcentagem média de clorose foliar em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> , independentemente das concentrações de sacarose e manitol, acrescidos ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS) (A); e porcentagem média de clorose foliar aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS suplementado com diferentes concentrações de manitol, independentemente das concentrações de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	174
<b>Figura 6–</b>	Superfície de resposta para número médio de folhas em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> , na presença de diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), e independentemente da ausência ou presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	175
<b>Figura 7–</b>	Superfície de resposta para número médio de brotos em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), e independentemente da ausência ou presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	177
<b>Figura 8–</b>	Superfície de resposta para porcentagem média de abscisão foliar em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo <i>in</i>	

*in vitro* na presença de diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cuja concentração e sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$  MS), e independentemente da ausência ou da presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014..... 179

**Figura 9–** Crescimento médio em altura (A) e comprimento médio da raiz principal (B) em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cujos sais foram reduzidos à metade da concentração ( $\frac{1}{2}$  MS), independentemente da ausência ou presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014..... 180

## CAPITULO VI

**Figura 1–** Quantificação por eletroforese em gel de agarose (a 1%) de amostras das soluções de DNA isoladas de folhas jovens de oito indivíduos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., a partir dos protocolos de Doyle e Doyle (1987) modificado (DDM), Ferreira e Grattapaglia (1998) modificado (FGM) e Saghai-Marooof et al. (1984) modificado (SMM). 25; 50; 75 e 100 referem-se à quantidade de DNA do fago Lambda, em ng, utilizada para a estimacão da concentraçao de DNA em cada soluçao avaliada. UFSM, Santa Maria, RS. 2014..... 200

**Figura 2–** Perfil da digestão com a enzima de restrição *Hind* III, após eletroforese em gel de agarose a 1%, das soluçoes de DNA genômico isoladas a partir de folhas jovens de oito indivíduos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., por meio do emprego dos protocolos de Doyle e Doyle (1987) modificado (DDM), Ferreira e Grattapaglia (1998) modificado (FGM) e Saghai-Marooof et al. (1984) modificado (SMM). M = marcador de peso molecular, à direita 1 kb, à esquerda, 100 pb. C= controle positivo (DNA do fago Lambda 50 ng). UFSM, Santa Maria, RS. 2014..... 201

## LISTA DE TABELAS

CAPITULO I	Pág.
<b>Tabela 1–</b> Localização das árvores matrizes em que foram coletadas as sementes de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc., avaliadas no presente estudo, em municípios do Noroeste do RS. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	50
<b>Tabela 2–</b> Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes coletadas em matrizes de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), avaliadas no teste de sanidade pelo método do 'blotter test', em função da interação entre os dois períodos de armazenamento e as árvores matrizes. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	55
<b>Tabela 3–</b> Médias de porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de sementes mortas e porcentagem de sementes duras em sementes de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em oito matrizes, em dois períodos de armazenamento em sacos de papel Kraft, a temperatura de 8-10 °C, em refrigerador. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	62
<b>Tabela 4–</b> Médias de comprimento de plântulas (mm) e porcentagem de sementes germinadas na primeira contagem, em sementes de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em oito matrizes, independentemente do período de avaliação (recém colhidas ou após seis meses de armazenamento em sacos de papel Kraft, a temperatura de 8-10 °C, em refrigerador). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....	65
<b>CAPITULO III</b>	
<b>Tabela 1–</b> Porcentagem média de estabelecimento de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre os meios nutritivos MS ou WPM, na presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado. Os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento "pulse" por 15 dias, com diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB. Santa Maria, RS. 2014.....	109
<b>Tabela 2–</b> Porcentagem média de oxidação fenólica na base de explantes em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) provenientes de tratamento "pulse" com diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) por 15 dias, após 30 dias adicionais de cultivo <i>in vitro</i> , na ausência de AIB, em função da interação entre os meios nutritivos MS ou WPM, na presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado. Santa Maria, RS. 2014.....	118

## CAPITULO V

**Tabela 1–** Crescimento médio em altura e comprimento médio da raiz principal em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose acrescidas ao meio nutritivo MS cujos sais foram reduzidos à metade da concentração ( $\frac{1}{2}$  MS), independentemente da ausência ou presença de manitol. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
2ip	2-Isopenteniladenina
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenoacético
BAP	6-Benzilaminopurina
CA	Carvão ativado
CIN	Cinetina
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CV	Coeficiente de variação
DAP	Diâmetro a altura do peito
DDC	Dias de cultivo
DDM	Doyle y Doyle Modificado
FGM	Ferreira e Grattapaglia Modificado
IV	Índice de Variação
MET	Máxima eficiência técnica
MS	Murashige e Skoog
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SGM	Saghai-Marroof Modificado
TDZ	Thidiazuron
WPM	<i>Woody Plant Medium</i>

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
2.1 A espécie estudada: <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.....	23
2.2 Sementes florestais nativas .....	25
2.3 Cultura de tecidos e micropropagação .....	28
2.4 Conservação de germoplasma .....	32
2.5 Isolamento de DNA genômico .....	33
2.6 Referências bibliográficas .....	37
<b>3 CAPITULO I – SEMENTES DE <i>Luehea divaricata</i> Mart. &amp; Zucc. DE DIFERENTES MATRIZES: QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA.....</b>	<b>45</b>
3.1 Resumo .....	45
3.2 Abstract .....	46
3.3 Introdução .....	47
3.4 Material e métodos .....	50
3.5 Resultados e discussão .....	55
3.6 Conclusões .....	67
3.7 Referências bibliográficas .....	68
<b>4 CAPÍTULO II – O EFEITO DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CITOCININA NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Luehea divaricata</i> Mart. &amp; Zucc. ....</b>	<b>73</b>
4.1 Resumo .....	73
4.2 Abstract .....	74
4.3 Introdução .....	75
4.4 Material e métodos .....	77
4.5 Resultados e discussão .....	79
4.6 Conclusões .....	89
4.7 Referências bibliográficas .....	90
<b>5 CAPÍTULO III – EFEITO DE AIB, CARVÃO ATIVADO E MEIOS NUTRITIVOS NO ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE CULTURAS INICIADAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Luehea divaricata</i> Mart. &amp; Zucc. ....</b>	<b>95</b>
5.1 Resumo .....	95
5.2 Abstract .....	96
5.3 Introdução .....	97

5.4	Material e métodos .....	99
5.5	Resultados e discussão .....	101
5.6	Conclusões .....	123
5.7	Referências bibliográficas .....	124
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO IV – CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E TIPOS DE SUBSTRATO NA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE <i>Luehea divaricata</i> Mart. &amp; Zucc. ....</b>	<b>128</b>
6.1	Resumo .....	128
6.2	Abstract .....	129
6.3	Introdução .....	130
6.4	Material e métodos .....	132
6.5	Resultados e discussão .....	136
6.6	Conclusões .....	155
6.7	Referências bibliográficas .....	156
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO V – CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Luehea divaricata</i> Mart. &amp; Zucc. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANITOL E SACAROSE ...</b>	<b>159</b>
7.1	Resumo .....	159
7.2	Abstract .....	160
7.3	Introdução .....	161
7.4	Material e métodos .....	163
7.5	Resultados e discussão .....	165
7.6	Conclusões .....	183
7.7	Referências bibliográficas .....	184
<b>8</b>	<b>CAPÍTULO VI – ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICIÊNCIA, EM ANÁLISES MOLECULARES, DE SOLUÇÕES DE DNA GENÔMICO DE <i>Luehea divaricata</i> Mart. &amp; Zucc. ISOLADAS POR DIFERENTES PROTOCOLOS .....</b>	<b>187</b>
8.1	Resumo .....	187
8.2	Abstract .....	188
8.3	Introdução .....	189
8.4	Material e métodos .....	192
8.5	Resultados e discussão .....	198
8.6	Conclusões .....	204
8.7	Referências bibliográficas .....	205
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>207</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é considerada como um dos 25 *hotspots* de biodiversidade identificadas no mundo, constituída por áreas que perderam grande parte de sua cobertura vegetal original (HIROTA, 2003; GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005), juntamente com o Bioma Pampa, que ocupa, por sua vez, 2,07% do território nacional, também altamente degradado pela ação antrópica, são dois importantes ecossistemas presentes no Rio Grande do Sul, sendo que o segundo abrange 63% da superfície do Estado (ROESCH et al., 2009). Esse conjunto de ecossistemas estão constituídos por espécies florestais que se destacam, amplamente, pela sua importância económica e ambiental, e que podem constituir-se em importantes fontes de variabilidade genética, promovendo pesquisas direcionadas à manutenção e recuperação das áreas depredadas.

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc., é uma espécie nativa do Brasil, presente nos Biomas Mata Atlântica e Pampa (CARVALHO, 2008; ROESCH et al., 2009), pertence à família Malvaceae (SOBRAL et al., 2006) e, é conhecida comumente como açoita-cavalo no Rio Grande do Sul, onde teve uma importante participação na história do desenvolvimento do setor madeireiro, levando a uma exploração descontrolada das populações naturais da espécie, com a consequente diminuição de exemplares com características fenotípicas desejáveis (FARIAS, 2006). Por se tratar de uma planta pioneira e de rápido crescimento, é comum sua utilização nos reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente. Seu florescimento ocorre durante os meses de dezembro a fevereiro e a maturação dos frutos, durante os meses de maio a agosto. A madeira é indicada para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, coronhas de armas, caixotaria, cadeiras, salto de calçados, e também para a construção civil, como ripas, molduras e rodapés (LORENZI, 2008).

Considerando a crescente necessidade de recuperação e restauração de áreas degradadas, a demanda por sementes e mudas de espécies florestais nativas pode registrar consideráveis aumentos, e a contribuição de trabalhos de pesquisas com espécies nativas será de grande importância para o setor florestal e ambiental. Em relação ao açoita-cavalo, estudos realizados analisando a recuperação de áreas de mata ciliar (AVILA et al., 2011) e mecanismos de regeneração natural desta

espécie, em remanescentes de floresta (SCCOTI et al., 2011; CHAMI et al., 2011), apontaram que, apesar de se encontrar presente no banco de sementes do solo e no banco de plântulas, o estabelecimento de uma regeneração natural nem sempre tem sido bem sucedido.

A cultura de tecidos, por meio da técnica de micropropagação, pode ser uma importante alternativa para a propagação de espécies que apresentam algumas dificuldades de multiplicação pelo método convencional, via sementes. Nesse sentido, a cultura de tecidos apresenta uma série de vantagens, entre as quais se destacam a possibilidade de multiplicação em grande escala, em um pequeno espaço físico disponível, a partir de uma quantidade mínima de tecido vegetal, além de não depender diretamente de fatores climáticos, tudo isso em um ambiente asséptico, garantindo a qualidade sanitária das plantas micropropagadas (TEIXEIRA; TORRES, 1998). Em função disso, inúmeros trabalhos com espécies florestais vêm sendo desenvolvidos, com o intuito de tornar essa tecnologia acessível e economicamente viável (XAVIER et al., 2009). Assim, a investigação dessas práticas têm ganhado espaço, principalmente no que se refere à sua aplicabilidade em espécies nativas.

Outra utilidade da cultura de tecidos, como alternativa a técnicas convencionais, é a conservação *in vitro* de germoplasma selecionado, à qual pode-se recorrer visando à manutenção de indivíduos de importância econômica e ambiental, garantindo, dessa maneira, a sua disponibilidade para programas de recuperação de áreas e/ou programas de melhoramento. Entre as inúmeras técnicas disponíveis para a conservação *in vitro* de plantas, destacam-se aquelas relacionadas ao crescimento mínimo, que pode ser obtido mediante a utilização de reguladores osmóticos, os quais atuam reduzindo o metabolismo das plantas, pelas modificações que causam às condições químicas do meio nutritivo (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

Aspectos relacionados a estudos da variabilidade genética de populações naturais podem estar estreitamente vinculados com o emprego de técnicas de cultura de tecidos vegetais. Nesse sentido, podem ser conduzidos trabalhos para caracterizar e selecionar indivíduos com alta diversidade genética regional, para a produção de mudas de espécies nativas, que poderão garantir o sucesso de projetos ambientais de recuperação de áreas degradadas, assim como a adoção de métodos de favorecimento do potencial de autorecuperação local como alternativa para a

conservação do material genético regional (BRANCALION et al., 2009). Em relação a isso, o uso de marcadores moleculares, para selecionar indivíduos geneticamente superiores e caracterizar a distribuição da variabilidade genética, entre e dentro das populações remanescentes podem ser aplicados em açoita-cavalo. Estudos procurando elucidar essas informações, em florestas de outras regiões do Brasil, já foram desenvolvidos para a espécie em questão (RUAS et al., 2009; CONSON et al., 2013). Porém, esses mesmos estudos devem ser ainda realizados em regiões onde o açoita-cavalo, já participou no processo de desenvolvimento econômico, com a conseqüente redução das suas populações, dessa maneira podendo garantir a sua permanência nos ecossistemas de que faz parte e desempenha importantes funções ambientais.

O presente trabalho está estruturado em seis capítulos, seguindo o formato de artigos, os quais estão divididos de acordo com os experimentos apresentados, a seguir:

- No capítulo I, foram avaliadas a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoita-cavalo coletadas em diferentes árvores matrizes localizadas no Noroeste do Rio Grande do Sul.
- No capítulo II, foi testado o efeito de fontes de citocininas, em diferentes concentrações, sobre a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo isolados de plantas germinadas *in vitro*.
- No capítulo III, foi estudado o efeito do tratamento “pulse” com Ácido Indolbutírico (AIB) sobre o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo cultivados em meios nutritivos WPM ou MS, na presença ou ausência de carvão ativado.
- No capítulo IV, foi analisada a capacidade de explantes multiplicados *in vitro* na aclimatização *ex vitro*, quando cultivados em meio nutritivo acrescido de diferentes concentrações de sacarose e tipos de substrato comercial.
- No capítulo V, foi verificada a capacidade de segmentos nodais de açoita-cavalo ser mantidos sob crescimento mínimo, visando sua conservação *in vitro*, com a utilização de diferentes concentrações de sacarose e manitol no meio nutritivo MS reduzido à metade da concentração dos sais ( $\frac{1}{2}$  MS).

- No capítulo VI, foi avaliada a eficiência de diferentes protocolos de isolamento de DNA genômico a partir de folhas jovens de açoita-cavalo, e comprovada sua funcionalidade na digestão com a enzima de restrição *Hind* III

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A espécie estudada: *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini é uma espécie florestal, integrante da família Malvaceae (APGII, 2003), conhecida popularmente como açoita-cavalo, caiboti, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, pau-de-canga. A espécie ocorre, naturalmente, desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul na mata semidecídua. É uma planta heliófita, seletiva higrófito, característica das florestas aluviais, que apresenta dispersão irregular e descontínua, sendo, particularmente, frequente ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a floresta é mais aberta, e nas formações secundárias (LORENZI, 2008; SOBRAL et al., 2006). Ocorre, preferencialmente, em terrenos com textura arenosa e bem drenados, entretanto, em plantios, tem crescido melhor em solos de fertilidade química alta e de textura franca-argilosa (CARVALHO, 2008). É uma planta pioneira de rápido crescimento que não pode faltar nos reflorestamentos mistos de áreas destinadas à preservação (LORENZI, 2008).

A espécie pode atingir de 5 a 25m de altura e um diâmetro de 50 a 60cm à altura do peito, com tronco geralmente tortuoso e nodoso de base alargada; fuste comumente curto, mede até 5m de comprimento. No interior da floresta densa desenvolve troncos quase retos e bastante altos. A ramificação é cimosa ou dicotômica, os ramos são laxos, revestidos com córtex escurecido, lenticelados e glabros, quando adultos, e com pêlos estrelados e cor-de-canela, no ápice dos ramos jovens (CARVALHO, 2008). Apresenta madeira moderadamente pesada, de cor clara, de boa trabalhabilidade e de acabamento delicado. A madeira é indicada para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, coronhas de armas, caixotaria, cadeiras, salto de calçados, e também para a construção civil, como ripas, molduras e rodapés (LORENZI, 2008).

Seu florescimento ocorre de dezembro a fevereiro, as flores hermafroditas são róseas e amarelas, dispostas em inflorescências multifloras terminais. Os frutos são cápsulas deiscentes, lenhosas, pubescente, com sementes aladas,

disseminadas pelo vento. Cada fruto possui de cinco a 15 sementes, e devem ser coletados quando mudam a coloração de verde para marrom-escuro, antes da deiscência ou quando esta se inicia; após a coleta, os frutos devem ser expostos ao sol para que a deiscência seja completada. Apresenta germinação moderada, variável entre 20 e 75%, a viabilidade das sementes é muito irregular, não há necessidade de tratamento pré-germinativo para a espécie. Possui, aproximadamente, 263 mil sementes por quilograma e a viabilidade das sementes é muito variável, geralmente não superior a 60 dias decorridos da colheita (LORENZI, 2008; CARVALHO, 2008), portanto, podendo ser considerada ortodoxa pela maioria dos autores.

As folhas de açoita-cavalo são simples, alternas, dísticas, com estípulas, irregularmente serradas, com três nervuras longitudinais típicas, discolores, ásperas na face ventral e tomentosas na face dorsal, com lâmina foliar medindo de 4,5 a 15cm de comprimento e 2 a 6,5cm de largura; pecíolo ferruginoso, com até 1cm de comprimento (CARVALHO, 2008).

Estudos relacionados à propagação vegetativa de açoita-cavalo, podem ser verificados na literatura, a título de exemplo, podem ser mencionados experimentos procurando determinar a concentração mais adequada de Ácido Indolbutírico (AIB) (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg L<sup>-1</sup>) para a produção de mudas via estaquia de *Luehea divaricata*, sendo que nenhuma das concentrações estudadas foi tecnicamente viável para a produção de mudas por estaquia (NAZÁRIO et al., 2007). Seguindo a mesma linha, Pacheco; Franco (2008), também testaram o efeito de AIB (0 a 5000 mg L<sup>-1</sup>) sobre estacas lenhosas de açoita-cavalo, no qual conseguiram enraizar apenas 30% das estacas com o emprego da concentração mais elevada de AIB, 90 dias após a instalação do experimento.

No que se refere ao emprego da cultura de tecidos para propagação desta espécie nativa, explantes tipo segmentos nodais ou segmentos apicais se mostraram promissores no estabelecimento *in vitro*, além de dispensar o uso do regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP) para multiplicar os explantes avaliados (FLÔRES et al., 2011a). Este último resultado, obtido mediante o emprego de uma das técnicas de cultura de tecidos, aponta que sua utilização na propagação *in vitro* é promissora.

Resultados de outros trabalhos reforçam a opção de aplicar a propagação vegetativa, por meio da cultura de tecidos, em açoita-cavalo na obtenção de mudas

com alta qualidade fisiológica e sanitária, garantindo-se a manutenção da variabilidade genética natural da espécie em eventuais projetos ambientais ou produtivos. Para ilustrar, resultados de estudos de recuperação de áreas de mata ciliar (AVILA et al., 2011) e de mecanismos de regeneração natural em remanescentes de floresta (SCCOTI et al., 2011; CHAMI et al., 2011), revelaram que, apesar de o açoita-cavalo estar presente no banco de sementes do solo e ser encontrado no banco de plântulas (indivíduos com DAP igual a 1cm e altura de 20 até >100cm), o estabelecimento de uma regeneração natural da espécie não foi assegurado. Em consequência disso, a disponibilidade natural de sementes, dotadas de adequada qualidade fisiológica e sanitária, tem se tornado um dos principais limitantes na produção de mudas de açoita-cavalo em viveiros.

Igualmente, estudos relacionados à estrutura genética de populações e ao desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que possibilitem, facilitem ou acelerem outros estudos vêm sendo desenvolvidos com a espécie. Como exemplo pode ser citado o trabalho realizado por Ruas et al. (2009), utilizando amostras de folhas coletadas de florestas ripárias do Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina - PR, que desenvolveu 10 pares de iniciadores microssatélites. Em outro trabalho, desta vez estudando a estrutura genética de populações de açoita-cavalo, por meio de marcadores microssatélites, em nove remanescentes florestais localizados no Centro-Oeste do Paraná e no município de Lages, SC, foi observado que, em sete, das nove populações estudadas, ocorreram perdas de diversidade genética, as quais podem comprometer, seriamente, a viabilidade das populações estudadas nas próximas gerações. Os autores recomendaram que é necessário a elaboração de estratégias de conservação para a espécie (CONSON et al., 2013).

## **2.2 Sementes florestais nativas**

Qualquer programa de produção de mudas, seja voltado para plantios comerciais, restauração de áreas degradadas ou conservação de recursos genéticos, deve estar sustentado em uma produção de sementes de alta qualidade. O planejamento técnico das diferentes etapas visando obter sementes de boa qualidade e quantidade suficiente, torna-se necessário para evitar perda de recursos econômicos, e garantir o sucesso da atividade (NOGUEIRA; MEDEIROS, 2007a).

Durante o planejamento de coleta de sementes florestais nativas, um dos aspectos mais importantes é a definição das áreas a serem visitadas, assim como a metodologia correta a ser empregada na coleta. Uma vez identificadas as árvores matrizes, é aconselhável conduzir atividades para manejar essas árvores de maneira a garantir coletas futuras. Porém, essas atividades envolvem um conjunto de problemas, entre os quais se destaca o tamanho das populações e a sua distribuição geográfica. Em consequência, a estratégia de coleta a ser adotada deve ser específica para cada situação, dependendo da metodologia de amostragem das populações, dos fatores climáticos, ecológicos e logísticos (SILVA; HIGA, 2006; MEDEIROS; NOGUEIRA, 2006).

Para as espécies florestais nativas, geralmente, são coletados os frutos, a partir dos quais se extraem as sementes. Nesse sentido, uma vez extraídas, as sementes podem conter impurezas, as quais podem ser separadas durante o processo de beneficiamento, melhorando, dessa maneira, sua qualidade. Durante essa etapa, é importante tomar cuidados para não danificar as sementes e, assim, garantir sua viabilidade (NOGUEIRA; MEDEIROS, 2007b).

Diferente da maioria das grandes culturas agrícolas, as sementes de espécies florestais nativas apresentam grande variabilidade genética, resultando em ampla variação nas características morfofisiológicas. Além disso, pelo fato dessas espécies estarem distribuídas em uma grande extensão geográfica encontram-se fortemente sujeitas às variações edafoclimáticas, em escalas espacial e temporal. Somam-se a isso outros fatores relacionados à polinização, ao manejo de coleta e pós-coleta de sementes, capazes de influenciar, diretamente, a qualidade fisiológica. Esses fatores exigem cautela no estabelecimento de um padrão que seja característico para determinada espécie, especialmente no que tange às sementes e a seu comportamento germinativo (SARMENTO; VILLELA, 2010).

Considerando-se, portanto, que a produção de mudas florestais de boa qualidade depende, diretamente, do conhecimento da qualidade das sementes, é fundamental que as sementes sejam submetidas a uma avaliação de suas qualidades após a coleta e beneficiamento, para que se tenha conhecimento do potencial de desenvolvimento das mudas (SCHUMACHER et al., 2002). Existem diversos testes que podem ser utilizados para analisar a qualidade de sementes, os quais são baseados em técnicas padronizadas pelas Regras para Análise de

Sementes – RAS (BRASIL, 2009) e pelas Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (BRASIL, 2013).

Um dos testes básicos que é realizado nas sementes florestais é de sanidade, por meio do qual, muitas vezes podem ser explicadas as causas de uma baixa germinação e vigor em condições de laboratório e de campo. Para análise sanitária de sementes, o método do papel filtro ou “blotter-test” é o método de incubação, mais utilizado (CARNEIRO, 1987). Igualmente, os micro-organismos patogênicos associados às sementes podem influenciar a longevidade e viabilidade das futuras mudas, e essa associação é estabelecida durante o desenvolvimento vegetativo ou o processo reprodutivo. O transporte de patógenos e a transmissão de doenças pelas sementes são observados em, praticamente, todas as espécies que se reproduzem sexuadamente, e vários desses patógenos são prejudiciais à germinação (SANTOS et al., 2011b).

A qualidade fisiológica das sementes reúne atributos que demonstram sua capacidade de desempenhar funções vitais, tais como: viabilidade, teor de umidade, vigor, tamanho e longevidade. O teste de germinação é uma das principais maneiras de se obter dados referentes à qualidade fisiológica de sementes e fornece uma base para a comparação entre períodos de armazenamento de sementes. O teste de germinação permite a obtenção de informações que determinam o valor das sementes para a semeadura e, igualmente, possibilita a comparação do mesmo lote em diferentes períodos, ou a comparação entre diferentes lotes (MARCOS FILHO, 2005). A necessidade da realização do teste de germinação é decorrente do fato de que ocorrem perdas na capacidade germinativa das sementes, quando são conservadas por determinados períodos e/ou condições de armazenamento (OLIVEIRA et al., 2006).

O substrato utilizado nos testes de germinação tem grande influência no processo germinativo, pois fatores como aeração, estrutura, capacidade de retenção de água, entre outros, podem variar de um substrato para outro, favorecendo ou prejudicando a germinação de sementes, assim como podem favorecer a incidência de fungos, levando à redução da expressão do vigor, provocando decréscimos na germinação (SCALON et al., 1993). Os substratos mais utilizados são papel toalha, papel mata-borrão, areia e vermiculita (BRASIL, 2009). Sua escolha deve considerar características intrínsecas das sementes, como o tamanho e a necessidade de água e luz.

O armazenamento das sementes deve ser iniciado na maturidade fisiológica, e o maior desafio é conseguir que as sementes, após um certo período, ainda apresentem elevada qualidade fisiológica. Assim, o objetivo é manter a qualidade das sementes durante o período em que ficam armazenadas, visto que melhorar a qualidade não é possível, mesmo em condições ideais (VILLELA; PERES, 2004).

Da mesma maneira, as condições de armazenamento a que as sementes são submetidas são de extrema importância para garantir sua viabilidade e longevidade, e tem como objetivo conservar as sementes, preservando suas qualidades físicas, fisiológicas e sanitárias, possibilitando o desenvolvimento de plantas saudáveis após as sementes germinarem. Dentre os fatores que influenciam o comportamento das sementes durante o armazenamento, podem-se citar: a umidade relativa do ar, a temperatura, a maturação das sementes no momento de sua coleta, os danos mecânicos e a presença de fungos, bactérias e insetos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Quanto ao comportamento em relação ao armazenamento, as sementes podem ser classificadas em recalcitrantes e ortodoxas. As sementes recalcitrantes não podem ser secas abaixo de determinado teor de água sem que ocorram danos fisiológicos, enquanto as sementes ortodoxas podem ser secas até baixos teores de água (5 a 7%) e armazenadas em ambientes com baixas temperaturas (VILLELA; PERES, 2004).

Existe, ainda, uma terceira classe de sementes que apresentam um comportamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante, sendo denominadas intermediárias: toleram secagem considerável (pelo menos até 30% de umidade relativa), mas não completa. A longevidade das sementes aumenta progressivamente à medida que a umidade relativa de armazenamento é reduzida, até atingir em torno de 50%, a partir da qual se observa uma tendência inversa, à medida que a umidade relativa reduz (ELLIS et al., 1990).

### **2.3 Cultura de tecidos e micropropagação**

A cultura de tecidos vegetais consiste na propagação, regeneração e manutenção a partir de determinadas partes da planta, denominadas explantes, em condições de assepsia e ambiente controlados. O princípio fundamental da cultura

de tecidos é a totipotência celular, que é a capacidade de uma célula se dividir e formar todas as células diferenciadas no organismo (TERMIGNONI, 2005; BARRUETO CID, 2010). Uma das técnicas de cultura de tecidos, muito utilizada em programas de melhoramento florestal, é a micropropagação, permitindo a manutenção e a multiplicação rápida de mudas, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, possibilitando a obtenção de clones mais produtivos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*; que comparada a outras técnicas, têm sido considerada aquela que mais se difundiu, com aplicações comprovadas em diversas espécies de plantas (XAVIER et al., 2009). Essa técnica é uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldade de reprodução natural, baixo poder germinativo e, também, para casos em que os métodos convencionais de propagação vegetativa não são viáveis (SERAFINI et al., 2001). *Luehea divaricata*, espécie em estudo no presente trabalho, é inserida no contexto anteriormente descrito, justificando a utilização desta técnica para a obtenção de mudas.

A micropropagação pode ser uma alternativa econômica adequada em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, além de proporcionar a propagação de indivíduos selecionados, possibilita a limpeza clonal, obtendo-se plantas livres de vírus por meio do cultivo de ápices caulinares e meristemas, e superando eventuais problemas de contaminação patogênica (WENDLING et al., 2006). No mesmo sentido, essa técnica permite obter altas taxas de multiplicação, acelerando programas de propagação clonal, possibilitando a multiplicação vegetativa de genótipos de alto valor comercial e de difícil enraizamento (TEIXEIRA, 2001).

A produção *in vitro* de plantas pode ocorrer por organogênese direta ou indireta, na primeira, tem-se a formação de órgãos diretamente, sem a passagem por fases intermediárias; enquanto que, na segunda, passa-se obrigatoriamente pela fase de calo (THORPE et al., 1991). A micropropagação pode ocorrer por meio de ambas as rotas, sendo preferível a via direta, de maneira a evitar a ocorrência de variações somaclonais.

A micropropagação consiste em um sistema de produção vegetal que está dividido em fases, a saber: I- seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura nas condições *in vitro*; II- multiplicação dos propágulos mediante

sucessivos subcultivos em meio de cultura adequado à propagação; III- enraizamento dos propágulos vegetativos obtidos no estágio anterior; e IV- aclimatização das plantas obtidas *in vitro* na condição *ex vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Em função da espécie e, igualmente, dos objetivos a serem alcançados, algumas dessas fases podem ser mais prolongadas e/ou, uma fase pode ser adicionada, bem como outras serem desnecessárias (ALFENAS et al., 2009; XAVIER et al., 2007; 2009).

Na fase de multiplicação *in vitro*, em particular, um dos principais objetivos é a proliferação dos explantes, mantendo-se sua estabilidade genética. Para alcançar o sucesso nessa fase, os explantes oriundos da fase de estabelecimento são inoculados em meio nutritivo contendo combinações de auxinas e citocininas, dependendo da espécie e do tipo de explante (TORRES et al., 2001; DUTRA et al., 2009).

As auxinas estão envolvidas na divisão e alongamento celular e na síntese da parede celular. As principais auxinas utilizadas na cultura de tecidos são: Ácido Naftalenoacético (ANA), Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido Indolbutírico (AIB) e, o principal composto natural, Ácido Indolacético (AIA). Em relação às citocininas, uma de suas principais funções na cultura de tecidos é a indução de gemas adventícias, bem como a proliferação de gemas axilares pela supressão da dominância apical, e, também, a formação de calos e outros processos envolvendo a divisão celular. Entre as citocininas comumente utilizadas estão: 6-Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN), Thidiazuron (TDZ), Isopenteniladenina (2-iP) e Zeatina (ZEA), sendo as duas últimas naturais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; BARRUETO CID, 2005; XAVIER et al., 2009).

Pelas observações realizadas nos parágrafos anteriores, o processo de propagação com o uso de técnicas de cultura de tecidos pode propiciar uma série de vantagens, dentre as quais se destacam a manutenção do genótipo e a obtenção de mudas com alta qualidade sanitária. Entretanto, para o êxito dos procedimentos, ainda devem ser superados alguns problemas relacionados ao processo de propagação do material selecionado, em especial àqueles relacionados ao enraizamento *in vitro*, uma fase fundamental, (MILLÁN-OROZCO, 2011) para garantir mudas de boa qualidade e diminuir as perdas na fase de aclimatização (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

O enraizamento *in vitro* caracteriza-se pela indução de raízes adventícias em brotações alongadas a partir de gemas na fase de multiplicação/alongamento, visando à obtenção de plantas completas para posterior transplante e aclimatização às condições *ex vitro*. Em geral, a composição do meio nutritivo, o tipo e concentrações de auxina são as variáveis que mais influenciam o enraizamento, sendo as respostas dependentes do genótipo. Geralmente, ao meio nutritivo para enraizamento, é adicionada a auxina AIB (DUTRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). A permanência dos explantes nos meios nutritivos destinados ao enraizamento, geralmente, deve ser entre sete a 15 dias para espécies de rápido crescimento. Outra fase da micropropagação que deve merecer atenção especial é a aclimatização, considerada indispensável para a obtenção de uma microplanta completa (WENDLING et al., 2006). Como a aclimatização é a última etapa do processo de micropropagação, nela se procura reduzir o estresse causado pela diferença entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*. Entretanto, essa fase é caracterizada, em geral, por grandes perdas de material micropropagado, em decorrência da mudança de ambiente em que as plantas se desenvolvem. A aclimatização deve ser realizada em ambiente sombreado, onde as plantas permanecem por um período variável de 15-30 dias e, posteriormente, são conduzidas para área de pleno sol, onde devem ocorrer a rustificação e o crescimento, sendo importante que esse processo seja realizado gradativa e cuidadosamente (DUTRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Trabalhos visando ao estabelecimento *in vitro* ou à micropropagação em espécies lenhosas nativas, seja por organogênese direta, ou indireta, e, inclusive, ensaios visando ao enraizamento *in vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas, vêm sendo realizados com frequência na última década, dado o número de trabalhos que foram registrados na literatura. Para ilustrar, podem ser citados àqueles relacionados às seguintes espécies: *Peltophorum dubium* (BASSAN et al., 2006; FLÔRES et al., 2011b; CURTI; REINIGER, 2014), *Cabralea canjerana* (ROCHA, et al., 2007), *Eugenia uniflora* (SOUZA et al., 2008), *Genipa americana* (ROCHA et al., 2008), *Cedrela odorata* (MILÁN-OROZCO et al., 2011), *Luehea divaricata* (FLÔRES et al., 2011a), *Mimosa scabrella* (ROSA et al., 2012), *Amburana acreana* (FERMINO JUNIOR et al., 2012), *Eugenia involucrata* (GOLLE et al., 2012), entre várias outras espécies cujos trabalhos se encontram em estado mais incipiente.

## 2.4 Conservação de germoplasma

A conservação de recursos genéticos pode ocorrer por meio da manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*. Nesse último caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais, soluções de DNA, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado, podendo ser: no campo ou em casas de vegetação, em câmaras frias e secas, em meio nutritivo com baixa concentração de sais (conservação *in vitro*) ou, ainda, criopreservados (VIEIRA, 2000; SARMENTO; VILLELA, 2010).

A conservação de germoplasma é uma das tarefas mais importantes dentro dos programas de melhoramento. O germoplasma conservado serve como um reservatório de genes, os quais os melhoristas podem acessar quando precisam resolver problemas específicos. O local onde o germoplasma é conservado é chamado Banco de Germoplasma, dentre os quais se encontram os Bancos *in vitro* que são coleções de germoplasma mantidas em laboratório em condições que reduzam o crescimento das amostras. A conservação é feita através de meristemas ou outros tecidos das plantas (BESPALHOK et al., 2012).

A conservação *in vitro* compreende a manutenção de amostras de germoplasma vegetal utilizando-se técnicas de cultura de tecidos, em condições controladas de temperatura, fotoperíodo e em meio nutritivo que favoreça o crescimento lento do material (MATSUMOTO et al., 2010). Nesse sentido, em decorrência da intensa atividade extrativista sobre espécies florestais nativas, tem sido cada vez mais importante a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais à conservação de germoplasma, permitindo que o material vegetal de uma determinada espécie esteja disponível para sua utilização futura. Com isso, as coleções de germoplasma passaram a ter papel fundamental para conservação de espécies ameaçadas de extinção (GUERRA; POMPELLI, 2011).

Na conservação *in vitro* de germoplasma vários fatores podem ser controlados e/ou modificados, sendo uma das vantagens, por exemplo, que os meios nutritivos utilizados são os mesmos da micropropagação, podendo-se introduzir algumas alterações na sua composição de maneira a promover redução no crescimento do material vegetal e, assim, aumentar o intervalo entre subcultivos. Essas alterações compreendem, geralmente, a redução na concentração de sais,

vitaminas e fonte de energia, podendo ser adicionados compostos que apresentam efeito redutor sobre o crescimento, como é o caso do sorbitol e do manitol (MATSUMOTO et al., 2010; SANTOS et al., 2011a). As condições ambientais, igualmente, podem ser modificadas com a finalidade de reduzir o crescimento dos explantes, sendo, geralmente, modificada a temperatura, para cerca de 20 °C para espécies tropicais, e, entre 10 a 15 °C, para espécies de clima temperado e subtropical (SOUZA et al., 2009; MATSUMOTO et al., 2010).

O crescimento mínimo tem sido utilizado com sucesso, principalmente, para a conservação de ápices caulinares de muitas espécies e consiste em reduzir, drasticamente, o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade. Esta diminuição na atividade metabólica pode ocorrer pela redução na intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardadores de crescimento ao meio nutritivo ou redução da concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

Vários tecidos e órgãos podem ser empregados, porém, na maioria dos protocolos, têm sido empregados ápices caulinares. Há menor probabilidade de ocorrência de alterações genéticas, uma vez que essas regiões são, em geral, livres de patógenos e, na maioria das vezes, são os melhores explantes para a micropropagação. Adicionalmente, as células meristemáticas inseridas nos ápices caulinares, são mais resistentes às baixas temperaturas utilizadas, com frequência, no processo de conservação (GUERRA; POMPELLI, 2011).

## **2.5 Isolamento de DNA genômico**

A aplicação de marcadores moleculares no melhoramento e na produção florestal pode envolver uma série de aplicações tecnicamente simples que não incluem a tentativa de correlacionar polimorfismos de DNA com características fenotípicas, mas sim de analisar o DNA para fins de identificação individual, estudos de parentesco (GRATTAPAGLIA, 2007), análises da estrutura genética de populações naturais ou sintéticas, entre outras. As tecnologias atuais de detecção de variabilidade na sequência do DNA se baseiam na amplificação de segmentos específicos do genoma pela reação em cadeia da polimerase (PCR), direcionada por oligonucleotídeos iniciadores da replicação (*primers*) específicos ou arbitrários

(BORÉM, 2007). O desenvolvimento da PCR levou ao desenvolvimento de várias técnicas de marcadores de DNA, tais como Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), microsatélites (SSRs), entre várias outras atualmente disponíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O isolamento e a purificação de ácidos nucleicos a partir de diversas amostras experimentais é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR). No momento da coleta, as amostras devem ser acondicionadas de forma adequada até o momento de serem submetidas ao isolamento do DNA, devendo ser cuidadosamente colhidas, armazenadas e refrigeradas. As partes da planta que serão fontes para o isolamento devem ser lavadas e enxaguadas com água destilada ou submetidas a um processo de esterilização superficial, de acordo com o objetivo dos estudos a serem realizados. Para melhor conservação, as amostras devem ser mantidas em temperatura de -20 °C ou -80 °C, dependendo do tempo de armazenamento. Para utilização de amostras conservadas em estoque, é interessante seu fracionamento em pequenas alíquotas, para que o material não sofra descongelamentos sucessivos, que poderiam contribuir para a oxidação do tecido e para a degradação do DNA. O manuseio dessas amostras deve ser feito, preferencialmente, com o uso de luvas, para que uma parte dos ácidos nucleicos não sejam degradados por nucleases, enzimas que, normalmente, estão presentes nos fluidos corporais liberados, principalmente, nas mãos das pessoas (OLIVEIRA et al., 2007).

Independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos nos padrões de migração em gel de eletroforese. A maioria dos protocolos de isolamento de DNA de tecidos vegetais, descritos na literatura, utilizam o protocolo padrão baseado em brometo hexadeciltrimetilamônio (CTAB), com algumas modificações, com vistas a resolver problemas específicos da espécie em estudo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Os ajustes de protocolo são feitos para que o procedimento de isolamento de DNA seja simples, rápida e de baixo custo, obtendo-se DNA de qualidade para análises moleculares (DANNER et al., 2011). Em amostras de folhas de árvores, existem contaminantes do DNA devido à ação de metabólitos secundários, tais como terpenos, polifenóis, taninos e polissacáridos, que são, muitas vezes, abundantes nas folhas das plantas lenhosas.

Além disso, a presença de RNA, frequentemente, pode interferir na qualidade de DNA isolado para uso em reações de PCR. Como consequência disso, muitas espécies requerem que o isolamento de DNA seja efetuado por meio de métodos mais complexos (SHEPHERD et al., 2002; ARIF et al., 2010).

Qualquer protocolo baseado no método CTAB compreende diversas etapas durante o processo de isolamento, devendo ser tomadas algumas providencias para garantir a qualidade das soluções isoladas. Nesse sentido, Romano; Brasileiro (1999), descrevem os cuidados e as etapas mais importantes: I – quebra das paredes celulares pelo congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido, II - as membranas celulares são rompidas para liberação do DNA, usando-se, geralmente, detergente como dodecil sulfato de sódio (SDS) ou CTAB; III – deve-se evitar a ação de desoxirribonucleases (DNAses), que podem degradar o DNA. Com esse propósito, os tampões de extração possuem pH por volta de 8,0, enquanto o pH ótimo para a ação de DNAses endógenas fica por volta de 7,0; IV – ácidos nucleicos devem ser separados das proteínas, para tanto, realiza-se de uma a várias extrações com fenol e/ou clorofórmio, que desnaturam as proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, em que se encontram os ácidos nucleicos (DNA); V – o DNA deve ser protegido da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA irreversivelmente, tornando-o inacessível às enzimas de restrição, processo que é realizado adicionando-se agentes antioxidantes ao tampão de extração, podendo ser polivinilpirrolidona (PVP ),  $\beta$ -mercaptoetanol, albumina de soro bovino (BSA); e, VI – os ácidos nucleicos devem ser separados de polissacarídeos, os quais, também, inibem a ação de enzimas de restrição, sendo, com essa finalidade, usado o tampão CTAB.

Uma vez concluído o processo de isolamento de DNA, as soluções de DNA genômico obtidas devem ser quantificadas, etapa importante que pode determinar a eficiência da reação PCR. Vale ressaltar que a quantidade de DNA obtida, varia em função do genoma e da eficiência do protocolo de isolamento utilizado (COSTA; MOURA, 2001). Essa quantificação pode ser realizada por eletroforese em gel de agarose, entre 0,8% e 1%, colocando-se de 2 a 5  $\mu$ L de cada solução de DNA junto com tampão de carregamento (azul de bromofenol), e sendo aplicada, também, uma amostra cuja concentração é conhecida, geralmente o DNA do bacteriófago *Lambda* em concentrações conhecidas de 20, 50, 100 e 200 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> (OLIVEIRA et al., 2007).

Outro método empregado na quantificação é por meio de espectrofotometria, em que são realizadas leituras em diferentes comprimentos de onda do espectro (230; 260 e 280 nm), e a concentração e a pureza do DNA sendo estimadas efetuando-se relações entre os diferentes valores de leitura obtidos nessas faixas. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm, já as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm, sendo assim, a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores de leitura inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína (REGITANO, 2001; SAMBROOK, 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

Além da verificação, da quantidade e qualidade do DNA, por meio dos procedimentos anteriormente descritos, podem ser empregadas, ainda, enzimas de restrição para verificar a funcionalidade das soluções de DNA obtidas. Endonucleases de restrição são enzimas que reconhecem sequências específicas na dupla fita de DNA, definidas por quatro a oito pares de bases (pb), denominadas regiões de restrição, e efetuam um corte (clivagem), dividindo segmentos de DNA. Uma vez que há uma série de enzimas de restrição disponíveis para estudos de biologia molecular, na escolha da enzima de restrição devem ser levados em consideração o seu preço e o tamanho de fragmentos obtidos. Enzimas que dividem o DNA em cortes definidos por quatro nucleotídeos clivam o DNA mais frequentemente que enzimas com cortes definidos por seis ou oito nucleotídeos, gerando maior número de fragmentos, de menor distância. Enzimas que dividem em cortes definidos por seis nucleotídeos são geralmente as utilizadas em estudos de marcadores de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), por exemplo, tais como *Eco* RI e *Hind* III, que, também, são as mais econômicas e fáceis de obter no mercado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VENERONI; REGITANO, 2007).

Protocolos de isolamento de DNA, baseados no método CTAB foram desenvolvidos para várias espécies nativas do Brasil, como por exemplo para *Araucaria angustifolia* (MAZZA; BITTENCOURT, 2000; STEFENON et al., 2004), *Butia capitata* (Mart.) Becc. (NUNES et al., 2008), *Tabebuia roseo alba* (ALZATE-MARIN et al., 2009), *Eugenia dysenterica* (SILVA, 2010), *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (RUAS et al., 2009; CONSON et al., 2013), entre outras.

## 2.6 Referências bibliográficas

ALFENAS, A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed., UFV, Viçosa, MG, 2009. 500p.

ALZATE-MARIN, A.L. et al. An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian archives of biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1217-1224, 2009.

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2003.

ARIF, I.A. et al. A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: impact of sand grinding and composition of lysis buffer. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, n. 9, p. 3149–3157, 2010.

AVILA, A.L. et al. Caracterização da vegetação e espécies para recuperação de mata ciliar, Ijuí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 251-260, 2011.

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 303p.

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188p.

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

BESPALHOK, J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R.A. **Uso e conservação de germoplasma**. Disponível em: <[www.bespa.agrarias.ufpr/paginas/livro/capitulo3.pdf](http://www.bespa.agrarias.ufpr/paginas/livro/capitulo3.pdf)>. Acesso em: 20 dez., 2012.

BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 387p. 2007.

BRANCALION, P.H.S.; GANDOLFI, S.; RODRIGUES, R.R. Incorporação do conceito da diversidade genética na restauração ecológica. In: RODRIGUES, R.R. et al [Eds] **Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. São Paulo, LERF/ESALQ: Instituto BioAtlântica, 2009, p. 41 – 58.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília: SDA/CGAL, 2013. 98p.

CARNEIRO, J.S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. **Patologia de Sementes**. Campinas: Abrates-Cargil, 1987.p.386-394.

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

CARVALHO, P.E.R. Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular Técnica 147**. Colombo, PR, Outubro, 2008.

CHAMI, L.B. et al. Mecanismos de regeneração natural em diferentes ambientes de remanescente de floresta ombrófila mista, São Francisco de Paula, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 251-259, 2011.

CONSON, A.R.R. et al.. Genetic structure of the Atlantic rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v. 141, p. 4-6, 2013.

COSTA, M. R.; MOURA, E. F. **Manual de extração de DNA**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001, 24p.

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

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009.

DANNER, M. A. et al. Proposta de protocolo para extração de DNA de Jabuticabeira. **Ciência Florestal**. v. 21, n. 2, p. 363-367, 2011.

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

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I.Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

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

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith-Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p

FLÔRES, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011a.

FLÔRES, A.V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) em função das concentrações do meio MS. **Cerne** (UFLA), v. 17, p. 549-553, 2011b.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. [eds]. Fundação SOS Mata Atlântica, Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p. 3 – 11.

GOLLE, D. P. et al. . Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* D.C.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, p. 207-214, 2012.

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

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BOREM, A. (Ed). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa, 2007, p. 175-200.

GUERRA, M.P.; POMPELLI, M.F. **Conservação de germoplasma *in vitro***. CCA/UFSC, Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/CONSERVAINVITRO.pdf>> . Acesso em: 19 dez, 2011.

HIROTA, M.M. Monitoring the Brazilian Atlantic Forest cover. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds.). **The Atlantic forest of south america: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington, D.C.: Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, 2003. p. 60-65.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1**. Nova Odessa: Plantarum. 384p. 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L.D.; SANTOS, I.R.I. **Manual de curadores de germoplasma vegetal: caracterização *in vitro***. Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2010, 11p.

MAZZA, M.C.M.; BITTENCOURT, J.V.M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, 2000

MEDEIROS, A.C.S., NOGUEIRA, A.C. Planejamento da coleta de sementes florestais nativas. **Circular Técnica 126**, Embrapa Florestas, Colombo, PR, p. 1 – 9, 2006.

MILLÁN-OROZCO, L.; CORREDOIRA, E.; SAN JOSE, M.C. *In vitro* rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 59, n. 1, pp 447-453, 2011.

NAZÁRIO, P.; WENDLING, I.; SOUSA, L.P. Enraizamento de estacas de *Luehea divaricata* sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 54, p. 139-143, 2007.

NOGUEIRA, A.C. MEDEIROS, A.C.S. Coleta de sementes florestais nativas. **Circular Técnica 144**, Embrapa Florestas, Colombo, PR, p. 1 – 11, 2007a.

NOGUEIRA, A.C. MEDEIROS, A.C.S. Extração e beneficiamento de sementes florestais nativas. **Circular Técnica 131**, Embrapa Florestas, Colombo, PR, p. 1 – 7, 2007b.

NUNES, A.M. et al. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 30, n. 3, p. 702 - 707, 2008.

OLIVEIRA, A. K. M. et al. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.

OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 445-460, 2013.

OLIVEIRA, M.C.S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 2007, p. 14 - 16.

PACHECO, J.P.; FRANCO, E.T.H. Ácido indolbutírico em diferentes diâmetros na estaquia de *Luehea divaricata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1624 - 1629, 2008.

REGITANO, L.C.A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Embrapa. 2001.

ROCHA, M.A.C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

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

ROESCH L. F. W. et al. The brazilian pampa: A fragile biome. **Diversity**. v. 1, p. 182-198. 2009.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas, **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.

ROSA, F. C. et al. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). **Semina Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1021-1026, 2012.

RUAS, E. A. et al. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. **Conservation Genetics Resources**. v. 1, p. 245-248. 2009.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700 p., 2002.

SANTOS, A. F.; PARISI, J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011b. 236 p.

SANTOS, M.C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011a.

SARMENTO, M.B.; VILLELA, F.A. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. **Informativo ABRATES**, v. 20, n. 1-2, p. 39-44, 2010.

SCALON, S.P.Q.; ALVARENGA, A.A.; DAVIDE, A.C. Influência do substrato, temperatura, umidade e armazenamento sobre a germinação de sementes de pau-pereira (*Platycyamus regnelli* Benth). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n. 1, p.143- 146, 1993.

SCHUMACHER, M. V.; HOPPE, J. M.; FARIAS, J. A. **Manual de instruções para a coleta, beneficiamento, armazenamento e análise de sementes florestais**. Santa Cruz do Sul: Associação dos Fumicultores do Brasil, 2002. 28 p.

SCCOTI, M.S.V. et al. Mecanismos de regeneração natural em remanescente de floresta estacional decidual. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 459-472, 2011.

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

SHEPHERD, M. et al. High-Throughput DNA extraction from forest trees. **Plant Molecular Biology Reports**, v. 20, p. 425-425, 2002.

SILVA, L.D.; HIGA, A.R. Planejamento de implantação de pomares de sementes de espécies florestais nativas. In: HIGA, A.R.; SILVA, L.D. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. FUPEF, Curitiba, 2006, p. 13 – 40.

SILVA, M.N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, UFV, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010.

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

SOUZA, A.S. et al. Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedade de mandioca. **Circular Técnico 90**, Embrapa: Cruz das Almas, 2009. 24p.

SOUZA, J.A. et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2046-2048, 2008.

STEFENON, V.M.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais, **Biotemas**, v. 17, n. 1, p. 47 - 63, 2004.

TEIXEIRA, D. A. 2001. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum* mediadas por rizobactérias em *Eucalyptus spp.*** 67 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.

TEIXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, 71-86.

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

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

TORRES, A.C. et al. Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: Formulações de meios para a cultura de tecidos de plantas. **Circular Técnica 24**, Embrapa, Brasília, p. 1-20, 2001.

VENERONI, G.B.; REGITANO, L.C.A. Enzimas de restrição. In: REGITANO, L.C.A. et al. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 2007, p 18 – 21.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Botecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 14, p. 18-20, 2000.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

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

WITHERS, L.A; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES et al. [ed.]. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 297-330.

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

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

### 3 CAPITULO I

#### SEMENTES DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. DE DIFERENTES MATRIZES: QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA

##### 3.1 Resumo

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) espécie nativa presente no Rio Grande do Sul, tem sofrido uma exploração desmedida das suas populações naturais, acarretando o estreitamento da sua base genética, refletido na baixa capacidade de recuperação das populações, devido à sazonalidade e/ou declínio da qualidade das sementes produzidas. O objetivo do presente trabalho foi analisar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoita-cavalo que foram coletadas em distintos pontos de ocorrência natural da espécie no Noroeste do Rio Grande do Sul. Foram realizadas avaliações das sementes, imediatamente após o beneficiamento e após seis meses de armazenamento em papel Kraft mantidos em refrigerador (entre 8 e 10 °C). Foram analisadas a qualidade sanitária utilizando o método “blotter test”, e a qualidade fisiológica das sementes sobre folhas de papel filtro. O delineamento foi inteiramente casualizado, com oito repetições de 25 sementes cada. A qualidade sanitária e fisiológica das sementes de açoita-cavalo, dependendo da árvore matriz em que foi coletada, apresentam respostas diferenciadas em relação ao período de armazenamento em sacos de papel Kraft a 8 – 10 °C. Os gêneros fúngicos identificados imediatamente após o beneficiamento das sementes, nem sempre persistem no decorrer do tempo, assim como as sementes podem ser infestadas por novos gêneros fúngicos durante o armazenamento e a qualidade fisiológica das sementes de açoita-cavalo, dependendo do seu estado de maturação, pode ser favorecida pelo armazenamento durante o período de seis meses após a coleta.

**Palavras-chave:** sementes florestais, contaminação fúngica, longevidade de sementes.

## SEEDS OF DIFFERENT *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. MOTHER TREES: PHYSIOLOGICAL AND SANITARY QUALITY

### 3.2 Abstract

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc, native species present in the Brazilian southernmost state of Rio Grande do Sul, have suffered unbridled exploitation of natural populations, resulting in the narrowing of its genetic base, which is reflected in the low resilience of populations due to seasonality and/or declining seed quality. The objective of this study was to analyze the physiological and sanitary quality of *Luehea divaricata* seeds, collected from different spots in the northwest area of Rio Grande do Sul state, where the species occurs naturally. Seed evaluation was carried out immediately after processing, and after being stored in a refrigerator in temperatures ranging from 8 to 10°C, for six months wrapped in Kraft paper. Sanitary quality was analyzed using the "blotter test" method and seed quality on sheets of filter paper. The design was completely randomized with eight replications of 25 seeds each. The sanitary and physiological quality of the seeds, depending on the mother tree from which they were collected, exhibit different responses to the storage period. The fungi species identified immediately after seed processing are not always persist over time, as the seeds can be infested by new genera of fungi during storage. The physiological quality of the seeds, depending on their physiological maturity state at collection, may be favored during the 6-month storage after collection.

**Keywords:** fungal contamination, seed longevity, seed vigor.

### 3.3 Introdução

Um dos principais problemas ambientais do século XXI é a devastação das florestas tropicais, causando também, alterações climáticas e perda da biodiversidade. A ocupação desordenada das áreas florestais fragmentadas, tanto para exploração agrícola como para a expansão de áreas urbanas e industriais, tem fomentado debates relacionados ao uso irracional dos recursos naturais (BARBOSA; MANTOVANI, 2000). Nesse sentido, no estado de Rio Grande do Sul, encontram-se os biomas Mata Atlântica e Pampa, ambos de grande importância na manutenção da biodiversidade, mas que foram altamente deteriorados pela ação antrópica, levando-as a perder grande parte da sua área original (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005; ROESCH et al., 2009).

Formando parte desses biomas, encontra-se a espécie *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) (CARVALHO, 2008), pioneira de rápido crescimento, de grande importância para reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 2008). Considerando-se seu habitat natural e sua vitalidade como espécie pioneira e heliófita, é possível usá-la, também, em reflorestamentos em campo aberto e em populações puras, porém, se exposta à luz direta, é provável que sua ramificação ocorra de maneira muito precoce, dificultando o desenvolvimento suficiente do tronco e do fuste (REITZ et al., 1988). No entanto, essa espécie tem sofrido uma exploração desmedida das suas populações naturais, acarretando o estreitamento da sua base genética, que por sua vez é refletido na baixa capacidade de recuperação dessas populações, devido principalmente à sazonalidade e/ou declínio da qualidade das sementes produzidas.

A disponibilidade de sementes de açoita-cavalo é controlada, em grande parte, por fatores genéticos e ambientais. Considerando-se que grupos de indivíduos pertencentes a mesma espécie, que estão consolidados em diferentes regiões, cada uma com características ambientais particulares, tendem a diferenciar-se geneticamente em forma de populações (BIERNASKI et al., 2012). Em decorrência disso, constata-se que as variações genéticas das espécies podem estar associadas a sua distribuição geográfica, sendo importante o estabelecimento de zonas de coleta e uso de sementes, para garantir a utilização adequada dessas sementes, por exemplo, em programas de restauração florestal (CUNNINGHAM, 1975).

Entre outros fatores de natureza ambiental, a época mais adequada para o início da colheita das sementes para a produção de mudas deve ser determinada para cada espécie, local e ano. Fatores do clima como temperatura, fotoperíodo, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica e fatores edáficos podem atuar direta ou indiretamente na qualidade física, fisiológica e sanitária das sementes produzidas em cada região. Adicionalmente, as sementes devem ser coletadas em árvores matrizes selecionadas, que são árvores com características superiores às demais, levando-se em consideração seu vigor, sanidade, forma, profundidade da copa, desrama natural e capacidade de produção de sementes (DAVIDE; SILVA, 2008).

Nesse contexto, o conhecimento dos caracteres fisiológicos das sementes florestais nativas assume destacada importância para o sucesso de sua conservação e, também, para a produção de mudas. Por esse motivo, após coletadas, as sementes devem ser beneficiadas para fins de realização de avaliações como o teste de germinação, índice de velocidade da germinação, qualidade sanitária, teor de umidade, entre outros, levando-se, ainda, em consideração os períodos e condições de armazenamento, para, então, estimar a viabilidade e longevidade das sementes da espécie (SILVA, 2004).

O armazenamento tem como principal objetivo conservar as sementes, evitando-se a sua deterioração e preservando suas qualidades física, fisiológica e sanitária, para posterior semeadura e obtenção de plantas saudáveis. Toda semente armazenada sofre deterioração, que pode ser mais rápida ou mais lenta, dependendo das características ambientais e das características da própria semente. A temperatura e a umidade relativa do ar influenciam o comportamento das sementes durante o armazenamento, pois afetam sua respiração (MARCOS FILHO, 2005).

Neste sentido, as espécies são classificadas em grupos distintos, em que aquelas com sementes ditas ortodoxas resistem à dessecação e mantêm a viabilidade, enquanto que aquelas denominadas sementes recalcitrantes, perdem a viabilidade quanto mais desidratadas estiverem durante o armazenamento (DIAS et al., 2006). Um terceiro grupo é formado pelas sementes classificadas como intermediárias, as quais apresentam pequena resistência à baixas temperaturas, porém certa tolerância à dessecação (até 12%), apresentando comportamento intermediário entre as sementes ortodoxas e recalcitrantes e tolerando a

desidratação até teores de água entre 7% e 10%, mas não suportando temperaturas baixas por períodos prolongados, podendo ser armazenadas em ambientes bem controlados por um período não muito longo (MEDEIROS, EIRA, 2006).

Considerando-se a relativa escassez de pesquisas e, também, divergências entre autores, existentes na literatura, em relação às informações sobre viabilidade e qualidade sanitária, após o armazenamento de sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., estudos mais aprofundados, investigando-se períodos adequados de armazenamento, podem assumir valor relevante para assegurar o êxito de sua perpetuação nas populações florestais das futuras gerações. Face ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., conservadas em papel Kraft no interior de refrigerador, e que foram coletadas em distintos pontos de ocorrência natural da espécie no Noroeste do Rio Grande do Sul.

### 3.4 Material e métodos

#### 3.4.1 Local de coleta e beneficiamento das sementes

No presente experimento foram utilizadas sementes de oito árvores matrizes, localizadas em áreas de florestas fragmentadas, que se encontram em desenvolvimento no Noroeste do estado de Rio Grande do Sul, entre os municípios de Ijuí, Entre-Ijuís, Bozano e Coronel Barros. Foram coletados frutos de árvores de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., em áreas de ocorrência natural, auxiliados da equipe do Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ). Na Tabela 1 são apresentadas as coordenadas geográficas de cada matriz, bem como a região a qual pertence.

Tabela 1. Localização das árvores matrizes em que foram coletadas as sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., avaliadas no presente estudo, em municípios do Noroeste do RS. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Código da matriz	Município/Bairro	Coordenadas geográficas	Altura aproximada (msnm)
IJ 1	Boca da picada	21J 0791998 UTM6850383	286,0
IJ 2	Bozano	22J 0220102 UTM6858771	320,0
IJ 3	Bairro Modelo 1	22J 0216362 UTM6857510	346,0
IJ 4	Bairro Modelo 2	22J 0216340 UTM6857512	308,0
IJ 5	Entre-Ijuis 1	21J 0774981 UTM6850192	292,0
IJ 6	Entre-Ijuis 2	21J 0783059 UTM6858327	235,0
IJ 7	Coronel Barros 1	22J 0206680 UTM6850568	290,0
IJ 8	Coronel Barros 2	22J 0206758 UTM6850474	287,0

Os frutos, contendo as sementes, foram coletados com a ajuda de podão e armazenados em sacos plásticos devidamente identificados. Na sequência, foram transportadas até o Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

O processo de beneficiamento consistiu na secagem dos frutos em casa de vegetação, sendo distribuídos sobre uma superfície coberta com lona para evitar o contato direto com o piso, onde permaneceram por, aproximadamente, uma semana. Uma vez secos, os frutos foram transportados até o referido Laboratório, onde se procedeu à extração das sementes, por meio de pressão com alicate na região oposta à abertura, facilitando-se o processo de extração das sementes. Na sequência, foram retiradas as impurezas que restaram depois da extração, sendo as sementes colocadas em sacos de papel Kraft para seu armazenamento em refrigerador à temperatura de 8–10 °C, aproximadamente, até o momento do seu uso no presente experimento, que ocorreu no período de outubro a novembro de 2012, e de abril a maio de 2013.

Os testes, para avaliar a qualidade sanitária das sementes, foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária – UFSM, e o teste de germinação foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia.

#### **3.4.2 Qualidade sanitária de sementes**

Para a avaliação da qualidade sanitária de sementes foi utilizado o método “blotter test” ou teste do papel filtro, que foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Os tratamentos consistiram das oito matrizes diferentes, em dois períodos (imediatamente após o beneficiamento e seis meses após) de armazenamento em refrigerador. Foram utilizadas oito repetições por tratamento, composta, cada uma, por 25 sementes.

Primeiramente, foi realizada a desinfestação das caixas plásticas tipo *Gerbox*, com dimensões de 11cm x 11cm x 3cm, com o auxílio de algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a

70% (v/v). Em seguida, as sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel filtro, previamente esterilizadas e umedecidas com água estéril. A inoculação das sementes no papel foi realizada com o auxílio de pinças desinfestadas com algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, as caixas, contendo as sementes, foram fechadas e inseridas dentro de sacos plásticos, com a finalidade de conservar melhor a umidade, e, então, foram acondicionadas na sala de cultivo do Laboratório, que apresenta as seguintes condições: temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Sete dias após a instalação do experimento foi realizada a avaliação da sanidade das sementes, sendo identificados os gêneros fúngicos que foram observados nas sementes de cada caixa, dados que foram utilizados para determinar a porcentagem de incidência dos gêneros fúngicos em cada caixa. Os gêneros foram identificados por meio da visualização em microscópio estereoscópio e ótico, sendo que, para os gêneros fúngicos com as estruturas de reprodução bem desenvolvidas foi possível realizar a identificação somente com o emprego de microscópio estereoscópio, por meio da observação e posterior comparação com a literatura especializada. Para os demais, com dificuldades para sua identificação, foram retiradas amostras do micélio com estruturas de reprodução e, então, com o auxílio de agulhas, fita adesiva e pinça, foram confeccionadas lâminas e, a partir da sua observação em microscópio ótico, e mediante o auxílio de literatura especializada, foi possível a identificação dos demais gêneros fúngicos.

### **3.4.3 Qualidade fisiológica de sementes**

Os ensaios para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram realizados seguindo-se as recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). No presente estudo, os tratamentos consistiram, igualmente, da análise das sementes coletadas nas oito matrizes, em dois períodos diferentes, imediatamente após o beneficiamento e após seis meses de armazenamento das sementes em refrigerador. Foram utilizadas oito repetições por tratamento, compostas, cada uma, por 25 sementes, e distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. Primeiramente, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial, com imersão em etanol a 70% (v/v) durante 30 s, e na

sequência, por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) durante 10 min, efetuando-se triplo enxágue com água estéril após cada procedimento. Todo o material utilizado para a realização do teste também passou por desinfestação, que foi realizada mediante limpeza com algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (v/v) e, a seguir, em etanol a 70% (v/v).

Foram distribuídas duas folhas de papel filtro, previamente esterilizadas, em caixas plásticas tipo *Gerbox* com dimensões de 11cm x 11cm x 3cm, as quais foram, previamente, umedecidas com água estéril. Em seguida, as sementes foram acondicionadas nas caixas que, posteriormente, foram inseridas dentro de sacos plásticos, para a manutenção da umidade. A seguir, as caixas foram acondicionadas em sala de cultivo, com temperatura de  $25\pm 3$  °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A umidade no interior das caixas foi observada diariamente e, quando necessário, foi borrifada água estéril sobre as sementes para manter a umidade.

Foram realizadas quatro avaliações, com intervalos de sete dias cada, sendo consideradas germinadas as sementes que romperam o tegumento e emitiram radícula. As variáveis analisadas foram expressas em porcentagem e estão descritas a seguir, de acordo com Brasil (2009):

- Porcentagem de germinação: corresponde à proporção do número sementes que romperam o tegumento e emitiram radícula,
- Primeira contagem de germinação: proporção de sementes germinadas na primeira avaliação, aos sete dias.
- Sementes mortas: aquelas que, no final do teste, não germinaram, mas não estavam duras, nem dormentes, estavam amolecidas ou atacadas por microrganismos e não apresentam nenhum sinal de início de germinação.
- Sementes duras: aquelas que permanecem sem absorver água por um período mais longo que o normal, e se apresentam, no final do teste, com aspecto de sementes recém colocadas no substrato, isto é, não intumescidas.
- Comprimento de plântulas (mm): medida tomada desde o ápice caulinar da plântula até o ápice radicular.
- Índice de velocidade de germinação (IVG): para a avaliação do IVG foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$

Em que IVG = índice velocidade de emergência;  $G_1, G_2, \dots, G_n$  = número de plântulas germinadas a cada dia e  $N_1, N_2, \dots, N_n$  = número de dias decorridos da sementeira a primeira e última contagem.

#### 3.4.4 Análise estatística dos dados

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função  $\sqrt{x+1}$ , sendo  $x$  o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de  $F$  foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (FERREIRA, 2011). A precisão dos ensaios foi estimada pela acurácia seletiva (AS), calculada por  $\sqrt{1-(1/Fc)}$ , a qual corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos (STORCK et al., 2010).

### 3.5 Resultados e discussão

#### 3.5.1 Qualidade sanitária de sementes

Houve efeito significativo da interação entre os dois fatores principais, período de armazenamento e matriz, para os gêneros fúngicos *Alternaria* sp. (p=0,0147), *Aspergillus* sp. (p=0,0000), assim como também ocorreu para *Botrytis* sp. (p=0,0063), *Cladosporium* sp. (p=0,0016), *Curvularia* sp. (p=0,0102), *Penicillium* sp. (p=0,0012), *Phoma* sp. (p=0,0000), *Fusarium* sp. (p=0,0130), *Rhizopus* sp. (p=0,0382), *Rhizoctonia* sp. (p=0,0000) e *Pestalotia* sp. (p=0,0001). Para *Epiccocum* sp. (p=0,0000), houve efeito significativo apenas do fator principal matriz. A precisão do experimento pode ser estimada como satisfatória, obtendo-se valores de acurácia seletiva (AS) de 0,73 a 0,95, considerados como altas e muito altas, conforme a classificação de Resende et al. (2007) (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes coletadas em matrizes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), avaliadas no teste de sanidade pelo método do 'blotter test', em função da interação entre os dois períodos de armazenamento e as árvores matrizes. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Matriz	Gênero fúngico							
	<i>Alternaria</i> sp.		<i>Aspergillus</i> sp.		<i>Botrytis</i> sp.		<i>Cladosporium</i> sp.	
	Período <sup>1</sup>							
	1	2	1	2	1	2	1	2
IJ-1	28,5 Aa*	43,5 Ba	5,5 Aa	0,5 Aa	15,5 Aa	8,5 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
IJ-2	56,5 Ac	57,0 Ab	7,5 Aa	5,5 Aa	27,5 Bb	8,5 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
IJ-3	82,0 Ad	88,0 Ac	46 Ac	46,5 Ad	21,0 Ab	17,5 Ab	0,0 Aa	0,0 Aa
IJ-4	68,5 Ac	81,0 Ac	19,0 Ab	39,0 Bd	21,0 Ab	18,0 Ab	0,0 Aa	0,0 Aa
IJ-5	64,5 Ac	80,5 Bc	7,5 Aa	24,0 Bc	32,0 Ab	28,5 Ab	5,0 Bb	0,0 Aa
IJ-6	49,0 Ab	51,5 Ab	4,5 Aa	7,5 Aa	11,0 Aa	9,0 Aa	2,0 Ba	0,0 Aa
IJ-7	48,0 Bb	29,0 Aa	3,5 Aa	6,0 Aa	6,0 Aa	4,5 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
IJ-8	59,0 Ac	73,0 Ac	1,0 Aa	16,5 Bb	2,5 Aa	10,5 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
<b>A.S.**</b>	<b>0,78</b>		<b>0,90</b>		<b>0,82</b>		<b>0,85</b>	
<b>Média</b>	<b>59,97</b>		<b>15,00</b>		<b>15,09</b>		<b>0,44</b>	

Tabela 2 (cont...)

Matriz	Gênero fúngico							
	<i>Curvularia</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.		<i>Phoma</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.	
	Período							
	1	2	1	2	1	2	1	2
IJ-1	2,0 Aa	14,5 Ba	4,0 Ab	0,5 Aa	48,5 Bd	5,0 Aa	81,0 Bb	30,0 Ab
IJ-2	3,5 Aa	22 Bb	6,5 Bb	0,5 Aa	35 Bc	9,0 Ab	81,5 Bb	29,5 Ab
IJ-3	13 Ab	25 Bb	7,5 Bb	0,5 Aa	6 C Aa	1,5 Aa	75,5 Bb	17,5 Aa
IJ-4	8,0 Ab	22,5 Bb	0,0 Aa	1,5 Aa	1,5 Aa	1,0 Aa	75,0 Bb	31,5 Ab
IJ-5	10,5 Bb	18,0 Bb	4,5 Bb	0,0 Aa	19,5 Ab	19,5 Ab	69,0 Ba	34,0 Ab
IJ-6	6,0 Aa	8,0 Aa	3,5 Bb	0,0 Aa	18,0 Ab	10,0 Ab	82,5 Bb	45,0 Ab
IJ-7	6,5 Aa	7,5 Aa	0,0 Aa	1,5 Aa	45,0 Bd	9,5 Ab	58,0 Ba	13,5 Aa
IJ-8	4,0 Aa	8,0 Aa	1,0 Aa	2,5 Aa	11 Aa	0,0 Aa	63,5 Ab	33,0 Ab
<b>A.S.**</b>	<b>0,83</b>		<b>0,83</b>		<b>0,94</b>		<b>0,73</b>	
<b>Média</b>	<b>11,19</b>		<b>2,13</b>		<b>15,00</b>		<b>51,25</b>	

Matriz	Gênero fúngico							
	<i>Rhizopus</i> sp.		<i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>Pestalotia</i> sp.		<i>Epicoccum</i> sp.	
	Período							
	1	2	1	2	1	2	1	2
IJ-1	2,0 Aa	1,5 Aa	1,0 Aa	41,0 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa		22,5 a
IJ-2	3,0 Aa	1,0 Aa	9,5 Aa	35,0 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa		20,25 a
IJ-3	2,0 Aa	7,5 Bb	26 Aa	81,5 Bc	0,0 Aa	0,5 Aa		53,5 b
IJ-4	2,0 Aa	1,5 Bb	16,0 Aa	59,0 Bb	5,5 Bb	1,0 Aa		42,5 b
IJ-5	3,5 Aa	1,0 Aa	57,5 Ab	84,0 Bc	0,0 Aa	2,0 Ba		44,0 b
IJ-6	2,5 Aa	0,0 Aa	53,5 Ab	68,0 Ac	0,0 Aa	2,0 Ba		28,25 a
IJ-7	0,0 Aa	0,0 Aa	79,5 Ac	86,0 Ac	0,0 Aa	1,0 Aa		43,25 b
IJ-8	0,0 Aa	0,0 Aa	62,5 Ab	79,0 Ac	0,0 Aa	0,0 Aa		32,5 a
<b>A.S.**</b>	<b>0,76</b>		<b>0,85</b>		<b>0,88</b>		<b>0,95</b>	
<b>Média</b>	<b>1,72</b>		<b>52,43</b>		<b>0,75</b>		<b>35,84</b>	

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. As letras 'a' e 'A', representam o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. <sup>1</sup> 1 = primeiro período de armazenamento, imediatamente após o beneficiamento e, 2 = segundo período de armazenamento (em refrigerador), seis meses após a colheita e beneficiamento. \*\*AS= acurácia seletiva, faixas: ≤0,5 (Baixa); 0,5<AS 0,7 (Moderada); 0,7<AS 0,9 (Alta); >0,9 (Muito Alta).

Houve incidência do fungo *Alternaria* sp. em todas as matrizes avaliadas, nos dois períodos, sendo as matrizes IJ-3 (82%), IJ-4 (68,5%) e IJ-5 (64,5%), as que apresentaram maior média no primeiro período de avaliação. No segundo período, aumentou a ocorrência desse gênero fúngico, igualmente, foram as mesmas matrizes do primeiro período (IJ-3, IJ-4 e IJ-5), as que apresentaram maior ocorrência, diferindo das demais. Da mesma maneira, o gênero *Aspergillus* sp., apresentou alto índice de ocorrência na matriz IJ-3, em ambos os períodos, enquanto as matrizes IJ-1 e IJ-2, registraram decréscimos na incidência deste gênero fúngico. Em contrapartida, a matriz IJ-1 foi a que menos apresentou contaminação com o primeiro gênero fúngico mencionado anteriormente e, a matriz IJ-7 foi a única que registrou decréscimos na porcentagem de associação com esse gênero, diminuindo de 48%, no primeiro período, para 29%, no segundo período avaliado.

Para *Botrytis* sp., a matriz IJ-5 foi a mais contaminada em ambos os períodos, e as matrizes IJ-8 e IJ-7, foram aquelas de menor incidência desse gênero, no primeiro período e no segundo período, respectivamente. Entretanto, apenas a matriz IJ-8 registrou aumento na incidência desse gênero fúngico, enquanto nas demais matrizes analisadas, a porcentagem de fungos foi reduzida após seis meses de armazenamento em refrigerador.

O gênero fúngico *Cladosporium* sp. ocorreu apenas nas matrizes IJ-5 (5%) e IJ-6 (2%), e somente no primeiro período avaliado. Entretanto, o gênero *Curvularia* sp. ocorreu em maior porcentagem na matriz IJ-3, tanto no primeiro período (13%), como no segundo período (25%), aumentando sua incidência de um período para outro, em todas as matrizes analisadas. Efeito contrário foi observado em *Penicillium* sp., em que, no segundo período de avaliação, a porcentagem de incidência fúngica diminuiu em cinco (IJ-1, IJ-2; IJ-3, IJ-5 e IJ-6) das oito matrizes analisadas. Nas demais matrizes estudadas (IJ-4, IJ-7 e IJ-8), embora, tenha sido observado aumento na presença desse fungo, a porcentagem chegou apenas a 1,5% acima do registrado no primeiro período nas matrizes.

Entre os gêneros de fungos que registraram decréscimos consideráveis, na associação com sementes de todas as matrizes analisadas, foram identificados *Phoma* sp. e *Fusarium* sp. O primeiro, com uma incidência média de 23,1%, no primeiro período avaliado, que se reduziu para 6,9% de sementes contaminadas no segundo período. *Fusarium* sp. de 73,3%, baixou para 29,3% de sementes

contaminadas com este fungo. Esse tipo de resposta também foi observada em outros gêneros, mas a diminuição na porcentagem de ocorrência foi registrada somente em algumas matrizes. O efeito contrário, aumento na porcentagem de contaminação no segundo período, comparada àquela observada no primeiro, registrou-se no gênero *Curvularia* sp., que aumentou, em média, 6,7%, no primeiro período, para 15,7% no segundo período, e, também, no gênero *Rhizoctonia* sp., crescendo de 38,2% no primeiro período para 66,7%, no segundo.

O gênero *Pestalotia* sp. foi observado apenas nas sementes da matriz IJ-4 (5,5%) no primeiro período avaliado. Porém, no segundo período, o número de matrizes contaminadas aumentou para cinco das oito analisadas, contudo, as porcentagens variaram entre 0,5 e 2% apenas.

Por outro lado, no gênero *Epiccocum* sp., houve efeito significativo apenas para o fator árvore matriz, sendo as sementes da matriz IJ-3 (53,5%) aquelas que desenvolveram elevada presença de estruturas pertencentes a esse fungo. Ao contrário, a matriz IJ-2 foi a que se contaminou em menor porcentagem por esse gênero fúngico.

Os mesmos gêneros fúngicos identificados no presente ensaio, também foram identificados em outro teste de sanidade efetuado em sementes de açaite-cavalo, a saber: *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phoma* sp. e *Cladosporium* sp. O gênero *Fusarium* sp. apresentou a maior incidência, alcançando 44% no teste papel filtro em um dos lotes avaliados (MACIEL et al., 2013). Em um dos poucos estudos que relataram as condições sanitárias de sementes de açaite-cavalo, foram identificados o gênero *Colletotrichum* sp., além de outros comuns aos observados no presente trabalho, como *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp. e *Rhizoctonia* sp (MIETH et al., 2007). Estes gêneros são comuns em sementes e são classificados como saprófitos externos na maioria dos testes de sanidade, sejam em árvores ou em espécies agrícolas (MEDEIROS et al., 1992).

Alguns trabalhos em que foi estudado o efeito do período de armazenamento em relação à contaminação das sementes por fungos demonstraram que os gêneros fúngicos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. foram detectados em todos os lotes testados de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena), porém em porcentagens diferentes. Armazenadas por dois meses, as sementes de leucena apresentaram porcentagens de contaminação de 20% e 10% por *Aspergillus* sp. e

*Penicilium* sp. respectivamente. Já aos 28 meses de armazenamento, houve 5% de contaminação para *Aspergillus* sp. e 26% de contaminação por *Penicilium* sp., e após 48 meses, as sementes registraram 23,5% de contaminação por *Aspergillus* sp. e 12,5% por *Penicilium* sp. Os gêneros *Fusarium* sp. e *Curvularia* sp. foram observados apenas após dois meses de armazenamento, com médias de 6,5% e 2,0%, respectivamente, em *Leucaena leucocephala* (MENDES et al, 2011).

Em outro estudo, os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. apresentaram uma ocorrência de 100% em sementes de *Spondias tuberosa* (umbu) (FAIAD et al., 1995). Segundo os autores, a contaminação de sementes por fungos saprófitas e de armazenamento ficou bastante evidenciada, porque houve uma redistribuição dos fungos entre as sementes durante o período em que estiveram secando em condições de temperatura e de umidade favoráveis à multiplicação desses micro-organismos. Igualmente, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. foram observados em associação com muitas sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica, como *Peltophorum dubium* (canafístula), *Enterolobium contortisiliquum* (timbaúva), *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) e *Poecilanthus parviflora* (coração-negro) (SANTOS et al., 2001).

Em sementes de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. (ipê-verde), foi observado que houve tendência de aumento na incidência de *Aspergillus* sp. no transcorrer do armazenamento, tornando-se mais acentuado aos 435 dias, quando, independentemente do lote ou condição de armazenamento, este gênero passou a infestar as sementes (MELO, 2009). Nesse sentido, a associação dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. às sementes pode ser altamente prejudicial no armazenamento, podendo causar a redução na qualidade das sementes por meio da perda do poder germinativo pela colonização do embrião, descoloração e apodrecimento, aumento na taxa respiratória com conseqüente aumento na deterioração das sementes. Adicionalmente, esses micro-organismos podem consumir ou causar alterações na constituição das reservas e, por fim, podem produzir micotoxinas, inibidoras da síntese de proteínas e ácidos nucléicos (MACHADO, 1988; MARCOS FILHO, 2005).

No presente trabalho, na maioria das matrizes, houve aumento na contaminação das sementes pelo gênero *Aspergillus* sp., após o armazenamento. Esse gênero é considerado patógeno de armazenamento e tem sua ocorrência aumentada quando as sementes são mantidas em condições diferentes às

recomendadas pelas normas técnicas (CHEROBINI et al., 2008). Para ilustrar, na matriz IJ-8, por exemplo, a ocorrência do fungo foi de 1% na primeira avaliação e passou para 16,5%, na segunda análise.

Em sementes de *Jacaranda mimosifolia* (jacarandá-mimoso), foram identificados os fungos considerados de armazenamento, como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.; e os potencialmente patogênicos: *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. (BOVOLINI et al., 2011). Os gêneros *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp. e *Cylindrocladium* sp. são patógenos responsáveis por mais de 90% de perda de sementes germinadas e de plântulas de espécies cultivadas (NEERGARD, 1997).

Em *Astronium urundeuva* (FR. ALL.) ENGL. (aroeira), foi observado que os fungos detectados em maior frequência foram os que causam problemas em condições de armazenamento, especialmente aqueles do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (MEDEIROS et. al, 1992). Esses fungos, observados nas sementes, apresentam alta velocidade de crescimento micelial e de esporulação, o que pode facilitar a contaminação de outras sementes durante os períodos de incubação (FERREIRA, 1989).

A contaminação das sementes de essências florestais dá-se predominantemente no solo, onde os frutos e sementes são colonizados por diversos fungos, incluindo saprófitas e parasitas facultativos que têm vida saprofítica no solo ou na matéria orgânica, tais como: *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp. e *Cylindrocladium* sp., dentre outros (FERREIRA, 1989). Quando esses frutos e sementes são levados para a etapa de beneficiamento e/ou armazenamento, os fungos são, então, disseminados para as sementes sadias.

No presente estudo, essas diferenças observadas, entre os dois períodos avaliados, pode ser atribuída a fatores tais como as características de cada gênero fúngico em relação às condições de armazenamento, assim como aos cuidados proporcionados durante o processo de beneficiamento das sementes, atendendo que a ocorrência dos diferentes gêneros de fungo identificados, vê-se favorecida por determinadas condições apresentadas durante os processos supramencionados, já que alguns são próprios de armazenamento, enquanto outros, são favorecidos durante a colheita/beneficiamento das sementes, como os saprófitas e parasitas facultativos, que têm vida saprofítica no solo ou na matéria orgânica.

A ocorrência dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp., por exemplo, é comum em sementes florestais, sendo transportados diretamente do local de colheita para o laboratório (PIÑA-RODRIGUES; VIEIRA, 1988). Os mesmos fungos citados anteriormente associam-se à deterioração das sementes e sua ação é dependente das condições físicas e fisiológicas das mesmas, por ocasião do início do armazenamento, e dos fatores ambientais predominantes no decorrer desse período (RUIZ FILHO et al., 2004). Ainda, a variação na ocorrência, que alguns gêneros fúngicos apresentam durante o armazenamento, pode ser em decorrência da capacidade antagônica que determinados gêneros possuem e o estabelecimento de interações durante esse período.

### **3.5.2 Qualidade fisiológica de sementes**

Houve efeito significativo da interação entre o período de armazenamento e as matrizes, para as variáveis porcentagem de germinação ( $p=0,0000$ ), IVG ( $p=0,0000$ ), porcentagem de sementes mortas ( $p=0,0015$ ), e porcentagem de sementes duras ( $p=0,0000$ ). A precisão do experimento pode ser considerada satisfatória, uma vez que foram obtidos valores de acurácia seletiva (AS) de 0,85 a 0,92, considerados como altos e muito altos, conforme a classificação de Resende et al. (2007) (Tabela 3).

Decorrido seis meses de armazenamento, a porcentagem de germinação foi superior, na maioria das matrizes, sendo que somente a matriz IJ-6 registrou decréscimos na porcentagem de germinação, após o período de armazenamento em refrigerador. Em decorrência disso, o IVG também registrou aumento, passados os seis meses de armazenamento, em todas as matrizes em que houve aumento na germinação no segundo período avaliado. Essas respostas podem ser atribuídas à superação de dormência das sementes em momentos diferentes, uma vez que, quando recém colhidas, as sementes apresentavam, ainda, um alto nível de dormência embrionária. Nessa lógica, a seleção natural das espécies ocorre em tal sentido que, aquelas que produziram sementes com diferentes graus de dormência, germinam em diferentes momentos, garantindo que a produção de uma nova planta ocorra apenas quando as condições forem favoráveis (ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

Tabela 3. Médias de porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de sementes mortas e porcentagem de sementes duras em sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em oito matrizes, em dois períodos de armazenamento em sacos de papel Kraft, a temperatura de 8-10 °C, em refrigerador. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Matriz	Germinação (%)		IVG		Sementes mortas (%)		Sementes duras (%)	
	----- Período <sup>1</sup> -----							
	1	2	1	2	1	2	1	2
IJ-1	14,5 Bc*	44,0 Aa	0,13 Bc	0,39 Aa	37,5 Ac	35,5 Ab	48,0 Bb	20,5 Aa
IJ-2	26,0 Bb	51,0 Aa	0,23 Bb	0,46 Aa	19,5 Ab	23,5 Aa	54,5 Bb	25,5 Aa
IJ-3	19,0 Bc	46,5 Aa	0,17 Bc	0,41 Aa	9,0 Aa	20,5 Ba	72,0 Bc	33,0 Ab
IJ-4	22,0 Bb	33,0 Ab	0,20 Bc	0,30 Ab	22,5 Ab	31,5 Ab	55,5 Bb	35,5 Ab
IJ-5	33,5 Ab	37,5 Ab	0,30 Ab	0,33 Ab	17,0 Ab	43,0 Bb	49,5 Bb	19,5 Aa
IJ-6	54,0 Aa	45,0 Aa	0,48 Aa	0,40 Aa	29,0 Ac	37,5 Ab	17,5 Aa	17,5 Aa
IJ-7	10,5 Bc	34,5 Ab	0,09 Bc	0,31 Ab	21,5 Ab	25,0 Aa	68,0 Bc	40,5 Ab
IJ-8	48,5 Aa	55,0 Aa	0,43 Aa	0,49 Aa	32,0 Ac	32,0 Ab	19,5 Aa	13,0 Aa
<b>A.S.**</b>	<b>0,92</b>		<b>0,92</b>		<b>0,85</b>		<b>0,92</b>	
<b>Média</b>	<b>35,91</b>		<b>0,32</b>		<b>33,81</b>		<b>36,84</b>	

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. As letras 'A' e 'a', representam o melhor resultado para as variáveis analisadas. <sup>1</sup> 1 = primeiro período de armazenamento, correspondente imediatamente após o beneficiamento e, 2 = seis meses após o armazenamento. \*\*AS= acurácia seletiva, faixas: ≤0,5 (Baixa); 0,5<AS 0,7 (Moderada); 0,7<AS 0,9 (Alta); >0,9 (Muito Alta).

Em outro trabalho realizado com *Luehea divaricata* a emergência das plântulas variou entre 51% e 63%, para lotes coletados em Santa Maria e Restinga Seca, RS, respectivamente (MACIEL et al., 2013). Entretanto, quando foi utilizado substrato vermiculita, foram observadas médias de emergência que variaram de 30,4% a 51% para sementes de açoita-cavalo coletadas em Minas Gerais (BORGES et al., 2007). Em outro trabalho realizado, o percentual de emergência de plântulas dessa espécie, em substrato areia, oriundas da região metropolitana de Porto Alegre, RS, atingiu 75% (SILVA, 2004). Essas variações nos valores de emergência de uma região para outra, ou até mesmo dentro de uma mesma região, podem estar associados a fatores como condições de solo, umidade e insolação no

ambiente em que a árvore matriz está inserida, assim como às características fisiológicas da própria semente.

Em sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore (ipê-amarelo-do-cerrado), armazenadas em câmara fria e seca (15 °C e 40% de UR), foi verificado que a viabilidade das sementes foi mantida por até 120 dias com altos percentuais de germinação, variando de 88% a 97% (CABRAL et al., 2003). Por outro lado, em estudo realizado com sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng) Taubert (canafístula), armazenadas em papel sob refrigeração (10 °C), foi observado que as mesmas mantiveram a porcentagem de germinação (63,2%) após 45, 90 e 150 dias, que foi apresentada quando semeadas logo após a colheita de (PEREZ et al., 1999). Resultados promissores foram verificados em sementes de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho), coletadas em São Paulo, armazenadas por um período de um ano e oito meses, em câmara fria e seca a 10 °C e 40% UR, apresentaram 86% e 71% de germinação sobre substratos de papel e rolo de papel, respectivamente (MONDO et al., 2008).

A matriz IJ-1 apresentou a maior diferença de germinação entre o primeiro período analisado e o segundo, passando de 14,5% de germinação para 44%, e decrescendo, igualmente, a porcentagem de sementes duras (48% para 20,5%). A matriz IJ-8 se manteve com porcentagens de germinação relativamente altas nos dois períodos avaliados, 48,5% e 55%, respectivamente. Outra matriz que apresentou um acréscimo relativamente alto na germinação, no período considerado entre as duas avaliações, foi IJ-3, que, no primeiro período, exibiu 19% de sementes germinadas, e, no segundo, aumentou para 46,5%, decaindo, ao mesmo tempo, consideravelmente a porcentagem de sementes duras (72% para 33%), neste mesmo período.

Nas sementes das matrizes que mantiveram elevadas porcentagens de germinação, ou naquelas em que houve um aumento nessas médias no segundo período, provavelmente estão ausentes substâncias inibitórias da germinação, conforme indicou Borgheti (2004). Nesse sentido, de acordo com Marcos Filho (2005), a maturidade fisiológica, talvez tenha exercido influência sobre o aumento na germinação das sementes no segundo período avaliado, em decorrência de que, no momento do primeiro teste, as sementes de algumas matrizes ainda não tinham atingido a maturidade fisiológica, a que permitiria otimizar o processo germinativo.

Sementes de *Anadenanthera colubrina* (angico-branco), se mantiveram viáveis pelo período de seis meses, havendo um aumento na porcentagem germinativa dos lotes avaliados durante o período de armazenamento (47% para 59%) (BRAGA et al., 2008). É possível que esse aumento seja devido à continuidade do processo de maturação fisiológica durante o período de armazenamento (PIÑA-RODRIGUES; JESUS, 1992). Em *Bixa orellana* (urucum), Dias et al. (2010) verificaram que, tanto a porcentagem de germinação quanto o IVG, apresentaram médias superiores após 90 dias de armazenamento, sendo que a maior porcentagem de germinação observada foi de 27% nas sementes armazenadas por 90 dias, enquanto foi de 21% em sementes recém colhidas. No entanto, sementes de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (jacarandá) puderam ser armazenadas por 150 dias em condições refrigeradas, sem necessitar de nenhum tratamento para alcançar 90% de emergência das plântulas, mesma porcentagem de emergência que as sementes recém colhidas (SCALON et al., 2006).

O comprimento das plântulas, aos 28 dias de cultivo, apresentou efeito significativo dos fatores principais árvore matriz ( $p=0,0026$ ) e período de avaliação ( $p=0,0004$ ), enquanto a interação dos fatores não apresentou efeito significativo ( $p=0,0768$ ). As estimativas da AS, certificam a precisão do experimento em níveis alto (0,83) e muito alto (0,96), respectivamente, para os fatores matriz e período de armazenamento (Tabela 4).

As plântulas oriundas das matrizes IJ-1, IJ-2, IJ-3 e IJ-8 desenvolveram os maiores comprimentos em altura (33,5mm a 28,57mm), aos 28 dias (Tabela 4). As demais matrizes analisadas, que apresentaram médias menores, igualmente desenvolveram plântulas que podem ser consideradas promissoras para utilização na produção de mudas de açoita-cavalo (Tabela 4). Ainda em relação ao comprimento em altura alcançado nos dois períodos avaliados, as plântulas desenvolvidas no segundo período (30,33mm) de análise apresentaram médias significativamente diferentes daquelas observadas no primeiro período (25,76mm).

Em relação à porcentagem de sementes germinadas, na primeira contagem houve diferenças estatísticas apenas para o fator matriz ( $p=0,0000$ ), enquanto o fator período de avaliação ( $p=0,5268$ ) e a interação entre os dois fatores ( $p=0,9924$ ) não apresentaram efeito significativo (Tabela 4).

Tabela 4. Médias de comprimento de plântulas (mm) e porcentagem de sementes germinadas na primeira contagem, em sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em oito matrizes, independentemente do período de avaliação (recém colhidas ou após seis meses de armazenamento em sacos de papel Kraft, a temperatura de 8-10 °C, em refrigerador). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

<b>Matriz</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Primeira contagem (%)</b>
IJ-1	33,5 a	0,00 b
IJ-2	28,57 a	0,50 b
IJ-3	31,13 a	0,25 b
IJ-4	27,13 b	0,50 b
IJ-5	24,03 b	0,25 b
IJ-6	26,77 b	2,50 b
IJ-7	24,07 b	0,50 b
IJ-8	29,17 a	12,25 a
<b>A.S.**</b>	<b>0,83</b>	<b>0,97</b>
<b>Média</b>	<b>28,05</b>	<b>2,09</b>

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a', representa o melhor resultado para as variáveis analisadas. \*\*AS= acurácia seletiva, faixas:  $\leq 0,5$  (Baixa);  $0,5 < AS < 0,7$  (Moderada);  $0,7 < AS < 0,9$  (Alta);  $> 0,9$  (Muito Alta).

Na primeira contagem de sementes germinadas, a matriz IJ-8 destacou-se em relação às demais, com 12,25% de germinação na primeira contagem, o que indica que as sementes produzidas nesta árvore, no ano em questão, apresentaram maior vigor. Entretanto, a avaliação da germinação na primeira contagem nem sempre apresenta informações que possam ser relacionadas diretamente ao vigor das sementes (SANTOS; PAULA, 2009). Segundo Marcos Filho (2005), um fator que determina a resposta inicial de germinação das sementes, que também está relacionada proporcionalmente ao vigor, é o acúmulo de reservas que a semente

pode realizar durante o processo de maturação, podendo ser alcançada durante o processo de germinação.

Por outro lado, sementes de *Albizia niopoides* (farinha-seca) e *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca), submetidas 90 e 180 dias de armazenamento, dentro de sacos plásticos impermeáveis em refrigerador, à temperatura de 8 °C, em comparação ao tempo zero – sem armazenamento, apresentaram respostas diferentes. Nesse ensaio, a primeira espécie, aos 90 dias teve a germinação reduzida em, aproximadamente, 50% em relação às sementes não armazenadas, diminuindo para próximo a 1% de germinação aos 180 dias. Já às sementes de pata-de-vaca suportaram o armazenamento até os 180 dias, com médias de germinação próximas a 80% (SCHORN et al., 2010). Igualmente, a germinação das sementes de *Dalbergia nigra* (jacaranda-da-bahia) decresceu com o decorrer do tempo, variando de 87%, no início, a 39% ao final, após 690 dias de armazenamento em refrigerador a  $6\pm 2$  °C (AGUIAR et al., 2010). Tendência semelhante foi observada em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (sibipiruna), quando a capacidade germinativa inicial das sementes armazenadas em refrigerador foi mantida por 360 dias, decrescendo significativamente até 55,6%, aos 640 dias (FIGLIOLIA et al., 2001).

Considerando-se que as sementes utilizadas no presente estudo foram coletadas em diferentes árvores, e, também, a época em que foi realizada essa coleta, pode-se inferir que, provavelmente, fatores relacionados ao clima e solo da região de coleta, assim como a estrutura genética das árvores matrizes influenciaram na fisiologia e sanidade das sementes coletadas, proporcionando variação nas respostas com alguns gêneros de fungos nos dois períodos de avaliação. A viabilidade das sementes de açoita-cavalo é muito variável, podendo ser obtidos decréscimos de até 50% do poder germinativo após 60 dias da coleta, e, pelo contrário, há relatos de 45,5% de germinação de sementes armazenadas por 22 meses e apenas 17% com sementes armazenadas por um mês (CARVALHO, 2008).

### 3.6 Conclusões

A qualidade sanitária e fisiológica das sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. coletadas em oito matrizes diferentes, localizadas no Noroeste do Rio Grande do Sul, apresentam respostas diferenciadas em relação ao período de armazenamento.

Os gêneros fúngicos identificados imediatamente após o beneficiamento das sementes, nem sempre persistem no decorrer do tempo, assim como as sementes podem ser infestadas por novos gêneros fúngicos durante o armazenamento.

A qualidade fisiológica das sementes de açaíta-cavalo pode ser favorecida pelo armazenamento, durante o período de seis meses após a coleta. Assim como presença de microrganismos, principalmente fungos nas sementes, afeta diretamente a germinação.

### 3.7 Referências bibliográficas

AGUIAR, F.F.A. et al. Germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemao ex Benth. (Fabaceae-Papilionoideae) no armazenamento. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, Edição Especial, p. 1624-1629, 2010.

BARBOSA, L.M.; MANTOVANI, W. Degradação ambiental: conceituação e bases para o repovoamento vegetal. In: Recuperação de áreas degradadas da serra do mar e formações florestais litorâneas. **Anais...** São Paulo: SMA, p. 33-40, 2000.

BIERNASKI, F.A.; HIGA, A.R.; SILVA, L.D. Variabilidade genética para caracteres juvenis de progênies de cedrela fissilis vell.: subsídio para definição de zonas de coleta e uso de sementes, **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 36, n. 1, p. 49-58, 2012.

BORGES, K.C.F. et al., Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Luehea divaricata* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1008-1010, 2007.

BORGHETTI, F. Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. 2004. **Germinação do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 109-124.

BOVOLINI, M.P. et al. Qualidade sanitária de sementes da espécie da Família Bignoniaceae em diferentes condições de temperatura. **Trabalho de Pesquisa**, Universidade Federal de Santa Maria. 2011.

BRAGA, L.L. et al. Influência do tempo e das condições de armazenamento na germinação de sementes de espécies florestais. IX Simpósio Nacional do Cerrado. II Simpósio Internacional Savanas Tropicais. **Anais...** 2008.

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

CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C.A.; SIMABUKURO, E.A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. & hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botânica Brasílica**, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.

CARVALHO, P. E. Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular Técnica**, Colombo, PR: 2008.

CHEROBINI, E. A. I.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2008.

CUNNINGHAM, R. A. Provisional tree and shrub seed zones for the great plains. **Great Plains Agricultural Council Publication**, v. 71, p. 1-15, 1975.

DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; Sementes florestais. In: DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. Lavras: Ed. UFLA, 2008, pp. 11 – 82.

DIAS, E.S. et al. **Produção de sementes de espécies florestais nativas: manual**. Campo Grande, MS : Ed. UFMS, 2006, 43 p.

DIAS, K.R.M.; DIAS, L.P.; PASIN, L.A.A.P. Influência do armazenamento na germinação das sementes de *Bixa orellana*. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, **Anais...** – Universidade do Vale do Paraíba. 2010.

FAIAD, M. G. F.; SALOMÃO, A. N.; PADILHA, L. S. Levantamento de população fúngica associada às sementes de *Spondias tuberosa* Anacardiaceae e sua redução através de tratamentos fungicidas. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 248, 1995.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

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

FIGLIOLIA, M.B. et al. Efeito do acondicionamento e do ambiente de armazenamento na conservação de sementes de sibipiruna. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2001.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. [Eds.] **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. – São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p. 3 – 11.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v.1. Nova Odessa: Plantarum. 384p. 2008.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: Fundamento e aplicações**. Brasília: MEC ESAL FAEPE, 1988. 106p.

MACIEL, C.G. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 75, p. 331-338, 2013.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MEDEIROS, A.C.S. et al. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*Astronium urundeava*) (Fr. All) Engl. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 51-55, 1992.

MEDEIROS, A.C.S.; EIRA, M.T.S. Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas, **Circular Técnica** 127, Colombo, PR, p. 1-13, 2006.

MELO, P.R.B.; **Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de ipê-verde (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.)**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Tese de Doutorado. Jaboticabal – São Paulo, BR. 2009

MENDES, S. S.; MESQUITA, J. B.; MARINO, R. H. Qualidade sanitária de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit armazenadas em câmara fria. **Natural Resources**, Aquidabã, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2011.

MIETH, A.T. et al. Influência de extrato vegetal na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de *Luehea divaricata* (Açoita-cavalo). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 1240-1242, 2007.

MONDO, V.H.V. et al. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 177-183, 2008.

NEEGARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, v. 2, p. 839, 1997.

PEREZ, S.C.J.G.A.; FANTI, S.C.; CASALI, C.A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula (*Peltophorum dubim* (Spreng) Taubert). **Bragantia**, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; VIEIRA, J. D. Teste de germinação. In: PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.. **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas, Fundação Cargill, 1988. p. 70-86.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; JESUS, R.M. Comportamento das sementes de cedro-rosa (*Cedrela angustifolia* S. Et. Moc) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 31-36, 1992.

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

RESENDE, M.D.V.; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 3, p. 182-194, 2007.

RUIZ FILHO, R. R.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; FILHO, D. S. J. Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.4, p. 494-496, 2004.

SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A.C.S.; SANTANA, D.L.Q. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. Colombo, **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n. 42, p. 51-60, 2001.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs., **Scientia Forestalis**., Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 007-016, 2009.

SCALON, S.P.Q. et al. Armazenamento e tratamentos pré-germinativos em sementes de jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia* Mart.). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 2, p. 179-185, 2006.

SCHORN, L.A.; SILVA, R.G.X.; MAGRO, B.A. Secagem e armazenamento de sementes de *Albizia niopoides* Benth. e *Bauhinia forficata* Link. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 225-231, 2010.

SILVA, L. C. 2004. **Avaliação do potencial para armazenamento de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. - Tiliaceae)**. 28f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal De Pelotas, Pelotas, RS, 2004.

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

ZAIDAN, L.B.P.; BARBEDO, C.J. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. 2004. **Germinação: do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 135-148

## 4 CAPITULO II

### O EFEITO DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CITOCININA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

#### 4.1 Resumo

A produção de mudas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc (açoita-cavalo), pela via seminal tem sido limitada pela reduzida disponibilidade de sementes com adequada qualidade física, fisiológica, genética e sanitária. Estudos relacionados à propagação vegetativa de açoita-cavalo, usando diferentes técnicas, apontaram que a espécie apresenta potencialidade de multiplicação por meio de métodos alternativos à via sementes. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta de culturas iniciadas a partir de epicótilos de açoita-cavalo, aos estímulos de diferentes fontes e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro*. Foram utilizados epicótilos contendo uma ou duas gemas axilares, em que os tratamentos consistiram de 0; 5; 10 ou 15µM das fontes de citocinina: 2-Isopenteniladenina (2iP), 6-Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN) e Thidiazuron (TDZ), acrescidos ao meio nutritivo MS, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. Aos 45 dias de cultivo, foi verificada interação entre as fontes e concentrações de citocinina usadas, afetando a porcentagem de estabelecimento *in vitro* (86,2%), número de gemas (6,82), número de ápices caulinares (2,48), número de folhas (8,5), enquanto a porcentagem de formação de calos foi influenciada pelas concentrações das citocininas (48%). Conclui-se que na multiplicação *in vitro* de culturas iniciadas a partir de epicótilos de açoita-cavalo, é dispensável o uso das citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), 2-Isopenteniladenina (2iP), Cinetina (CIN) e Thidiazuron (TDZ). Na ausência das citocininas no meio nutritivo MS observa-se melhores respostas em relação à sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, número de gemas e número de folhas formadas e, BAP, 2ip, CIN e TDZ, nas concentrações entre 5 a 15µM, promovem a formação de calos.

**Palavras-chave:** fitorreguladores, 6-benzilaminopurina, TDZ.

## EFFECT OF DIFFERENT SOURCES AND CONCENTRATIONS CYTOKININ *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

### 4.2 Abstract

Seminal *Luehea divaricata* Mart. & Zucc seedling production has been limited by the low availability of seeds with appropriate physical, physiological, genetic and health attributes. Studies regarding the vegetative propagation of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc showed that the species has a potential multiplication through methods alternative to seeds. The aim of this study was to evaluate the response of cultures initiated from *Luehea divaricata* Mart. & Zucc epicotyl, to stimuli from different sources and concentrations of cytokinin in vitro multiplication. Epicotyls containing one or two axillary buds were used, in which treatments were 0, 5, 10 or 15 $\mu$ M of cytokine: 2-isopentenyladenine (2iP), 6-benzylaminopurine (BA), Kinetin (KIN) and Thidiazuron (TDZ) sources added to the nutrient broth medium, distributed in a completely randomized design with eight replications. At 45 days of culture, there was an interaction between the sources and the cytokinin concentrations used, affecting the percentage of in vitro establishment (86.2%), number of buds (6.82), number of shoots (2.48), number of leaves (8.5), while the percentage of callus formation was influenced by the concentrations of cytokinins (48%). It was concluded that the in vitro multiplication of cultures initiated from epicotyls of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, the use of cytokinins 6-benzylaminopurine (BAP), 2-isopentenyladenine (2iP), Kinetin (KIN) and Thidiazuron (TDZ) is dispensable. In the absence of cytokinins nutrient broth medium, better responses were observed in relation to in vitro survival and establishment, bud number and number of leaves formed and BAP, 2ip, KIN and TDZ at concentrations between 5 and 15 $\mu$ M, promote callus formation.

**Keywords:** growth regulators, 6-benzylaminopurine, TDZ.

### 4.3 Introdução

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc. é uma espécie da família Malvaceae, conhecida popularmente como açoita-cavalo (SOBRAL et al, 2006, CARVALHO, 2008) e identificada como espécie sucessional pioneira em algumas regiões do Rio Grande do Sul (CHAMI et al., 2011; AVILA et al., 2011). Essa espécie assumiu destacada importância ao longo da história e do desenvolvimento da indústria madeireira no sul do Brasil, uma vez que sua exploração extrativista descontrolada acarretou em uma drástica redução dos exemplares com boas características para o uso comercial, tornando necessária a pesquisa de sistemas eficientes de produção de mudas (REITZ et al., 1988; FARIAS, 2006).

A produção de mudas via seminal tem sido limitada pela reduzida disponibilidade de sementes de adequada qualidade física, fisiológica, genética e sanitária de açoita-cavalo. Adicionalmente, estudos envolvendo a recuperação de áreas de mata ciliar (AVILA et al., 2011) e mecanismos de regeneração natural em remanescentes de floresta (SCCOTI et al., 2011; CHAMI et al., 2011), demonstraram que a presença da espécie no banco de sementes do solo e no banco de plântulas não garante o estabelecimento de uma regeneração natural da espécie.

Nesse sentido, estudos relacionados à propagação vegetativa de açoita-cavalo (NAZÁRIO et al., 2007; PACHECO; FRANCO, 2008; FLÔRES et al., 2011a), usando diferentes técnicas, apontaram que a espécie apresenta potencialidade de multiplicação por meio de métodos alternativos ao método convencional, via sementes. Esses resultados, registrados na literatura científica, atenuam, minimamente, o desfavorável cenário atualmente vigente no Brasil, de carência de mudas de espécies florestais autóctones para projetos ambientais.

Técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação, permitem a multiplicação em grande escala, em reduzidos espaços físicos, a partir de quantidades mínimas de tecido vegetal, independentemente de fatores climáticos. Em decorrência disso, vêm sendo desenvolvidos inúmeros trabalhos com espécies florestais, com o intuito de tornar essa tecnologia acessível e economicamente viável (XAVIER et al., 2009).

Nesse viés, nosso Grupo de Pesquisa, intitulado Desenvolvimento de Germoplasma, vem avaliando o desempenho, na cultura de tecidos, de algumas

espécies florestais, integrantes dos biomas Mata Atlântica e Pampa no estado do Rio Grande do Sul, tendo como meta desenvolver metodologias eficientes para a produção de mudas e conservação *in vitro* de germoplasma. Até o momento, os maiores avanços têm sido atingidos com as espécies *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (BASSAN et al., 2006; FLÔRES et al., 2011b, CURTI; REINIGER, 2014) e *Eugenia involucrata* DC. (GOLLE et al., 2012). Porém outras espécies florestais vêm sendo, também, investigadas, como é o caso de *Mimosa scabrella* Bentham (ROSA et al., 2012) e *Luehea divaricata* Mart & Zucc. (FLÔRES et al., 2011a), sendo a multiplicação *in vitro* da última objeto de estudo no presente artigo.

A multiplicação *in vitro* tem como finalidade a proliferação dos explantes oriundos da fase de estabelecimento (DUTRA et al., 2009). Nesta fase, aos meios nutritivos utilizados rotineiramente, podem ser acrescentados reguladores de crescimento da classe das auxinas e/ou citocininas com a finalidade de estimular a propagação. As citocininas promovem a divisão celular e a superação da dominância apical, permitindo a proliferação de gemas axilares (ERIG et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007), sendo 6-Benzilaminopurina (BAP) uma das mais utilizadas, em concentrações que variam de 0,8 a 800µM. Na literatura científica há relatos de estudos de multiplicação *in vitro* de espécies como *Eucalyptus grandis* (ANDRADE et al., 2006), *Tectona grandis* L.f. (FERMINO JUNIOR et al., 2009), *Hancornia speciosa* Gomes (SOARES et al., 2011), *Caesalpinia echinata* Lam. (ARAGÃO et al., 2011), *Amburana acreana* (Ducke) (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012), entre outros.

Outras citocininas, além de BAP, também são utilizadas, na multiplicação *in vitro*, tais como Cinetina (CIN), 2-Isopenteniladenina (2iP), as quais são consideradas, entretanto, menos eficientes que a primeira (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Thidiazuron (TDZ), um composto sintético do grupo das feniluréias, que, inicialmente, foi classificado no grupo das auxinas, mas com uma posição ambígua, podendo também atuar como citocinina (BARRUETO CID, 2010), vem sendo igualmente avaliado.

Considerado o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta de culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., isolados de plântulas obtidas via germinação *in vitro*, aos estímulos de diferentes fontes e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro*.

#### 4.4 Material e métodos

Neste estudo, foram utilizados, como explantes, epicótilos contendo uma ou duas gemas axilares, com aproximadamente 10mm de comprimento, isolados de plântulas germinadas em condições assépticas com 45 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). A seguir, os explantes foram inoculados, em câmara de fluxo laminar, nos frascos contendo os tratamentos respectivos, conforme será descrito posteriormente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4 x 4, em que os níveis do fator “A” referiram-se à fonte de citocinina e os níveis do fator “B”, às concentrações utilizadas. Os tratamentos consistiram de 0; 5; 10 ou 15 $\mu$ M das seguintes fontes de citocinina: 2-Isopenteniladenina (2iP), 6-Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN) e Thidiazuron (TDZ). A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes cada, sendo utilizadas oito repetições por tratamento.

O meio nutritivo empregado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 0,7% (p/v) de ágar e 0,01% (p/v) de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121 °C e 1atm, por 15min. Após a inoculação dos explantes, os frascos vedados com papel alumínio foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16h, intensidade luminosa de 20  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia, e temperatura de 25 $\pm$ 3 °C.

As avaliações foram realizadas após 45 dias de cultivo, sendo analisadas as variáveis: porcentagem de sobrevivência e de estabelecimento *in vitro*, número de gemas, número de ápices caulinares, número de folhas e porcentagem de formação de calos. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante e o estabelecimento, pela formação de novas gemas ou folhas.

#### 4.4.1 Análise estatística dos dados

Na análise dos dados, foram, inicialmente, verificados os pressupostos do modelo matemático, e, quando necessário, os dados foram transformados pela função  $\sqrt{x+1}$ . Na sequência, foram realizadas as análises de variância, e quando o valor de F foi significativo, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o Índice de Variação (IV), calculado por  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

## 4.5 Resultados e discussão

Em relação à sobrevivência *in vitro* dos explantes, não foram observados efeitos significativos dos fatores concentração de citocinina ( $p= 0,8811$ ), fonte de citocinina ( $p= 0,3477$ ) e, tampouco, da interação entre ambos os fatores ( $p= 0,7374$ ). Porém, foi observada uma média geral elevada, de 98,43% (IV= 2,59%) de sobrevivência, o que demonstra que a suplementação dessa classe de reguladores não é necessária para manter os explantes de açoita-cavalo vivos.

Para o estabelecimento *in vitro* houve efeito significativo dos fatores fonte de citocinina ( $p= 0,0000$ ), concentração de citocinina ( $p= 0,0000$ ) e da interação entre os dois ( $p= 0,0000$ ) (IV= 5,14%). Na análise desta variável foi desdobrada a interação, verificando-se o fator quantitativo para cada nível do fator qualitativo. Equações polinomiais de segundo grau foram ajustadas para concentrações de CIN e TDZ, enquanto aquelas relacionados a 2iP e BAP ajustaram-se a equações lineares (Figura 1).

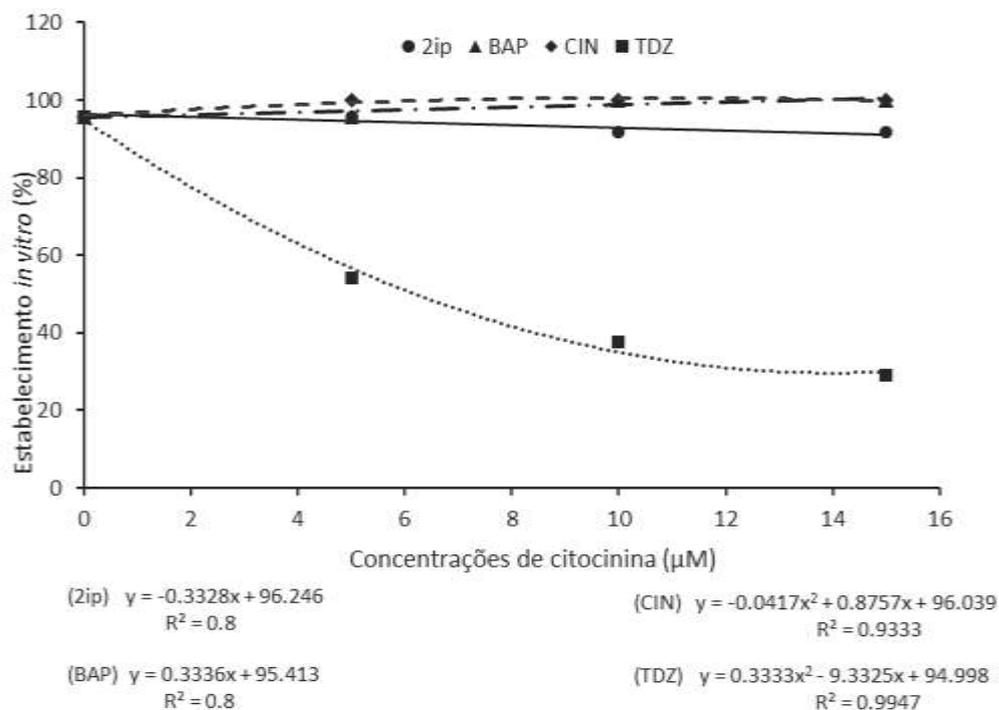


Figura 1. Porcentagem média de estabelecimento *in vitro* de culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocininas, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Na ausência de citocinina, independentemente da fonte, os explantes apresentaram resposta semelhante, alcançando mais de 95% de estabelecimento *in vitro*. No entanto, na presença de citocininas, o estabelecimento foi diferenciado; enquanto com TDZ os aumentos na concentração afetaram negativamente o estabelecimento *in vitro* dos explantes, cuja média diminuiu de 54% a 5 $\mu$ M para 29% na concentração 15 $\mu$ M deste fitorregulador, e, na presença das demais citocininas avaliadas (BAP, CIN e 2iP), as médias mantiveram-se entre 90 e 100%. Portanto, apesar de ter sido observado efeito significativo da interação entre os dois fatores avaliados, a retomada do crescimento de explantes juvenis, como os epicótilos, em açoita-cavalo, cultivados em meio nutritivo MS, assim como a sua sobrevivência, prescinde da presença de citocininas. Além da juvenilidade do explante empregado, provavelmente o conteúdo endógeno de hormônios influenciou sobre o balanço hormonal no explante, uma vez que é comum quando se utilizam citocininas, ou auxinas, sintéticas que o balanço hormonal seja alterado, principalmente com TDZ, que possui uma estrutura diferente das demais citocininas (PERES et al., 1999, PERES, 2002).

De maneira semelhante, em outro estudo com *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), no qual foram empregados, como explantes, segmentos nodais cultivados em meio nutritivo WPM, tanto a sobrevivência quanto o estabelecimento *in vitro* não foram afetados de maneira significativa pelos tratamentos (concentrações mais elevadas de BAP, que variaram entre 0,0 e 66 $\mu$ M), sendo observada, uma média geral de 80,85% para ambas as variáveis (FLÔRES et al., 2011a). Estas médias, inferiores àquelas observadas no presente estudo, podem ser decorrentes do emprego de um explante dotado de maior juvenilidade, e conseqüente maior competência organogênica (PERES, 2002), cultivado em um meio nutritivo mais rico em sais. Em relação à composição do meio nutritivo, a concentração de nitrogênio (N), em forma de amônio no meio MS, utilizado no presente experimento, é quatro vezes maior que no meio WPM, utilizado por Flôres et al. (2011a), uma vez que o efeito desse componente sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos é marcante (CALDAS et al., 1998; KANASHIRO et al., 2007).

Para o número de gemas formadas houve efeito significativo dos fatores fonte de citocinina ( $p= 0,0000$ ), concentração de citocinina ( $p= 0,0000$ ) e a interação entre ambos os fatores ( $p= 0,0000$ ) (IV= 15,91%). Equações polinomiais de segundo grau

foram ajustadas para concentrações de BAP, CIN, TDZ, enquanto àquelas de 2iP ajustaram-se a uma equação linear (Figura 2).

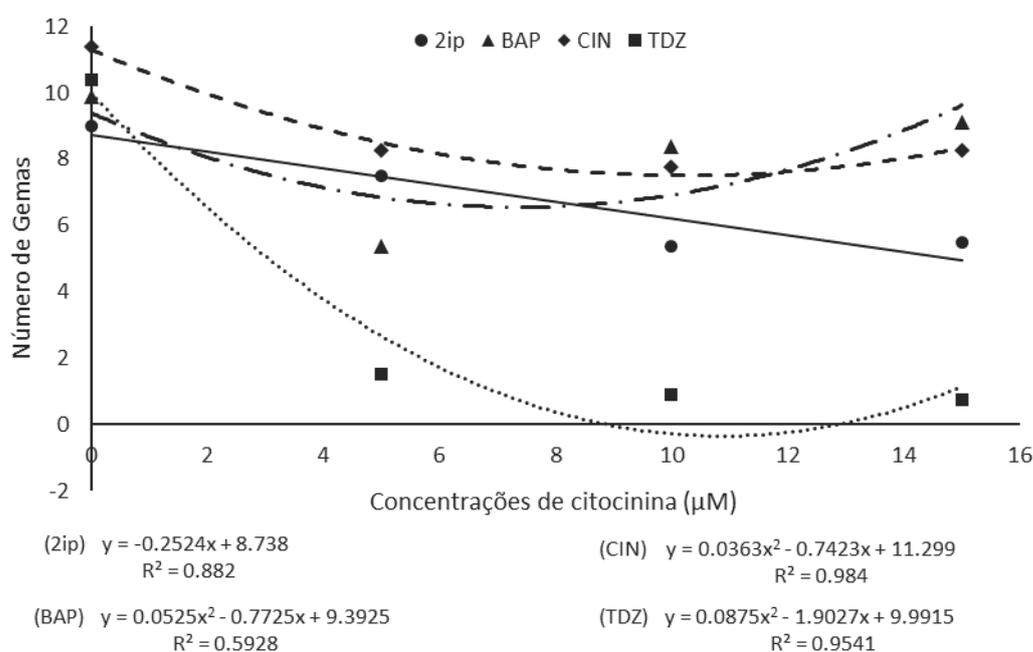


Figura 2. Número médio de gemas formadas em culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocinina, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Observou-se, a exemplo do que foi relatado para as variáveis anteriormente apresentadas, que, na presença de citocinina, especialmente nas concentrações mais baixas em relação a BAP e CIN, a formação de gemas nos explantes foi inferior àquela verificada nos respectivos tratamentos controle (sem citocinina). Por outro lado, com o aumento nas concentrações de 2iP e TDZ, a redução no número de gemas foi mais expressiva, principalmente com a última citocinina, que evidenciou melhor essa reação negativa das culturas. Na ausência de qualquer uma dessas citocininas, a formação de gemas variou entre 9 e 10,38 por frasco. No entanto, quando o cultivo foi realizado na presença de 5μM de 2iP ou TDZ, esses valores diminuíram entre 1,2 e 6,9 vezes respectivamente.

Deve-se destacar, contudo, em particular, o efeito detrimental de TDZ, cuja concentração a 15μM reduziu em 13,8 vezes àquela média alcançada no tratamento

controle. Esse resultado reforça àquele relatado anteriormente sobre o efeito de TDZ no estabelecimento *in vitro*. Ainda, as concentrações de TDZ empregadas no presente ensaio, podem ser consideradas muito elevadas para os explantes inoculados no meio nutritivo, de maneira análoga ao que aconteceu quando concentrações de TDZ superior a  $\sim 2\mu\text{M}$ , reduziram a capacidade organogênica em gemas apicais de *Ricinus communis* L. (mamoneira) cultivado em meio MS (RIBEIRO et al., 2010). Da mesma maneira, em outro estudo, segmentos nodais de açoita-cavalo cultivados em meio nutritivo WPM contendo BAP (0,0 –  $66\mu\text{M}$ ) desenvolveram menor número de nós - que correspondem ao local de inserção das gemas - na presença das concentrações mais elevadas da citocinina (FLÔRES et al., 2011a). Essas diferenças nas respostas dos explantes, são reforçadas quando se considera que nos vegetais não existem órgãos especializados para biossínteses hormonal, embora cada órgão possa apresentar certas diferenças na capacidade biossintética (PERES et al., 1997).

Por outro lado, respostas diferentes foram observadas em segmentos caulinares de *Rubus idaeus* L. (amoreira-preta), cultivados por quatro semanas em meio nutritivo MS (ERIG et al., 2002), e segmentos caulinares de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), cultivados por 45 dias em meio WPM (SOUZA et al., 2008). Nesses casos, com a elevação das concentrações de BAP (0,0 a  $10\mu\text{M}$ ), em amoreira-preta, e das citocininas BAP, 2iP e Zeatina (ZEA) (0,0 a  $10\mu\text{M}$ ), em pitangueira, o número de gemas formadas em ambas as espécies sofreram acréscimos, assim como em *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira), quando ápices caulinares cultivados em meio WPM, acrescido de, aproximadamente,  $8\mu\text{M}$  das citocininas BAP, CIN e TDZ, o número de gemas formadas, no cultivo em meio nutritivo suplementado com BAP, foi superior em comparação àquele observado na presença das demais citocininas (SOARES et al., 2011).

No clone de um híbrido entre *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus tereticornis*, gemas cultivado em meio nutritivo Gonçalves (1980) modificado, suplementado com 0; 0,001; 0,01; 0,1 ou  $1,0\text{ mg L}^{-1}$  ( $\approx 0,005$  a  $5\mu\text{M}$ ) de TDZ, foi observado que a concentração mais adequada para a multiplicação de gemas foi  $0,01\text{ mg L}^{-1}$  da citocinina, enquanto as duas maiores concentrações testadas apresentaram efeito inibitório sobre a multiplicação de gemas, ocorrendo formação de calos, hiperhidricidade e caule espesso e avermelhado (LIMA; GONÇALVES, 1998).

As médias de número de nós formados em segmentos nodais de *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. (kiri), cultivados em meio MS acrescido de concentrações de BAP (a 4 $\mu$ M combinado a 1,35 ou 2,7 $\mu$ M de AIB, e a 8 $\mu$ M, isolado ou combinado com as mesmas concentrações de AIB), diferiram significativamente somente quando foram adicionados 8 $\mu$ M da citocinina. O número de nós foi superior somente na combinação das concentrações mais baixas dos fitoreguladores (4 $\mu$ M BAP + 1,35 $\mu$ M AIB), enquanto as concentrações mais altas (isolado ou combinado), produziram entre 0,0 e 0,95 nós por explante (BAHRI; BETTAIEB, 2013).

Ao contrário do que foi afirmado por Ribeiro et al. (2010), as respostas observadas no presente ensaio demonstraram que o efeito das citocininas sobre a proliferação de explantes cultivados *in vitro* não é controlado somente pelo tipo de regulador de crescimento e por suas concentrações. Também é necessário admitir a dependência de outros elementos que podem estar ligados a fatores tais como: espécie de planta e sua estrutura genética, tipo de explante e composição base do meio nutritivo, entre outros.

Para o número de ápices caulinares formados houve efeito significativo dos fatores fonte de citocinina ( $p= 0,0000$ ), concentração de citocinina ( $p= 0,0000$ ) e da interação entre ambos ( $p= 0,0000$ ) ( $IV= 8,71$ ). Neste caso, as equações ajustadas foram de segundo grau para as concentrações de TDZ e 2iP, e de terceiro grau, para as concentrações de BAP. Já, as concentrações de CIN, não se ajustaram a nenhum modelo testado, apresentando a mesma média em todas as concentrações utilizadas (Figura 3).

Ápices caulinares foram formados em menor número na presença de citocininas no meio nutritivo, exceto no caso de BAP, em que na concentração 10 $\mu$ M formou-se a mesma quantidade de ápices que no tratamento controle (três ápices). Por outro lado, utilizando-se 5 ou 15 $\mu$ M, o número médio de ápices caulinares foi menor (2,37 e 2,75 respectivamente). Ao contrário, com o emprego da citocinina 2iP, formou-se o menor número de ápices caulinares (2,5) na concentração 10 $\mu$ M, enquanto nas concentrações 5 e 15  $\mu$ M, desenvolveram-se 2,62 ápices caulinares respectivamente. Apesar disso, essas médias são também inferiores àquelas formadas na ausência de 2iP. Por outro lado, a citocinina TDZ registrou decréscimos na formação de ápices caulinares a partir do aumento nas concentrações no meio nutritivo, em que também originaram-se três ápices na ausência de TDZ, reduzindo-se com sua presença (1,4 a 5 $\mu$ M e 0,75 a 10 ou 15 $\mu$ M) (Figura 3).

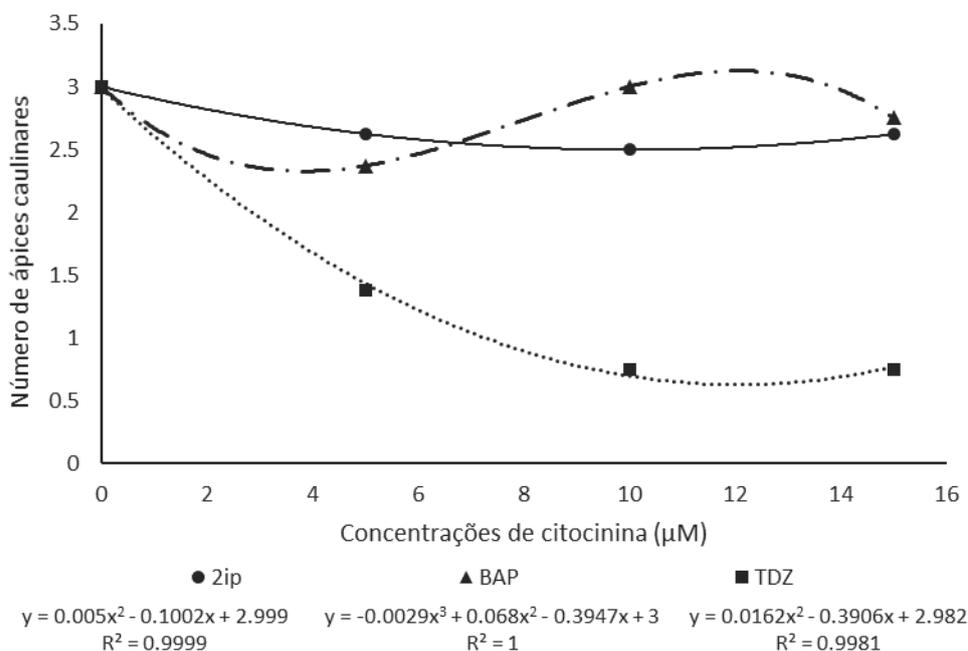


Figura 3. Número médio de ápices caulinares formados em culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocinina, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Em estudo utilizando segmentos nodais de *Gmelina arborea* Roxb. cultivados por 30 dias em meio nutritivo MS acrescido de concentrações entre 0,5 a 10μM de BAP, observou-se que o desenvolvimento de brotos variou, em média, entre 2,5 e 2,2 por explante, nas concentrações 1μM e 4μM da citocinina, respectivamente, registrando leves diminuições a partir do aumento na concentração desse fitorregulador (SUKARTININGSIH et al., 1999). Efeito contrário para o número de brotações foi obtido em segmentos caulinares de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) cultivados por 45 dias em meio WPM, demonstrando uma relação diretamente proporcional ao aumento das concentrações, 0 a 10μM, das citocininas BAP, 2iP e ZEA (SOUZA et al., 2008). Porém, em segmentos nodais de açoita-cavalo, o número de brotações foi superior na ausência de BAP, em comparação às respostas oscilantes na presença desse fitorregulador no meio nutritivo (FLÔRES et al., 2011a).

Segmentos nodais de *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. (kiri), cultivados em meio MS, acrescido de concentrações de 4μM BAP, e combinado com 1,35 ou 2,7μM de AIB, e 8μM de BAP, isolado ou combinado com as mesmas concentrações

de AIB, apresentaram diferenças significativas para a formação de brotos. Os resultados obtidos foram superiores na combinação das concentrações mais baixas dos fitorreguladores, e na presença isolada de BAP, em que se formou menor número de brotos (BAHRI; BETTAIEB, 2013).

No presente ensaio observou-se que, embora o número de ápices tenha aumentado nas concentrações mais altas de 2iP e BAP, não se justifica a utilização dessas citocininas no meio nutritivo, visto que, na sua ausência, a formação de ápices caulinares ocorre igualmente, inclusive superando os valores obtidos com as concentrações testadas. Inclusive, pode-se dizer, com isso, que as concentrações de citocinina atuaram como agentes inibitórios dessa variável.

Para o número de folhas formadas ocorreu efeito significativo dos fatores fonte de citocinina ( $p= 0,0000$ ), concentração de citocinina ( $p= 0,0000$ ) e da interação entre ambos os fatores ( $p= 0,0000$ ) (IV= 13,87%). As concentrações de BAP, CIN e TDZ foram ajustadas por equações polinomiais de segundo grau, enquanto para as concentrações de 2iP ajustou-se uma equação linear (Figura 4).

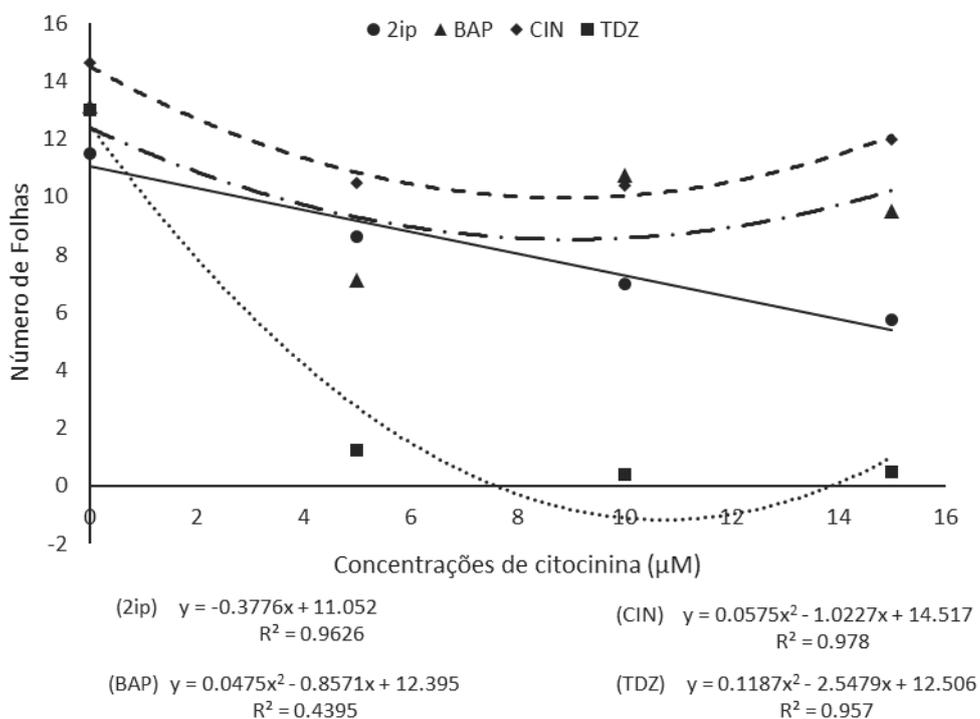


Figura 4. Número médio de folhas formadas em culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS acrescido de diferentes fontes e concentrações de citocinina, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Assim, para o número de folhas formadas puderam ser observadas diferenças inclusive entre os tratamentos controle, refletidas por médias distintas, de acordo com cada fonte de citocinina testada. Apesar disto, este desempenho não pode ser atribuído ao efeito dos tratamentos, visto que, nesses não foram adicionados fitorreguladores, o que sugere que os resultados sejam decorrentes de fatores intrínsecos do próprio explante. No entanto, ao utilizar-se citocinina no meio nutritivo, tanto BAP, como CIN, em concentrações superiores a valores calculados pela MET ( $9\mu\text{M}$  e  $8,9\mu\text{M}$  respectivamente), o número de folhas registrou aumentos, embora, não superando aqueles obtidos na ausência desses fitorreguladores.

Enquanto isso, as demais citocininas utilizadas (2iP e TDZ), não favoreceram a formação de folhas, que foi mais intensamente prejudicada pelos aumentos nas concentrações de TDZ. Os valores obtidos com a sua utilização foram visivelmente inferiores aos alcançados com o aumento de 2iP no meio nutritivo, sendo que essa diferença entre ambas as citocininas, para as mesmas concentrações, variou de 6,9 até 18 vezes nos tratamentos com TDZ comparados aos tratamentos utilizando 2iP. Resultados semelhantes foram encontrados em *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira), quando ápices caulinares cultivados em meio WPM acrescido de, aproximadamente,  $8\mu\text{M}$  das citocininas BAP, CIN e TDZ, os dois primeiros promoveram maior formação de folhas que TDZ (SOARES et al., 2011).

Em outro experimento com açoita-cavalo, o número de folhas formadas em segmentos nodais, cultivados em meio WPM, na presença de concentrações de BAP variando de 0,0 a  $66\mu\text{M}$ , também apresentou ajuste a uma curva quadrática. Neste caso, a formação de folhas foi inibida em decorrência do aumento na concentração dessa citocinina, após 35 dias de cultivo *in vitro* (FLÔRES et al., 2011a).

A formação de calos foi influenciada significativamente apenas pela concentração de citocinina ( $p= 0,0000$ ), mas não foi afetada pela fonte do fitorregulador ( $p= 0,0982$ ), nem, tampouco, pela interação entre ambos os fatores ( $p= 0,1287$ ) (IV= 19,33%). Nesse caso, a equação ajustada para concentrações de citocinina foi uma polinomial de segundo grau (Figura 5).

A formação de calos variou entre 13 e 62% para as diferentes concentrações de citocininas utilizadas no presente experimento. As concentrações intermediárias ( $5$  e  $10\mu\text{M}$ ) foram as que favoreceram a maior formação destas estruturas, sendo

que 11,3 $\mu$ M seria a concentração com a qual seriam observadas mais formações de calo, de acordo com o cálculo da MET.

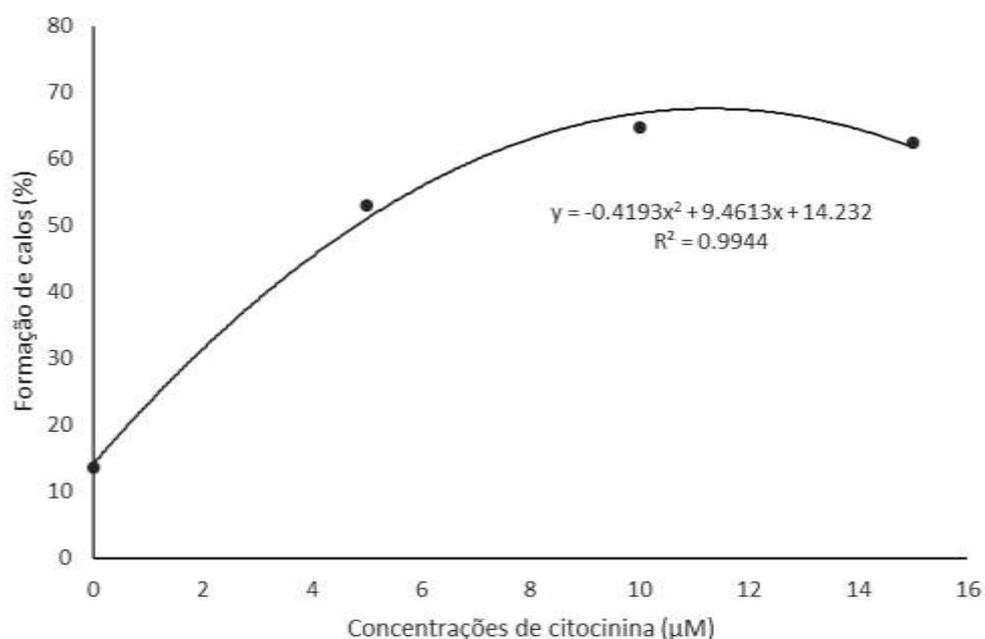


Figura 5. Porcentagem média de calos formados em culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo MS, acrescido de diferentes concentrações de citocinina, independentemente da fonte (BAP, CIN, 2iP e TDZ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Brotos de *Gmelina arborea* Roxb., cultivados por 30 dias em meio nutritivo MS, acrescidos de concentrações entre 0,5 a 8 $\mu$ M de BAP, desenvolveram elevada formação de calos compactos em detrimento da formação de brotos. Isto foi intensificado quando os explantes foram submetidos a meios nutritivos com idênticas concentrações de BAP em combinação a TDZ (0,5 a 10 $\mu$ M) (SUKARTININGSIH et al., 1999). Aumentos na concentração de BAP (2,5; 3,5 ou 4,5 $\mu$ M) também promoveram aumentos na formação de calos em explantes de segmentos nodais de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), cultivados por 40 dias em meio nutritivo MS (ARAGÃO et al., 2011).

No mesmo sentido, segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (ginseng brasileiro), cultivados em meio MS, com adição de TDZ (0,2 a 1 $\mu$ M), formaram calos na base dos explantes, após 30 dias de cultivo *in vitro* (FLORES et

al., 2007). Efeito contrário foi obtido quando foram adicionados TDZ e BAP ao meio nutritivo MS, em *Byrsonima intermedia* A. Juss. (murici-pequeno), em que o acréscimo dessas citocininas não favoreceu a formação de calos em explantes foliares cultivados por 30 dias (NOGUEIRA et al., 2007).

A formação de calos nos explantes não pode ser atribuída especificamente a uma citocinina, uma vez que, não foram evidenciadas diferenças para esse fator. No entanto, é sabido que o TDZ também pode agir como uma auxina, apresentando maior atividade biológica, em comparação às outras fontes de citocinina avaliadas no presente ensaio. Isto possivelmente se deva ao incremento da atividade da enzima fosfatase ácida, responsável pela interconversão nucleotídeo-nucleosídeo da estrutura de citocininas endógenas, tornando-as biologicamente ativas, ainda que esta citocinina possa atuar como inibidor do crescimento, se utilizada em elevadas concentrações (BARRUETO CID, 2005; RIBEIRO et al., 2010).

Contudo, analisando as respostas das diferentes variáveis-resposta em relação às diferentes fontes e concentrações de citocinina, pode-se inferir que a baixa reatividade dos explantes aos estímulos do TDZ, deva-se a maior eficiência que os tecidos vegetais possuem em sintetizar os hormônios naturais, em comparação aos reguladores de crescimento sintéticos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), considerando que as demais citocininas (BAP, 2iP e CIN), também se encontram em forma natural nos tecidos.

Também se deve levar em conta o próprio metabolismo das citocininas, uma vez que muitos tecidos possuem, naturalmente, a enzima citocinina oxidase, a qual pode desativar, irreversivelmente, as citocininas. Provavelmente disto decorram influências na regulação ou na limitação dos efeitos desses fitoreguladores, sendo a atividade da referida enzima induzida por concentrações altas de citocinina (TAIZ; ZEIGER, 2009).

## 4.6 Conclusões

Na multiplicação *in vitro* de culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., é dispensável o uso das citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), 2-Isopenteniladenina (2iP), Cinetina (CIN) e Thidiazuron (TDZ).

Na ausência das citocininas no meio nutritivo MS, culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. apresentam melhores respostas em relação às variáveis sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, número de gemas e número de folhas formadas.

As citocininas BAP, 2ip, CIN e TDZ, adicionadas ao meio nutritivo MS, nas concentrações avaliadas (5 a 15 $\mu$ M), promovem a formação de calos em culturas iniciadas a partir de epicótilos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., o que é indesejável nessa fase.

#### 4.7 Referências bibliográficas

ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

ARAGÃO, A.K.O.; ALOUFA, M.A.I.; COSTA, I.A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, UFLA, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.

AVILA, A.L. et al. Caracterização da vegetação e espécies para recuperação de mata ciliar, Ijuí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 251-260, 2011.

BAHRI, N.B.; BETTAIEB, T. *In vitro* propagation of a forest tree *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. - A valuable medicinal tree species. **Albanian Journal of Agricultural Sciences**, v. 12, n.1, p. 37 – 42, 2013.

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188p.

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 303p.

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

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

CARVALHO, P.E.R. Açoita-Cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular Técnica 147**. Colombo, PR, Outubro, 2008.

CHAMI, L.B. et al. Mecanismos de regeneração natural em diferentes ambientes de remanescente de Floresta Ombrófila Mista, São Francisco de Paula, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 251-259, 2011.

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

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

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

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

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; NAGAO, E.O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith-Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, UFLA, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLÔRES, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011a.

FLÔRES, A.V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) em função das concentrações do meio MS. **Cerne**, UFLA, v. 17, p. 549-553, 2011b.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2007.

GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, p. 207-214, 2012.

GONÇALVES, A.N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in cell and tissue culture systems. In: Simpósio IUFRO em melhoramento genético e produtividade de espécies florestais de rápido crescimento, **Anais...** Águas de São Pedro, 1980.

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

KANASHIRO, S. et al. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

LIMA, M.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito do Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, n. 53, p. 49-56, 1998.

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

NAZÁRIO, P.; WENDLING, I.; SOUSA, L.P. Enraizamento de estacas de *Luehea divaricata* sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 54, p. 139-143, 2007.

NOGUEIRA, R.C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

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

PACHECO, J.P.; FRANCO, E.T.H. Ácido indolbutírico em diferentes diâmetros na estaquia de *Luehea divaricata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1624 - 1629, 2008.

PERES, L. E. P. et al. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n. 3, p. 169-176, 1997.

PERES, L. E. P. et al. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into Buds. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 551-555, 1999.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 25, p. 44 – 48, 2002.

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

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

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

ROSA, F. C. et al. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). **Semina Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1021-1026, 2012.

SCCOTI, M.S.V. et al. Mecanismos de regeneração natural em remanescente de floresta estacional decidual. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 459-472, 2011.

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

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

SOUZA, J.A. et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2046-2048, 2008.

SUKARTININGSIH; NAKAMURA, K.; IDE, Y. Clonal propagation of *Gmelina arborea* Roxb. by *in vitro* culture. **Journal Forest Research**, v. 4, p. 47-51, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

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

## 5 CAPITULO III

### EFEITO DE AIB, CARVÃO ATIVADO E MEIOS NUTRITIVOS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE CULTURAS INICIADAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

#### 5.1 Resumo

A propagação vegetativa de espécies lenhosas nativas tem registrado avanços consideráveis na última década, principalmente no que refere-se ao uso de ferramentas biotecnológicas. A espécie nativa *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., comumente conhecida como açoita-cavalo, tem sido alvo de pesquisas, buscando obter mecanismos eficientes de propagação através da via assexuada, que utilizam técnicas de cultura de tecidos vegetais. O presente trabalho visou a obtenção do enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo, utilizando os meios nutritivos MS ou WPM, com a presença ou ausência de carvão ativado, e prévio tratamento “pulse” com concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB), por 15 dias. As concentrações de AIB testadas foram: 0; 3; 6 ou 9 $\mu$ M, na presença ou ausência de carvão ativado nos meios nutritivos MS ou WPM. Nos primeiros 15 dias de cultivo *in vitro*, as concentrações de AIB e a presença ou ausência de carvão ativado no meio nutritivo, exerceram efeitos significativos sobre as variáveis. Após 30 dias, em meio nutritivo sem AIB, as variáveis sobrevivência, formação de raízes e número de brotos, foram influenciadas pela interação tripla dos fatores, enquanto estabelecimento, formação de calos, clorose foliar, oxidação fenólica e número de folhas, sofreram influência pela ação de um, ou a interação de dois fatores. O tratamento “pulse” com AIB a partir de 9 $\mu$ M, pode favorecer o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata*, toda vez que seja inoculada em meio nutritivo WPM na ausência de carvão ativado.

**Palavras-chave:** auxina, cultura de tecidos, micropropagação

**EFFECT OF IBA, ACTIVATED CHARCOAL AND NUTRITIONAL MEDIUM IN  
ROOTING OF *IN VITRO* CULTURES STARTED FROM NODAL SEGMENTS OF  
*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.**

**5.2 Abstract**

Vegetative propagation of native woody species has registered considerable progress in the last decade, especially regarding the use of biotechnological tools. The native species *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., has been the subject of research, where studies try to achieve efficient asexual reproduction mechanisms, using plant tissue culture techniques. The present study aimed to obtain in vitro rooting of nodal segments of *Luehea divaricata*, using nutrient broth medium or WPM, with or without the presence of activated charcoal, and pretreatment "pulse" with different concentrations of indolebutyric acid (IBA), for 15 days. The IBA concentrations were 0, 3, 6 or 9  $\mu\text{M}$  with or without the presence of activated charcoal in the nutrient broth medium or WPM. In the first 15 days of in vitro culture, IBA concentrations and the presence or absence of activated charcoal in the nutrient medium, exerted significant effects on the variables. After 30 days in nutrient medium without IBA, the survival variables such as rooting and number of buds, were influenced by the triple interaction of factor, and location, callus formation, leaf chlorosis, phenolic oxidation and number of leaves, were influenced by the action of one or the interaction of two factors. The "pulse" treatment with IBA starting at 9 $\mu\text{M}$ , may favor the in vitro rooting of nodal segments of *Luehea divaricata*, every time it is inoculated into nutrient medium WPM in the absence of activated charcoal.

**Keywords:** auxin, tissue culture, micropropagation.

### 5.3 Introdução

A propagação vegetativa de espécies lenhosas nativas tem registrado avanços consideráveis na última década, principalmente no que refere ao uso de ferramentas biotecnológicas. Nesse sentido, a cultura de tecidos é uma das alternativas de propagação assexuada mais explorada, proporcionando a realização de vários trabalhos de pesquisa, que visam à obtenção de protocolos de multiplicação utilizando essas técnicas.

O processo de propagação com o uso de técnicas de cultura de tecidos vegetais apresenta uma série de vantagens, dentre as quais se destacam, principalmente, a manutenção da variância genética total e a obtenção de mudas com alta qualidade fisiológica e sanitária. Contudo, para a sua obtenção, devem ainda ser superadas algumas dificuldades relacionadas ao processo de propagação do material selecionado, sendo o enraizamento *in vitro* uma fase importante para o sucesso da técnica (MILLÁN-OROZCO, 2011), fundamental para garantir mudas de boa qualidade e diminuir as perdas na fase de aclimatização (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

O material utilizado como propágulo na cultura de tecidos, comumente denominado explante, apresenta diferentes características, que são controladas por fatores bióticos e abióticos, e pela própria fonte do explante. O conjunto desses fatores determinará, em grande parte, a resposta dos explantes quando forem submetidos ao processo de enraizamento *in vitro*. Adicionalmente, ao meio nutritivo, em que são inoculados os explantes podem ser adicionados reguladores de crescimento que atuam como promotores do enraizamento. Dentre os rotineiramente utilizados na técnica de cultura de tecidos, tem-se as auxinas, que são compostos importantes que atuam na regulação do crescimento e do desenvolvimento das plantas (KORASICK et al., 2013; LJUNG, 2013, SAUER, 2013). Dentre as auxinas, destacam-se, como promotores do enraizamento *in vitro* de explantes, o Ácido Indolbutírico (AIB), o Ácido Indolacético (AIA), o Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), entre outros, (BARRUETO CID, 2010; KORASICK et al., 2013).

Outro componente, que pode ser adicionado ao meio nutritivo, é o carvão ativado, que tem sido utilizado buscando promover a ampliação do crescimento e desenvolvimento de células *in vitro* (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012), a

embriogênese somática, a produção sintética de sementes e o enraizamento *in vitro* (RIBEIRO et al., 2000; THOMAS, 2008; SCHNEIDERS et al., 2012). Alguns desses benefícios do carvão ativado são atribuídos à presença de uma rede de poros, com grande superfície interna na sua estrutura, em que muitas substâncias inibitórias do meio nutritivo, ou mesmo produtos tóxicos liberados pelos explantes, podem permanecer adsorvidos (CHAGAS et al., 2005; THOMAS, 2008).

A espécie florestal *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., da família Malvaceae (SOBRAL et al., 2006), conhecida comumente como açoita-cavalo, ocorre de forma natural no Brasil desde o norte da Bahia até o Rio Grande do Sul, no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai, e no norte do Uruguai (CARVALHO, 2008). A importância desta espécie deve-se as suas características madeiras, ambientais e medicinais (REITZ et al., 1988; FARIAS, 2006; TANAKA et al., 2005). Apesar disto, suas populações naturais têm sofrido consideráveis perdas em termos de área de ocorrência, praticamente inexistindo regeneração natural estabelecida para esta espécie (SCCOTI et al., 2011).

Essas características fazem do açoita-cavalo uma espécie nativa alvo de pesquisas buscando obter mecanismos eficientes de propagação por meio da via assexuada, mais especificamente, utilizando-se técnicas de cultura de tecidos vegetais. Existem alguns estudos com essa espécie, porém são relacionados apenas ao estabelecimento e à multiplicação *in vitro* (FLÔRES et al., 2011a), o que justifica a importância da realização de ensaios, como o presente, para avaliar o desempenho de açoita-cavalo em diferentes etapas da micropropagação via cultura de tecidos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito, no enraizamento *in vitro* de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., de tratamentos que empregaram, em diferentes combinações, os seguintes elementos: tratamento “pulse” com Ácido Indolbutírico (AIB), carvão ativado e meios nutritivos.

## 5.4 Material e métodos

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados, em esquema trifatorial A x B x C, sendo o primeiro fator referente a concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB), o fator B, à presença ou ausência de carvão ativado (0 ou 1 g L<sup>-1</sup>) no meio nutritivo, e o fator C, à composição de meio nutritivo, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981). O experimento foi realizado de maneira sequencial, sendo composto por três etapas, a seguir descritas.

Foram utilizados números variáveis de repetições, de acordo com a disponibilidade de material vegetal em cada etapa, sendo cada repetição composta por um frasco, com capacidade para 150mL, preenchido com 30mL de meio nutritivo e contendo três explantes do tipo segmentos nodais. Os explantes da etapa inicial foram isolados de plantas multiplicadas *in vitro*, em meio MS, no segundo subcultivo, apresentando 45 dias de idade.

As concentrações do fitorregulador AIB testadas foram: 0; 3; 6 ou 9µM, nas quais os explantes permaneceram por um período de 15 dias, em uma fase denominada tratamento “pulse”. Decorrido esse tempo de cultivo, as culturas foram transferidas para meio nutritivo fresco, de idêntica composição àquela descrita anteriormente, mas na ausência de AIB, permanecendo nesta condição, por 30 dias adicionais. O número de repetições nesta segunda fase do experimento foi de nove por tratamento.

Aos meios nutritivos utilizados nas duas fases do experimento, foram acrescentados 0,7% (p/v) de ágar, 0,01% (p/v) de mio-inositol, 0,1% de carvão ativado, de acordo com o tratamento, tendo sido ajustado o pH para 5,8. Idêntico procedimento usou-se para preparar o meio nutritivo para a segunda etapa do experimento, porém, retirando-se o AIB.

Posteriormente ao preenchimento, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm, por 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura controlada de 25±3 °C, e intensidade luminosa de 20µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Na coleta de dados, efetuada ao final dos primeiros 15 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência, estabelecimento e formação

de calos na base (expressas em porcentagem), e número de folhas por frasco formadas durante esse período. Na avaliação da segunda etapa do experimento, 30 dias após a transferência dos explantes para meios nutritivos sem AIB, foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência, estabelecimento e formação de calos na base, explante com formação de raiz primária e secundária, clorose foliar e oxidação fenólica, todas expressas em porcentagem. Foi contabilizado, ainda, o número de folhas e o número de brotos por frasco. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante e o estabelecimento, pela formação de novas gemas ou folhas. A raiz primária é raiz emitida diretamente do explante, enquanto que a raiz secundária tem sua origem nas raízes primárias.

Na análise estatística dos dados, foram verificados os pressupostos do modelo matemático, e, quando necessário, os dados foram transformados pela função  $\sqrt{x+1}$ . Na sequência, as variáveis foram submetidas à análise de variância, e quando foi obtido valor de F significativo, empregou-se a comparação das médias pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o índice de variação (IV), calculado por  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

## 5.5 Resultados e discussão

### Tratamento “pulse” com AIB adicionado ao meio nutritivo

Decorridos 15 dias de cultivo *in vitro*, para a sobrevivência não foi observado efeito significativo de nenhum dos fatores testados, sendo observada uma média geral elevada, de 92,5%, o IV da variável foi de 3,16%. Por conseguinte, neste período, as concentrações de AIB adicionadas aos dois meios nutritivos não exerceram nenhuma influência sobre a sobrevivência dos explantes. Já o estabelecimento *in vitro* (IV= 11,86%), apresentou efeito significativo do fator AIB ( $p=0,0149$ ), e, também, da sua interação com o carvão ativado no meio nutritivo ( $p=0,0027$ ). No que diz respeito aos demais fatores principais e suas interações, não houve efeito significativo, observando-se uma média geral de, apenas, 61,8% de estabelecimento (Figura 1).

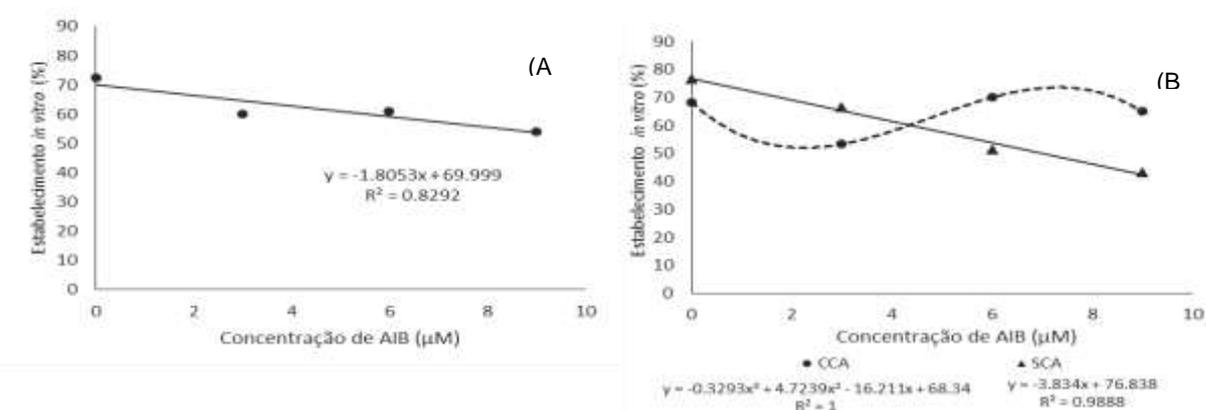


Figura 1. Porcentagem média de estabelecimento de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 15 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) (A) e da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA) ou ausência de carvão ativado (SCA) (B), em ambas independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Considerando-se que a sobrevivência média dos explantes superou o percentual de 90%, e, que, na ausência de AIB, apenas 72% dos explantes inoculados se estabeleceram, houve uma redução nesta variável à medida que a

auxina foi adicionada ao meio nutritivo, obtendo-se um ajuste a uma equação linear (Figura 1A). Cabe considerar, ainda, que esse período de cultivo compreendeu apenas 15 dias, tempo que, provavelmente, não foi suficiente para que os explantes conseguissem formar novas estruturas vegetativas.

Por outro lado, o efeito, no estabelecimento, da adição de carvão ativado ao meio nutritivo, foi bastante variável, em comparação aos tratamentos que não incluíram este componente, tendo sido obtido ajuste satisfatório apenas para modelo polinomial de terceiro grau. A resposta obtida na ausência de carvão ativado foi mais constante, observando-se 77% de estabelecimento na ausência de AIB, para aproximadamente 43% no tratamento que incluiu a maior concentração da auxina (9 $\mu$ M), ajustando-se um modelo linear (Figura 1B).

Os explantes cultivados na presença de carvão ativado estabeleceram-se em proporções bastante instáveis. No tratamento sem adição de AIB, foi observado uma média de, aproximadamente, 68%, assinalando que o carvão ativado não favoreceu o estabelecimento.

Em meio nutritivo sem a presença do carvão ativado, a média de estabelecimento foi levemente superior (77%). Verificando resultados obtidos nos tratamentos quando AIB foi incluído, notou-se que, no meio nutritivo com carvão ativado, o estabelecimento sofreu acréscimo quando foi utilizada as maiores concentrações da auxina (6 e 9 $\mu$ M). Apesar disto, o modelo ajustado indica que essa tendência poderia mudar novamente com o emprego de concentrações maiores de AIB. Neste sentido, cabe mencionar a possível influência negativa do carvão ativado sobre os explantes nessas respostas mais instáveis. Esta consequência pode ter sido viabilizada pelo efeito adsorvente deste componente, passível de surgir ao promover a imobilização de parte dos elementos que compõem o meio, inclusive os fitorreguladores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A formação de calos na base dos explantes, após 15 dias de cultivo *in vitro*, foi afetada significativamente pelo fator presença ou ausência de carvão ativado (CA) no meio nutritivo ( $p=0,0426$ ), resultado que também foi observado para a interação entre CA e AIB ( $p=0,0406$ ). Para os demais fatores isolados, assim como para suas interações, não foram observados efeitos significativos, o IV dessa variável, foi 48,63%, considerado muito alto. Na ausência de CA, a porcentagem de formação de calos (15,83%) foi superior aos tratamentos em que o CA foi adicionado ao meio nutritivo (9,17%). Esta diferença pode ser atribuída ao fato que o CA é um

dos compostos utilizados rotineiramente para inibir a ação de compostos fenólicos, evitando a oxidação assim como, também, a formação de calos nos explantes cultivados *in vitro* (WERNER et al., 2009).

Na interação dos fatores AIB com a presença e ausência de CA no meio nutritivo, o desdobramento das concentrações da auxina dentro de cada nível de CA, ajustou-se a equações polinomiais de segundo grau, em ambos os casos (Figura 2), porém, em sentidos opostos.

Nos meios nutritivos em que o CA foi adicionado, a porcentagem de calos registrou aumentos diretamente proporcionais ao incremento nas concentrações de AIB. Apesar disto, o tratamento em que a auxina não foi adicionada formou maior porcentagem de calos que aquele que com a menor concentração de AIB (3 $\mu$ M), e mesma média que aquela produzida na presença de 6 $\mu$ M da auxina.

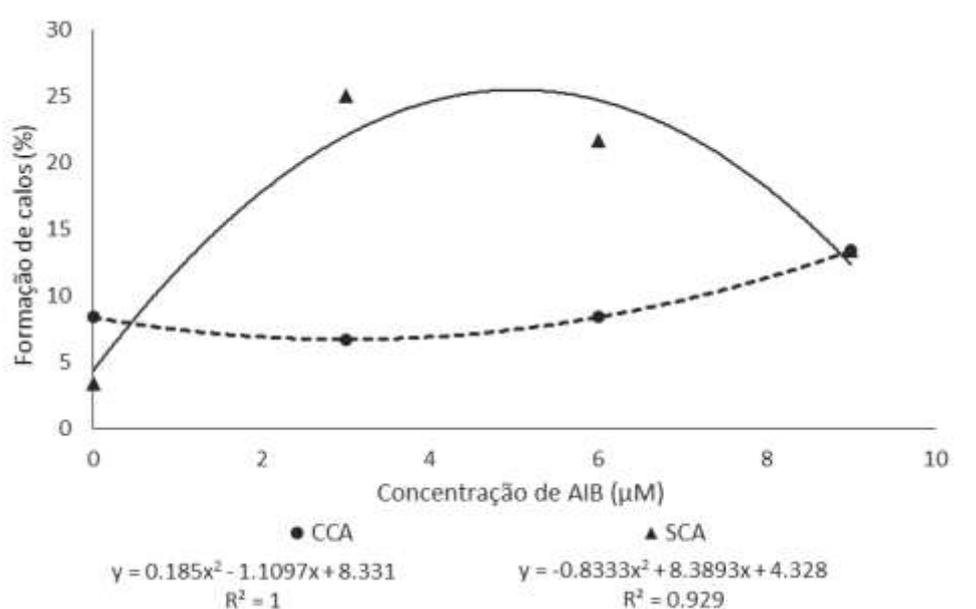


Figura 2. Porcentagem média de formação de calos em segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 15 dias de cultivo *in vitro*, em função da interação entre as diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) e da presença (CCA) ou ausência de carvão ativado (SCA), independentemente do meio nutritivo (MS ou WPM) empregado. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Apenas com o acréscimo de 9 $\mu$ M do fitorregulador houve um aumento mais expressivo na produção de calos, visto que, uma das alternativas comumente utilizadas para contornar o efeito inibitório do CA é o aumento nas concentrações

desta auxina no meio nutritivo (WERNER et al., 2009). Diante disso, pode-se considerar que, em meios nutritivos acrescidos de CA, a presença de AIB em baixas concentrações não exerce influência sobre a formação de calos. No entanto, ao considerar sua incorporação ao meio nutritivo, combinado com AIB, em concentração de  $2,99\mu\text{M}$  (MET da auxina), seria obtida ainda, uma reduzida formação de calos.

Analisando-se a formação de calos, em relação à resposta das concentrações de AIB nos meios nutritivos, em que não ocorreu interferência do CA, o modelo quadrático ajustado demonstra que, aumentando as concentrações do fitorregulador, a formação de calos também se incrementa, registrando decréscimos após  $5\mu\text{M}$  (MET) de AIB no meio nutritivo. Essa resposta vai de encontro àquela obtida nos tratamentos em que o meio nutritivo foi acrescido de CA, corroborando o efeito inibitório desta substância na formação de calos.

A análise da variável número de folhas (IV= 15,79%) evidenciou efeito significativo para o fator isolado AIB ( $p=0,0014$ ), e para a interação deste fator com a presença e ausência de CA no meio nutritivo ( $p=0,0131$ ). Os demais fatores, isolados e as suas interações, não apresentaram efeitos significativas. Para o fator AIB, ajustou-se uma equação linear, enquanto que para a interação, em que foram desdobradas as concentrações de AIB para cada nível de CA utilizado, uma equação polinomial de terceiro grau apresentou o melhor ajuste para o tratamento com a presença de CA no meio nutritivo, e na ausência de CA para o mesmo fator, ajustou-se uma equação linear (Figura 3).

A ausência de AIB no meio nutritivo favoreceu a formação de maior número de folhas (3,23), enquanto que, nos tratamentos em que a auxina esteve presente, a formação de folhas apresentou oscilações. Das 2,38 folhas produzidas a  $3\mu\text{M}$ , ocorreu um leve incremento para 2,55 folhas utilizando-se  $6\mu\text{M}$  de AIB, diminuindo, novamente, para 1,98 folhas a  $9\mu\text{M}$  (Figura 3A).

Essa variação na formação de folhas quando o AIB esteve presente no meio nutritivo, possivelmente, reflete o conhecido efeito de formação de raízes promovido pelas auxinas (SAUER et al., 2013). Apesar disto, dependendo do conteúdo endógeno de hormônios do próprio explante, pode haver interação, sendo promovidas respostas como as observadas neste experimento, ou seja, formação de estruturas foliares.

Na interação das concentrações de AIB com CA, na presença desta substância, registrou-se o maior número de folhas (3,1) ao utilizar-se a concentração 6 $\mu$ M de AIB. Entretanto, na ausência do fitorregulador formaram-se 2,95 folhas, enquanto que, nas demais concentrações (3 e 9 $\mu$ M), foram formadas 2,2 e 2,45 folhas respectivamente (Figura 3B). Apesar disso, a presença de CA no meio nutritivo não pode ser considerada como um agente que favorece a formação de novos órgãos nos explantes, uma vez que seus efeitos, quando incorporado ao meio nutritivo, ainda precisam ser melhor esclarecidos (COSTA et al., 2006). Outra justificativa para a resposta observada é a possível existência de outros fatores que interfiram durante o desenvolvimento das plantas, e que não puderam ser observadas nas condições em que foi desenvolvido o presente experimento.

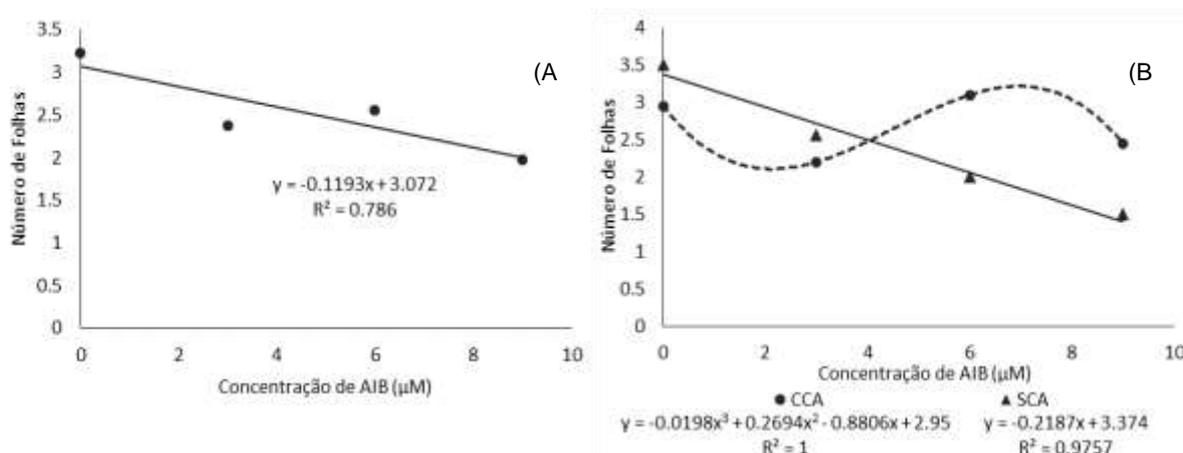


Figura 3. Número médio de folhas formadas em segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 15 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) (A), e da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA) ou ausência de carvão ativado (SCA) (B), em ambas independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

A formação de folhas nos tratamentos com AIB, na ausência de CA foi favorecida pela ausência do fitorregulador no meio nutritivo, formando-se, em média, 3,5 folhas. Quando o AIB esteve presente, a formação de folhas diminuiu proporcionalmente ao aumento da auxina (Figura 3B). Considerando-se o tempo relativamente curto de cultivo, e o fitorregulador utilizado no experimento, a resposta

apresentada pelos segmentos nodais de açoita-cavalo em relação à formação de folhas, pode ser considerada bastante satisfatória.

### Enraizamento *in vitro* após tratamento “pulse” com AIB

Após 30 dias de transferência dos explantes para meios nutritivos de igual composição ao tratamento “pulse”, porém na ausência de AIB, a sobrevivência foi afetada significativamente pela interação tripla entre os fatores ( $p= 0,0006$ ) testados, com um IV de 8,69%, assim, desdobrou-se o fator AIB dentro de cada nível de meio nutritivo, com os respectivos níveis de carvão ativado utilizados. Entretanto, os demais fatores, isolados e as interações duplas, não apresentaram efeitos significativos na sobrevivência.

A sobrevivência dos explantes cultivados em meio nutritivo MS, na presença de CA, ajustou-se em uma equação de segundo grau. Houve favorecimento dessa variável com o aumento nas concentrações de AIB no meio nutritivo em que foram cultivados inicialmente, registrando-se mais de 90% de sobrevivência no explante que foi cultivado em meio nutritivo com 9 $\mu$ M de AIB. Já quando foram utilizadas concentrações mais baixas de AIB (3 e 6 $\mu$ M) obteve-se, no segundo momento, porcentagem de sobrevivência inferior a 88% (Figura 4).

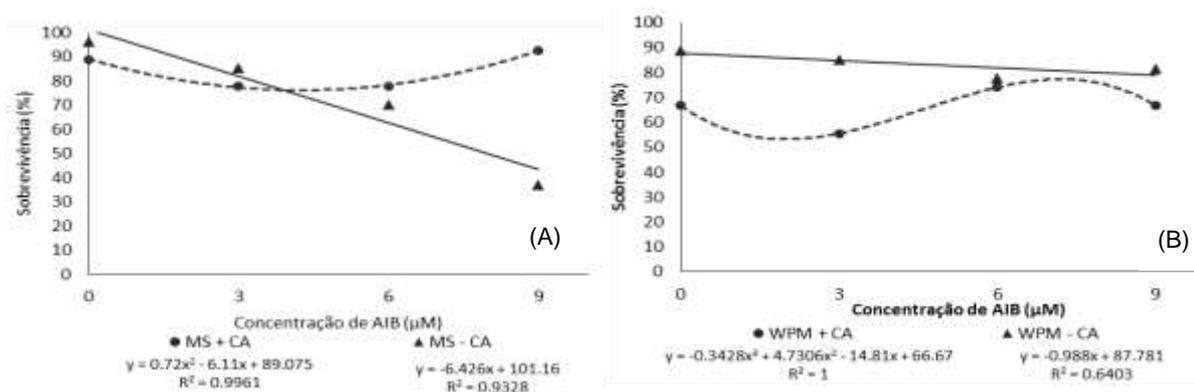


Figura 4. Porcentagem média de sobrevivência de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias. As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB, nos meios nutritivos MS na presença (MS + CA) e ausência (MS – CA) de carvão ativado (CA) (A), e WPM na presença (WPM + CA) e ausência (WPM – CA) CA (B). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Os explantes após 30 dias de cultivo *in vitro*, o meio nutritivo WPM, com presença de CA, apresentaram respostas instáveis, sendo ajustado a uma equação polinomial de terceiro grau. No entanto, para a ausência de CA nesse meio nutritivo, o modelo ajustado foi o linear. As concentrações de AIB, quando combinadas com o meio WPM na presença de CA, ocasionaram valores oscilantes para a sobrevivência. Assim, quando a concentração da auxina foi aumentada, na concentração 6 $\mu$ M, obteve-se o valor máximo (74%) de sobrevivência, enquanto os explantes originados de meios na ausência, ou com 9 $\mu$ M de AIB, a sobrevivência foi de 67%, e de 55% com 3 $\mu$ M de AIB (Figura 4B). Assim, a análise da equação ajustada, não permite identificar o efeito do tratamento “pulse” por 15 dias com AIB, quando transferidos para meios nutritivos de igual característica, porém na ausência da auxina.

Entretanto, para o mesmo meio nutritivo, porém na ausência de CA, foram observadas respostas mais uniformes. Com concentrações maiores de AIB no tratamento “pulse”, a sobrevivência registrou decréscimos, em que de 89% no tratamento sem AIB, sofreu redução para 77% de sobrevivência no tratamento que recebeu 9 $\mu$ M da auxina. No entanto, esses valores são levemente superiores aos explantes cultivados na presença de CA sem AIB, confirmando o efeito negativo desse componente para a sobrevivência de segmentos nodais de açoita-cavalo, quando combinados com concentrações baixas de AIB.

Para o estabelecimento *in vitro*, após 30 dias de cultivo, as duplas interações, meio nutritivo e carvão ativado ( $p= 0,0031$ ), AIB e carvão ativado ( $p=0,0010$ ), apresentaram diferenças significativas. O mesmo não se verificou para os demais fatores isolados, e as interações restantes.

Considerando o efeito das concentrações de AIB influenciado pela presença ou ausência de carvão ativado no meio nutritivo, obteve-se que, quando presente, este último fator, agiu tornando incerto o estabelecimento dos explantes. Assim os resultados obtidos, expressaram tendências de aumento ou diminuição, conforme variações na concentração de AIB no meio nutritivo, tendo sido ajustada uma equação polinomial de terceiro grau para esta variável. No entanto, quando o carvão ativado esteve ausente no meio nutritivo, a resposta foi a diminuição da porcentagem de explantes estabelecidos, e a equação ajustada para esta variável foi linear. A porcentagem de estabelecimento na ausência, ou com 3 $\mu$ M de AIB, foi superior a alcançada no meio nutritivo carente de carvão ativado, apesar disto,

quando aumentadas as concentrações de AIB (6 ou 9µM), essa resposta sofreu inversão, em que os meios contendo carvão ativado refletiram as maiores porcentagens de estabelecimento (Figura 5).

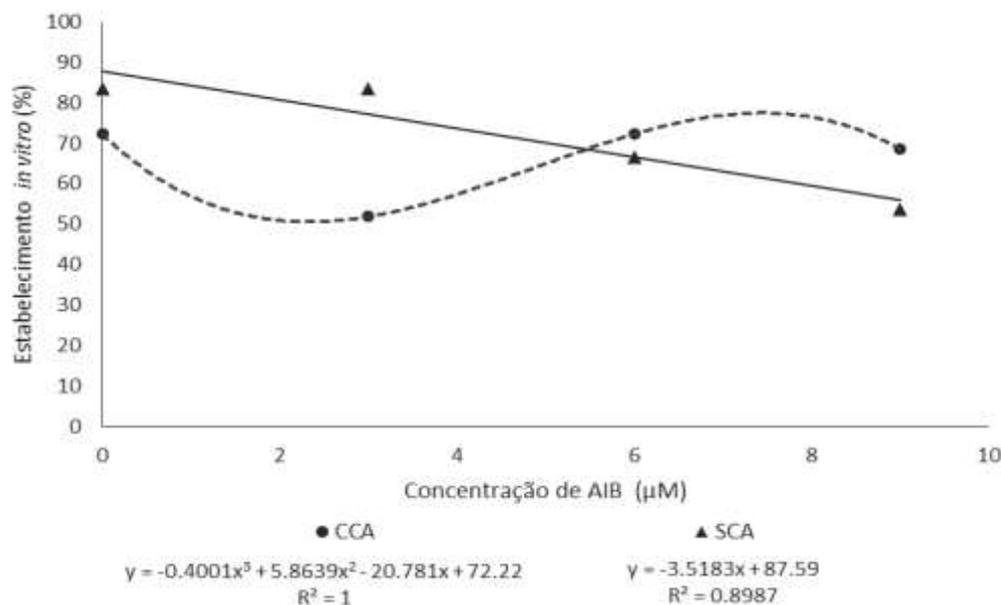


Figura 5. Porcentagem média de estabelecimento *in vitro* de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, e da presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado. As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB, independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

O desdobramento da interação de meios nutritivos com os níveis de carvão ativado, demonstrou que no meio nutritivo MS, a porcentagem de estabelecimento não é afetada pela presença ou ausência do carvão ativado, o que não ocorreu para o meio WPM. Quando o componente carvão ativado esteve ausente, a porcentagem de estabelecimento foi estatisticamente diferente ao meio nutritivo com acréscimo deste. Da mesma maneira, comparando os meios nutritivos entre si, a presença de carvão ativado no meio WPM afetou consideravelmente o estabelecimento dos explantes. De forma geral, enquanto no meio MS se estabeleceram aproximadamente 73,15%, no meio WPM isto se verificou em apenas 59,26% dos explantes. Esse efeito pode ser melhor evidenciado na condição em que se utilizou o

meio WPM sem carvão ativado, com o estabelecimento de 76,85% dos explantes (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem média de estabelecimento de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre os meios nutritivos MS ou WPM, na presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado. Os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, com diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Meio Nutritivo	----- Carvão Ativado -----	
	CCA	SCA
MS	73,15 Aa*	66,67 Aa
WPM	59,26 Bb	76,85 Aa
Média geral (%)	68,98	
IV (%)	12,22	

\*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, e na linha, médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em ensaio testando meios nutritivos MS e WPM, em ápices caulinares e segmentos nodais de *Peltophorum dubium* (canafístula), o meio nutritivo MS resultou mais eficiente para o estabelecimento dos explantes (BASSAN et al., 2006). Esse resultado diferiu do obtido com açoita-cavalo no presente ensaio, no referido ensaio, os autores apontam que, para a espécie testada, quando o meio nutritivo não foi acrescido com carvão ativado, o estabelecimento mostrou-se indiferente, tanto para o meio MS como para o meio WPM, ambos mostrando-se aptos para o estabelecimento de segmentos nodais.

A porcentagem de formação de calos (IV= 31,87%), após 30 dias de cultivo *in vitro*, apresentou diferenças significativas para os fatores isolados AIB ( $p=0,0000$ ), carvão ativado ( $p=0,0073$ ) e para as interações, meio nutritivo com AIB ( $p=0,0377$ ) e AIB com carvão ativado ( $p=0,0014$ ). Os demais fatores isolados e as suas interações não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Figura 6).

O efeito das concentrações de AIB para cada tipo de meio nutritivo utilizado apresentou respostas relativamente similares, ambos registraram formação de calos na base do explante, na presença de AIB, embora o meio WPM tenha propiciado,

também, a ocorrência deste efeito com o aumento da concentração de AIB. Nesta condição, para esse meio, a equação que melhor se ajustou foi a linear.

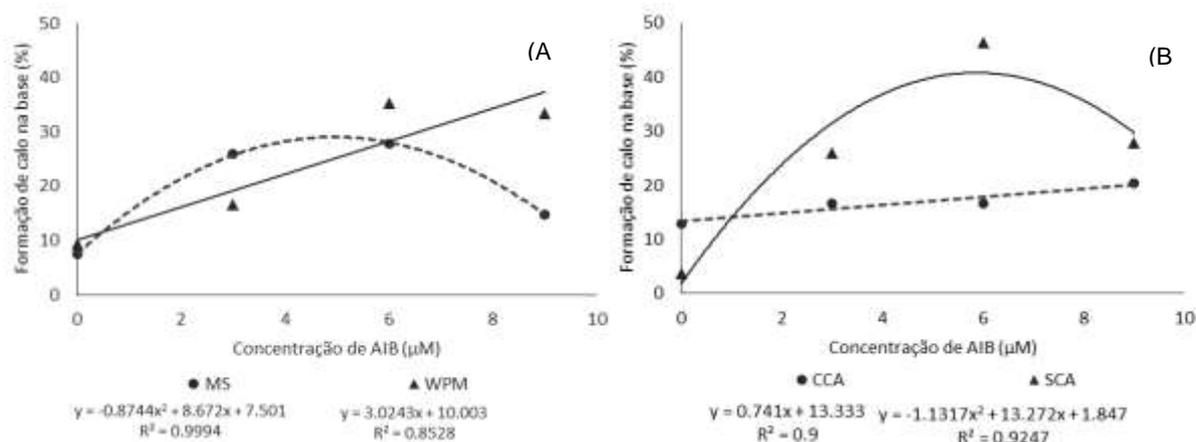


Figura 6. Porcentagem média de formação de calos na base de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, nos meios nutritivos MS ou WPM, independentemente da presença ou ausência de carvão ativado (A), e da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado, independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM) (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

O meio MS registrou decréscimos na formação de calos, quando utilizado com explantes provenientes de meio nutritivo com concentração de AIB superior a 6µM. A equação ajustada para este meio foi a de segundo grau, com a MET calculada de 4,95µM (Figura 6A). Quando foi considerado o efeito do carvão ativado, a presença deste componente apresentou uma resposta com tendência linear crescente para formação de calos na base do explante (Figura 6B). Embora esse comportamento em resposta às concentrações de AIB usualmente não seja muito considerável (13 a 20%), não pode ser ignorado, devido ao fato de que, uma vez dado o surgimento destas estruturas nos explantes, isto poderia interferir no processo de emissão de raízes, possibilitando aumento no período em que o explante permanece no meio nutritivo, que pode resultar em detrimento da etapa de aclimatização. Comportamento oposto foi verificado nos meios nutritivos com ausência de carvão ativado, a resposta dos explantes seguiu um modelo polinomial de segundo grau, formando calos em apenas 3,7% dos explantes no meio sem AIB,

valores que se elevaram até 46% na concentração de 6 $\mu$ M da auxina, com tendência ao decréscimo (28%) a partir de 9 $\mu$ M de AIB. Nesta condição, a concentração 5,86 $\mu$ M de AIB foi identificada como a MET.

Em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato), com tratamento prévio utilizando 1 $\mu$ M de Ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e 5 $\mu$ M de Thidiazuron (TDZ) por 30 dias, e posterior transferência em meio nutritivo MS normal, MS reduzido à metade da concentração dos sais ( $\frac{1}{2}$  MS) e WPM, todos acrescidos com 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 60 dias, formou-se calos na base dos explantes em 44,44; 12,50 e 38,74%, respectivamente (GOLLE et al., 2012). Os resultados encontrados por esses autores com a espécie testada, exibem comportamento distinto ao evidenciado no presente ensaio, utilizando segmentos nodais de açoita-cavalo, em que, o meio WPM e a ausência de carvão ativado favoreceram maior formação de calos na base dos explantes.

Contudo, respostas calogênicas podem estar fortemente ligadas às características dos explantes empregados, à espécie utilizada e ao meio em que estes são inoculados, a exemplo disto, em ensaio avaliado após 60 dias de cultivo *in vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* (canafístula), em meio nutritivo MS normal, a porcentagem de formação de calos na base dos explantes atingiu a 96,22% (CURTI; REINIGER, 2014). Enquanto isso, em segmentos nodais de *Jatropha curcas* (pinhão-manso), cultivado em meio MS e  $\frac{1}{2}$  MS, combinado com 0,25 a 1 mg L<sup>-1</sup> de AIB, a formação de calos se manteve entre 25 e 75% (TOPPO et al., 2012).

A formação de raiz primária, após 30 dias de cultivo *in vitro*, apresentou interação tripla dos fatores ( $p= 0,0192$ ). Igualmente, as interações duplas AIB x carvão ativado ( $p= 0,0294$ ), meio nutritivo x carvão ativado ( $p= 0,0151$ ) e AIB x meio nutritivo ( $p=0,0149$ ) apresentaram efeitos significativos, assim como os fatores isolados carvão ativado ( $p=0,0000$ ) e meio nutritivo ( $p=0,0000$ ). Esta variável apresentou um IV de 26,64%, e para sua análise foi desdobrada a interação tripla, verificando a resposta dos meios nutritivos, na presença ou ausência de carvão ativado, sob o efeito das concentrações de AIB, presentes no meio nutritivo onde foram cultivados os explantes empregados neste experimento (Figura 7).

O meio nutritivo MS não mostrou-se favorável para promover a formação de raízes primárias (Figura 7A), sendo que, na presença de carvão ativado nesse meio nutritivo, foram registradas as menores porcentagens de raiz primária. Nessa

condição, a concentração intermediária (6µM) foi a que formou mais raízes primárias (11%), enquanto que as concentrações 3 e 9µM originaram apenas 3,7% de raízes cada. Na ausência de AIB não ocorreu formação de raízes primárias, tendo sido a concentração 5,5µM de AIB identificada como a concentração mais eficiente (MET) na condição do presente experimento.

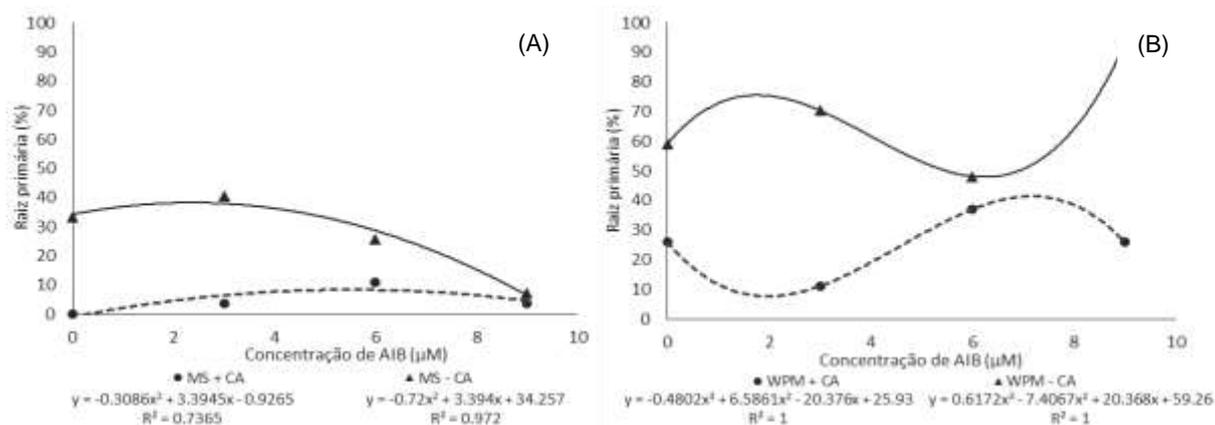


Figura 7. Porcentagem média de formação de raiz primária em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, e os meios nutritivos MS na presença (MS + CA) ou ausência (MS – CA) de carvão ativado (A), e WPM na presença (WPM + CA) ou ausência (WPM – CA) de carvão ativado (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Nesse caso, cabe considerar que concentrações exógenas de auxina, muitas vezes podem apresentar efeito inibitório, que por sua vez, é passível de ser controlado pelo conteúdo endógeno daquelas (LUDWIG-MULLER, 2011). Essa resposta ainda pode ser influenciada pelo meio nutritivo utilizado, bem como, por sua composição. Além disso, em alguns casos, determinadas concentrações de auxina podem apresentar efeito tóxico para certas atividades (SAUER et al., 2013).

Na ausência de carvão ativado, o meio MS respondeu melhor na concentração de 3µM de AIB, formando raiz primária em 40% dos explantes, a partir da qual, a formação dessas foi diminuindo até 7,41% no tratamento que recebeu 9µM de AIB. O melhor modelo ajustado para esta variável foi o polinomial de

segundo grau, onde  $2,1\mu\text{M}$  de AIB fora identificada como a concentração mais eficiente.

Para a mesma variável, testando o meio nutritivo WPM, o efeito das concentrações de AIB utilizadas no tratamento “pulse” foram incertas. Apesar disto, em todos os casos o meio nutritivo sem adição de carvão ativado apresentou respostas mais favoráveis para formação de raízes. Tanto na condição de presença como de ausência de carvão ativado, os melhores ajustes ocorreram em modelos polinomiais de terceiro grau (Figura 7B).

A ausência de AIB, e a concentração intermediária deste ( $6\mu\text{M}$ ) foram as que menos favoreceram a formação de raízes primárias no meio WPM, sem carvão ativado. Estas concentrações formaram raízes em 29% e 48% dos explantes, respectivamente, entretanto, utilizando  $3\mu\text{M}$  e  $9\mu\text{M}$  de AIB, 70% e 92,5% dos explantes, respectivamente, formaram raízes primárias. A presença de carvão ativado nesse meio nutritivo não foi favorável à esta variável, visto que a maior porcentagem de formação de raiz primária (37%) ocorreu na concentração de AIB ( $6\mu\text{M}$ ) que apresentou a menor quantidade de raízes no tratamento com ausência de carvão ativado. Contudo, o meio nutritivo WPM mostrou-se promissor na formação de raízes de açoita-cavalo, considerando que existe uma tendência dos explantes em aumentar a produção dessas raízes. Isto pode ser observado quando foi incrementada a concentração de AIB utilizada no tratamento prévio, indicando que o emprego desta auxina, talvez poderia beneficiar o processo de enraizamento.

Em relação à formação de raízes secundárias, as respostas obtidas acompanham a tendência das encontradas para a formação de raízes primárias. Para o meio nutritivo MS na presença de carvão ativado, ajustou-se uma equação linear, evidenciando aumento da formação de raízes secundárias nos explantes que receberam as maiores concentrações de AIB no tratamento “pulse”, ao contrário do acontecido quando o carvão ativado esteve ausente nesse meio nutritivo. Neste caso, somente na concentração mais baixa de AIB ( $3\mu\text{M}$ ) se obteve a maior formação de raízes secundárias (40%) (Figura 8A), demonstrando que a formação de raiz secundária foi equivalente à formação de raiz primária para a mesma concentração de AIB neste meio nutritivo. Esta variável teve 29,98% de IV.

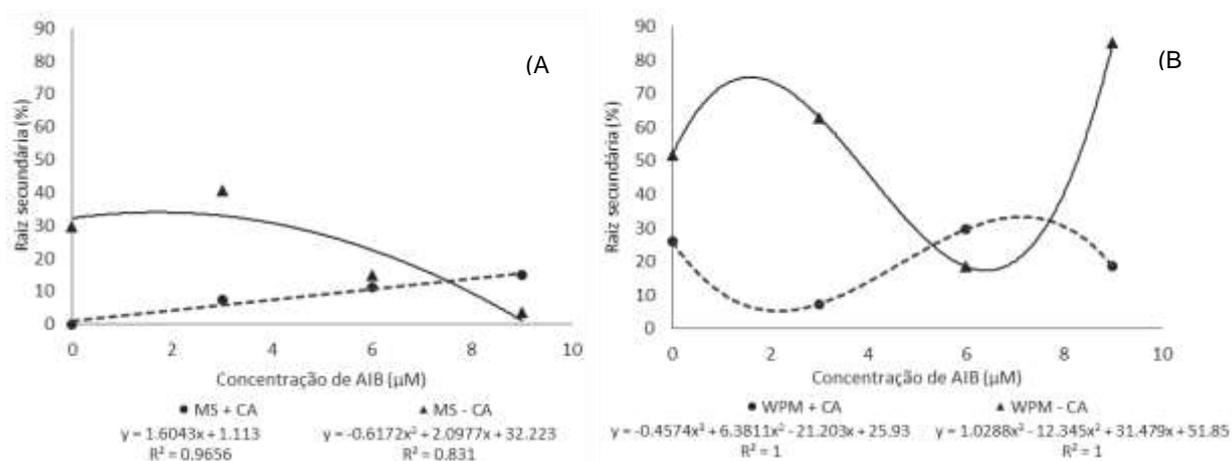


Figura 8. Porcentagem média de formação de raiz secundária em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, e os meios nutritivos MS na presença (MS + CA) ou ausência (MS – CA) de carvão ativado (A), e WPM na presença (WPM + CA) ou ausência (WPM – CA) de carvão ativado (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Embora o meio nutritivo MS tenha registrado formação de raízes secundárias, de acordo com os resultados obtidos, a sua eficiência para essa finalidade, na condição testada, pode ser considerada baixa. Por outro lado, o meio nutritivo WPM, mostrou-se mais eficiente na formação de raízes secundárias em segmentos nodais de açoita-cavalo. Apesar disso, essa eficiência refletiu respostas oscilantes, tanto para o meio nutritivo que foi acrescentado com carvão ativado, quanto para o meio nutritivo sem adição desse componente. Em ambos os casos, os dados foram melhor ajustados em equação polinomial de terceiro grau (Figura 8B).

As concentrações de AIB, quando combinadas com meio WPM na presença de carvão ativado, foram menos favoráveis para a formação de raízes secundárias, obtendo o máximo de raízes (29%) na concentração de 6µM de AIB. No entanto, evidenciou-se mudança na tendência da baixa formação de raízes secundárias nessas condições, quando ao meio nutritivo não foi acrescentado o carvão ativado, produzindo mais raízes secundárias. Apesar disto, as respostas foram bastante incertas, registrando os pontos mais altos na concentração de 3µM (62,9%) e 9µM (85%) de AIB, indicando que quase a totalidade dos explantes que produziram

raízes primárias, também formaram raízes secundárias. Na Figura 9 pode ser observada a resposta de alguns tratamentos para o enraizamento *in vitro*.

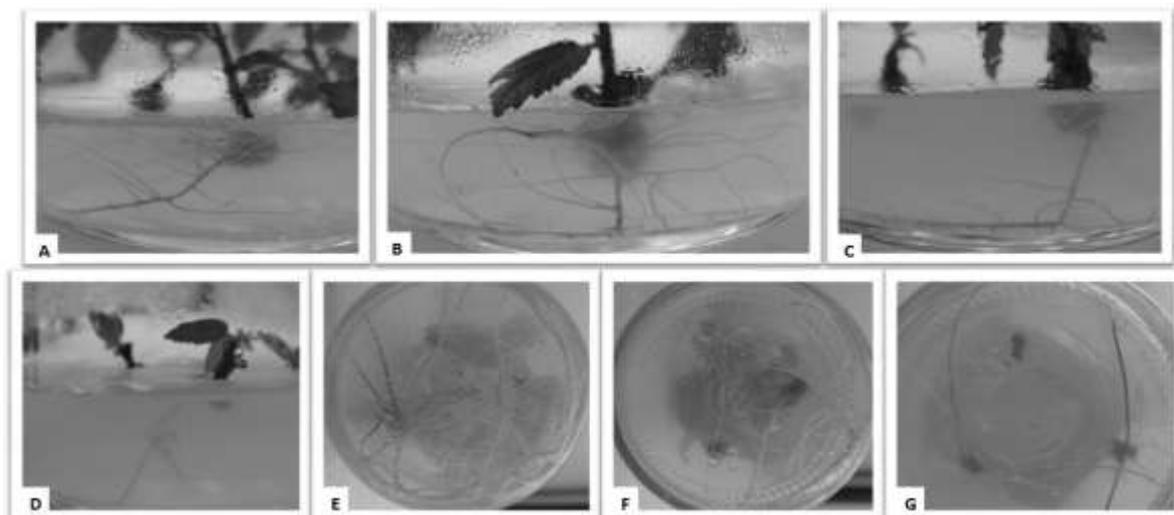


Figura 9. Aspectos de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 30 dias de cultivo *in vitro* sob o efeito de: meio nutritivo MS sem Ácido Indolbutírico (AIB) e carvão ativado (CA) (A), meio MS com 3  $\mu\text{M}$  de AIB (B), meio MS com 6  $\mu\text{M}$  de AIB, (C), meio MS com 9  $\mu\text{M}$  de AIB (D), meio WPM sem AIB e CA (E), meio WPM com 3  $\mu\text{M}$  de AIB (F), e meio WPM com 6  $\mu\text{M}$  de AIB (G). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

A menor formação de raiz secundária, no meio WPM sem carvão ativado, foi de 18,5%, na concentração de 6 $\mu\text{M}$  de AIB. Provavelmente, testando concentrações maiores que 9 $\mu\text{M}$  de AIB, em meio nutritivo WPM, sem carvão ativado, o enraizamento de segmentos nodais de açoita-cavalo poderá ser mais eficiente. Esta estimativa se sustenta no fato de que a tendência para ambas as variáveis relacionadas com a formação de raízes é o incremento, em explantes provenientes de tratamento “pulse” com concentrações superiores a 9 $\mu\text{M}$  de AIB.

Em explantes de segmentos nodais ou apicais de açoita-cavalo, cultivados por 60 dias em meio nutritivo MS ou WPM, sem adição de fitorreguladores, ocorreu formação de 30 e 66,8% de raízes, respectivamente, enquanto que em segmentos nodais em meio WPM, após 35 dias, originaram-se aproximadamente 25% de raízes (FLÔRES et al., 2011a). No entanto, baixa porcentagem de enraizamento foi observada em *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato), onde segmentos nodais, previamente tratados com 1 $\mu\text{M}$  de ANA e 5 $\mu\text{M}$  de TDZ por 30 dias, e posterior

transferência em meio nutritivo MS normal, ½ MS e WPM, todos acrescidos com 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 60 dias, formaram raízes apenas nos dois últimos meios nutritivos, em 20 e 5% dos explantes, respectivamente (GOLLE et al., 2012).

Igualmente, na espécie nativa *Peltophorum dubium* (canafístula), respostas rizogênicas apareceram somente após 60 dias em brotações cultivadas *in vitro* em meio MS padrão, em que se obteve apenas 3,67% dos explantes enraizados (CURTI; REINIGER, 2014). Entretanto, para essa mesma espécie, Bassan et al. (2006) não encontraram diferenças significativas entre os meios MS e WPM para formação de raízes em segmentos nodais e ápices caulinares, após 49 dias de cultivo *in vitro*.

Em segmentos nodais de *Jatropha curcas* (pinhão-mansão), cultivado em meio MS normal e ½ MS, acrescidos de 0,25 a 1 mg L<sup>-1</sup> de AIB, o meio nutritivo ½ MS foi mais favorável para formação de raízes, contribuindo, em média, com 79% contra 63% de raízes formados no meio MS normal (TOPPO et al., 2012). Comparando os resultados nos trabalhos supracitados, pode-se inferir que os explantes de açoita-cavalo utilizados no presente ensaio, apresentam grande potencial de enraizamento *in vitro*, sendo a propagação desta espécie por meio da cultura de tecidos uma alternativa promissora.

Ainda, as respostas dos explantes à presença de carvão ativado não foram muito favoráveis para formação de raízes em açoita-cavalo, porém, outros trabalhos relatam que explantes de espécies lenhosas, ou arbustivas, cultivados em meios nutritivos, MS ou WPM na presença de carvão ativado, combinados ou não com AIB, responderam positivamente formando raízes (THOMAS, 2008).

A variável clorose foliar (IV= 39,79%), foi afetada pelo efeito significativo do fator isolado meio nutritivo (p=0,0006), os demais fatores e as suas respectivas interações, não apresentaram diferenças significativas. O meio nutritivo WPM promoveu maior porcentagem de clorose foliar (23,12%), comparado com meio MS (11,17%). Essa diferença provavelmente ocorreu devido à menor concentração dos macro e micronutrientes na composição do meio WPM, necessidade que foi suprida com mais eficiência pelo meio MS. A clorose foliar é um fator que pode não afetar de forma impactante o processo de enraizamento *in vitro*. No entanto, assume grande importância no processo de micropropagação, já que os explantes que conseguem enraizar, ao se desenvolverem nas etapas subsequentes, demandarão o papel

primordial desempenhado pelas folhas, vital para a sobrevivência das plantas micropropagadas.

A porcentagem de oxidação na base dos explantes, apresentou diferenças significativas para as variáveis isoladas meio nutritivo ( $p=0,0376$ ), AIB ( $p=0,0201$ ) e a interação entre meio nutritivo e carvão ativado ( $p=0,0376$ ). Na Figura 10 está apresentada a curva de regressão ajustada para concentrações de AIB. Na Tabela 2, a interação entre meio nutritivo e CA.

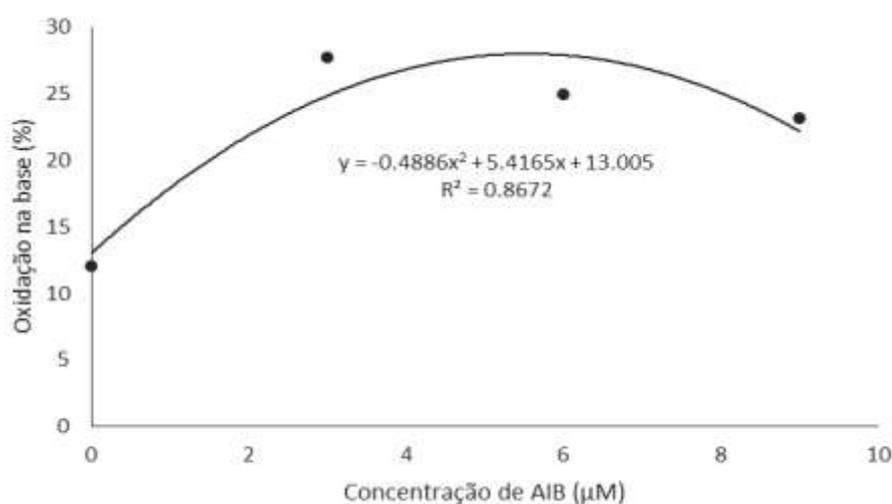


Figura 10. Porcentagem média de oxidação fenólica na base dos explantes em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias. As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB, independentemente do meio nutritivo empregado (MS e WPM) e, simultaneamente, da presença ou ausência de carvão ativado. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Analisando o efeito das concentrações de AIB ajustado para uma equação polinomial de segundo grau, encontra-se que este fator influenciou sobre a oxidação na base dos explantes na concentração mais baixa ( $3\mu\text{M}$ ), afetando a 28% dos explantes, esse efeito diminuiu com o aumento das concentrações de AIB.

Quando foi analisada a interação entre os fatores meio nutritivo e carvão ativado, evidenciou-se que quando o carvão ativado esteve presente no meio nutritivo WPM, os explantes oxidaram em maior porcentagem em comparação a

quando estes estiveram no meio MS. No entanto, quando não foi adicionado carvão ativado ao meio nutritivo, a oxidação dos explantes não apresentou diferenças. Essa resposta foi igual a obtida ao se analisar o efeito da presença ou ausência de carvão ativado em cada meio nutritivo por separado (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem média de oxidação fenólica na base de explantes em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) provenientes de tratamento “pulse” com diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) por 15 dias, após 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB, em função da interação entre os meios nutritivos MS ou WPM, na presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Meio Nutritivo	----- Carvão Ativado -----	
	CCA	SCA
MS	13,89 Ab *	22,22 Aa
WPM	29,62 Aa	22,22 Aa
Média geral (%)	21,98	
IV (%)	34,05	

\*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, e na linha, médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao 5% de probabilidade de erro.

A oxidação fenólica é uma reação que pode estar ligada à senescência dos tecidos (BARRUETO CID, 2010), outro fato que chama a atenção é que no meio onde o carvão ativado esteve presente, foi onde mais explantes oxidaram, indo de encontro com a finalidade pelo qual o carvão ativado é utilizado (WERNER et al., 2009).

Ápices caulinares de *Peltophorum dubium* (canafístula) cultivados em meio MS normal por 21 dias, não apresentaram oxidação nos explantes após esse período (BASSAN et al., 2006). Ao contrário, folíolos jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), cultivados na ausência de luz, em meio MS com carvão ativado (2g L<sup>-1</sup>), 2,4-D (10mg L<sup>-1</sup>) e BAP (2mg L<sup>-1</sup>), apresentaram oxidação em 40% dos explantes, afirmando que o uso do carvão ativado e ausência de luz não foram eficientes no controle da oxidação (WERNER et al., 2009). Em *Vaccinium ashei*, V.

*corymbosum* (mirtilo), cultivado por 60 dias em meio nutritivo WPM acrescido com  $7\mu\text{M}$  de AIB e 1% de carvão ativado, o enraizamento foi inibido pela composição do meio nutritivo (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

Esses resultados reforçam que o carvão ativado no meio nutritivo, combinado com fitorreguladores, auxinas ou citocininas, pode atuar em detrimento das respostas pretendidas. Contudo, o controle da oxidação nos explantes utilizados no processo de enraizamento *in vitro* assume extrema importância, já que pode representar impedimentos para formação das raízes, dificultando o processo de desdiferenciação e rediferenciação dos tecidos.

Outra variável analisada, após 30 dias de cultivo *in vitro* foi o número de folhas formadas, onde o fator isolado AIB foi significativo ( $p=0,0154$ ), junto com a interação AIB e carvão ativado ( $p=0,0000$ ), os demais fatores isolados e as interações destas não apresentaram efeitos significativos sobre esta variável. O IV desta variável foi de 14,77% (Figura 11).

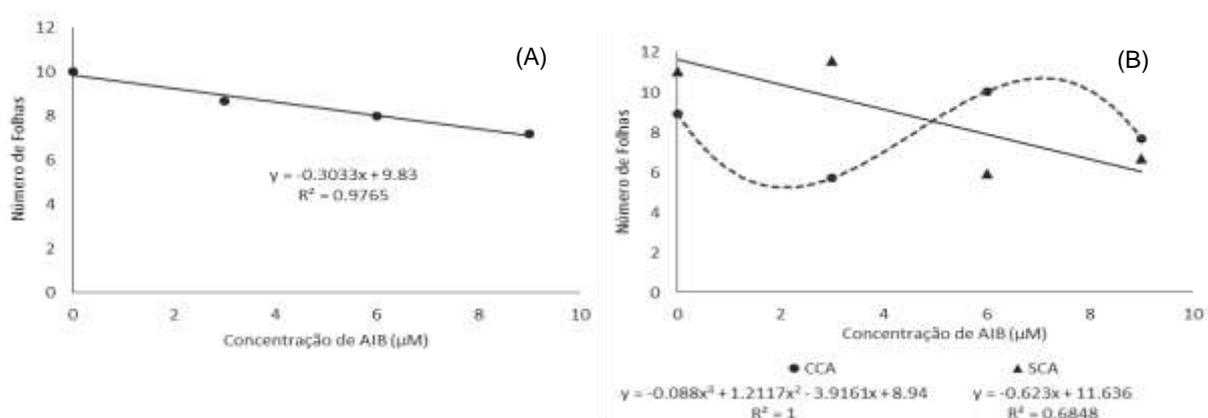


Figura 11. Número médio de folhas formadas em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função de diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias, independentemente do meio nutritivo empregado (MS ou WPM) e da presença ou ausência de carvão ativado (A), e em função da interação entre as concentrações de AIB e a presença (CCA) ou ausência (SCA) de carvão ativado (B), independentemente, também, do meio nutritivo empregado (MS ou WPM). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Aumentos na concentração de AIB no tratamento “pulse” provocaram menor formação de folhas, ajustando-se em um modelo linear para esta variável (Figura

11A). Das 10 folhas formadas no tratamento com ausência de AIB no meio nutritivo, este número diminuiu para 8,67; 8 e 7,19 folhas para as concentrações de 3; 6 e 9 $\mu$ M de AIB, sugerindo que este fitorregulador não contribuiu positivamente para a formação de folhas.

A mesma tendência foi observada quando os meios nutritivos não foram acrescidos com carvão ativado, porém, com variações maiores entre uma concentração e outra de AIB. Neste caso, a variável também foi ajustada para uma equação linear. No entanto, quando o carvão ativado esteve presente no meio nutritivo, a variável ajustou-se para uma equação polinomial de terceiro grau, evidenciando oscilações na formação de folhas (Figura 11B).

O número de folhas formadas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato), cultivados inicialmente, por 30 dias, em meios nutritivos MS normal, ½ MS e WPM, acrescidos de 1 $\mu$ M de ANA e 5 $\mu$ M de TDZ, com posterior transferência dos explantes para os mesmos meios nutritivos, sem fitorregulador, mas com 1g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 60 dias, o meio WPM e ½ MS, mostraram melhores respostas, formando 5,06 e 4 folhas por explante, respectivamente (GOLLE et al., 2012).

Efeito das concentrações do meio nutritivo MS (50 – 150%), foi observado na formação de folhas em segmentos apicais caulinares de canafístula. O meio nutritivo com 75% dos sais atingiu o maior número de folhas (2,8) por explante, diminuindo com o incremento das concentrações dos sais no meio nutritivo (FLÔRES et al., 2011b). Em segmentos nodais de açoita-cavalo, o número de folhas produzidas em meio nutritivo WPM, na ausência de fitorreguladores, foi superior (>2) que quando foram adicionadas concentrações de 5 a 15mg L<sup>-1</sup> de BAP (FLÔRES et al., 2011a). Esses resultados coincidem com os obtidos no presente ensaio, uma vez que o número de folhas formadas foi superior nos tratamentos que não receberam concentração de fitorregulador, indicando que segmentos nodais de açoita-cavalo apresentam elevado potencial de uso para micropropagação.

A variável número de brotos (IV= 18,12%), apresentou interação tripla entre os fatores (p=0,0394), ajustando-se em modelos de regressão linear e polinomial de terceiro grau, para os meios nutritivos MS e WPM, acrescidos ou não de carvão ativado, respectivamente (Figura 12).

Na presença de carvão ativado no meio nutritivo MS, pode-se observar que a formação de brotos foi favorecida, embora de forma não tão clara. Neste sentido,

apresentou maior formação de brotos nas concentrações superiores a 3µM de AIB (4,33 ou 4 brotos), enquanto que na ausência deste fitoregulador, formaram-se apenas três brotos. Já, na ausência de carvão ativado no meio nutritivo, os explantes cultivados formaram maior quantidade de brotos na falta de AIB (5,44 brotos) e 3µM (5,11 brotos), registrando diminuição de mais de 50% nas concentrações de 6µM (2,55 brotos) e 9µM (2 brotos) de AIB no meio nutritivo do tratamento “pulse” (Figura 12A).

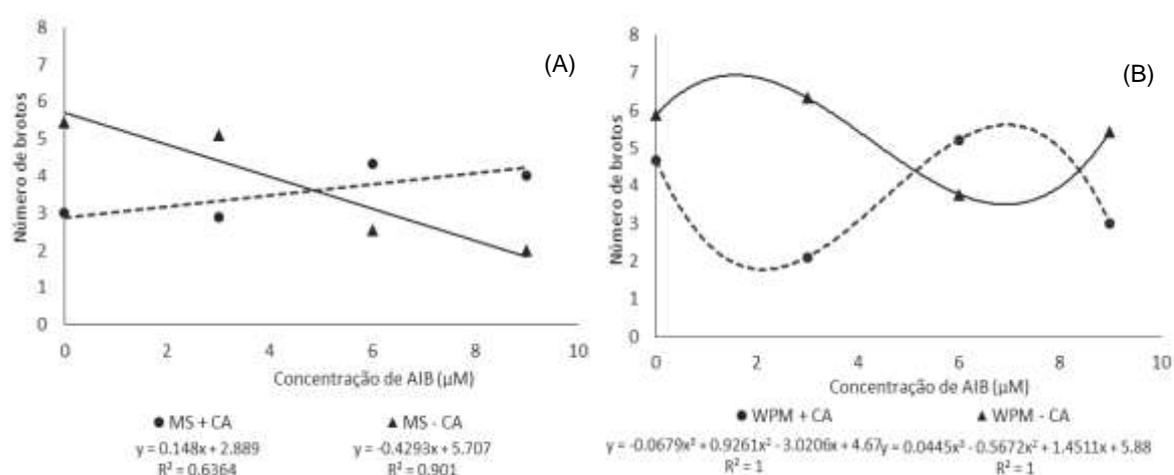


Figura 12. Número médio de brotos em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre diferentes concentrações de Ácido Indolbutírico (AIB) às quais os explantes foram submetidos, previamente, a tratamento “pulse” por 15 dias e os meios nutritivos MS na presença (MS + CA) ou ausência (MS – CA) de carvão ativado (A), e WPM na presença (WPM + CA) ou ausência (WPM – CA) de carvão ativado (B). As médias são referentes a 30 dias adicionais de cultivo *in vitro*, na ausência de AIB. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

A resposta dos explantes para o meio nutritivo WPM foi incerta, em relação à presença e ausência de carvão ativado no meio nutritivo. Quando este esteve presente, a formação de brotos foi superior somente no tratamento com 6µM de AIB, formando 5,22 brotos por unidade experimental. Enquanto isso, nas demais concentrações testadas e na ausência de AIB, a formação de brotos foi menor.

Finalmente, no meio WPM sem carvão ativado, a formação de brotos foi comparativamente melhor, obtendo o menor número no tratamento com 6µM de AIB, porém com variações que não acompanharam em forma proporcional às

concentrações de AIB no meio. No tratamento sem AIB, formaram-se 5,88 brotos, enquanto que nas concentrações de 3 e 9 $\mu$ M, foram originadas 6,33 e 5,44 brotos (Figura 12B).

Resultados similares foram obtidos por Flôres et al. (2011a) em segmentos nodais de açoita-cavalo, quando o explante foi cultivado em meio nutritivo WPM, na ausência de fitorreguladores, quando foram adicionadas concentrações de 5 a 15mg L<sup>-1</sup> de BAP ao meio nutritivo, a formação de brotos não foi superior ao primeiro. No presente ensaio, embora com a presença de 3 $\mu$ M de AIB no meio nutritivo, se obteve maior número de brotos, diferença que não supera o número de brotos formados na ausência do fitorregulador.

Em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato), que receberam pré-tratamentos, em meios nutritivos MS normal, ½MS e WPM, acrescidos de 1 $\mu$ M de ANA e 5 $\mu$ M de TDZ, e posterior transferência dos explantes para os mesmos meios nutritivos, sem fitorregulador, mas com 1g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 60 dias, o meio WPM e ½ MS, mostraram melhores respostas, formando 1,75 e 1,50 brotos por explante, respectivamente (GOLLE et al., 2012).

Esses resultados reforçam o grande potencial da açoita-cavalo para propagação por meio de cultura de tecidos. Igualmente, os resultados satisfatórios obtidos na ausência de auxina, corroboram a não necessidade do seu emprego para propagação *in vitro* de açoita-cavalo.

## 5.6 Conclusões

O tratamento “pulse” com a adição de Ácido Indolbutírico (AIB) ao meio nutritivo, por 15 dias, em concentrações menores que 9  $\mu\text{M}$ , não favorecem o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., independente do meio nutritivo.

O meio nutritivo WPM é mais eficiente para promover o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. e, o carvão ativado acrescido ao meio nutritivo não é favorável para o enraizamento dos explantes.

## 5.7 Referências bibliográficas

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 303 p.

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

CARVALHO, P.E.R. Açoita-Cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular Técnica 147**. Colombo, PR, Outubro, 2008.

CHAGAS, E.A. et al. Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 1125-1131, 2005.

COSTA, F.H.S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N<sup>6</sup>-Benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

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

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009.

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

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLORES, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011a.

FLORES, A.V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) em função das concentrações do meio MS. **Cerne** (UFLA), v. 17, p. 549-553, 2011b.

GALDIANO JÚNIOR, R.F. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 801-807, 2012.

GOLLE, D. P. et al. . Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, p. 207-214, 2012.

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

KORASICK, D.A; ENDERS, T.A.; STRADER, L.C. Auxin biosynthesis and storage forms. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2541–2555, 2013.

LJUNG, K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. **Development**, v. 140, p. 943-950, 2013.

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

LUDWIG-MÜLLER J. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1757–1773, 2011.

MILLÁN-OROZCO, L.; CORREDOIRA, E.; SAN JOSE, M.C. *In vitro* rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. **Revista Biologia Tropical**, San José, v. 59, n. 1, pp 447-453, 2011.

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

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

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

RIBEIRO, V.G. et al. Efeito de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck X *Poncirus trifoliata* (L.) RAF. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 27-30, 2000.

ROSA, F. C. et al. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). **Semina Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1021-1026, 2012.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2565–2577, 2013.

SCCOTI, M.S.V. et al. Mecanismos de regeneração natural em remanescente de floresta estacional decidual. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 459-472, 2011.

SCHNEIDERS, D. et al. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.

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

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

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

TOPPO, D.D. et al. Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Jatropha curcas* plantlets. **Biomass and bioenergy**, v. 44, p. 42 – 46, 2012.

WERNER, E.T. et al. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

## 6 CAPITULO IV

### CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E TIPOS DE SUBSTRATO NA ACLIAMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

#### 6.1 Resumo

A espécie nativa *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., (açoita-cavalo) da família Malvaceae, apresenta resultados promissores para sua propagação por meio de técnicas de cultura de tecidos. Nesse sentido, a aclimatização, pode ser considerada como um dos principais entraves, no contexto da utilização da técnica de cultura de tecidos com espécies florestais. O presente estudo buscou obter um protocolo que propicie um bom enraizamento *in vitro* de segmentos nodais, para o uso na aclimatização *ex vitro* de açoita-cavalo, empregando diferentes concentrações de sacarose no meio nutritivo, em conjunto com a utilização de substratos comerciais. Segmentos nodais, oriundos de brotações de plantas cultivadas *in vitro*, foram inoculados em meio nutritivo WPM acrescido de 10; 20; 30; 40 ou 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Após 45 dias, 50% da cobertura dos frascos foi retirada, permanecendo assim durante sete dias na sala de crescimento. Na sequência, todos os explantes que formaram raízes foram transferidos individualmente para copos plásticos com capacidade para 250 mL contendo dois substratos diferentes, para finalmente serem transferidas para vasos de 1L, contendo os mesmos substratos, e mantidas em casa de vegetação por 30 dias adicionais. Após avaliações em cada estágio do experimento, conclui-se que, com a utilização de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo WPM, é possível obter plantas com boas características físicas e fisiológicas para serem submetidas ao processo de aclimatização *ex vitro*, e qualquer um dos substratos, Mecplant® ou H-Decker® pode ser empregado com sucesso, para aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas de açoita-cavalo.

**Palavras-chave:** enraizamento *in vitro*, produção de mudas, meio nutritivo.

**SUCROSE CONCENTRATIONS AND SUBSTRATE TYPES ON  
ACCLIMATIZATION PLANTS OF *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.  
MICROPROPAGATED**

**6.2 Abstract**

The native species *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., from the Malvaceae family, shows promising results regarding its propagation through tissue culture techniques. Accordingly, the acclimatization can be considered as a major obstacle in using the tissue culture technique on forest species. This study aimed to obtain a protocol that provides optimal rooting of *in vitro* nodal segments, to use in the acclimatization of *Luehea divaricata*, with different concentrations of sucrose in the nutrient medium, along with the use of commercial substrates. Nodal segments from *in vitro* grown shoots of plants were inoculated in nutrient medium WPM plus 10, 20, 30, 40 or 50 g L<sup>-1</sup> of sucrose. After 45 days, 50% of the lids were removed from the vials, remaining as such for seven days in a growth chamber. Afterwards, all explants which formed roots were transferred individually to 250-mL plastic cups containing either Mecplant® or H-Decker® substrate to be then transferred into 1L pots containing the same substrate, and kept in a greenhouse for 30 additional days. Following evaluations at each stage of the experiment, it is concluded that, with the use of 30 g L<sup>-1</sup> sucrose in the nutrient medium WPM, it is possible to obtain plants with good physical and physiological characteristics to be submitted to acclimatization *ex vitro*, and either, two different substrates can be successfully employed to *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Luehea divaricata* plants.

**Keywords:** *in vitro* rooting, plantlets production, culture medium.

### 6.3 Introdução

Existe uma demanda crescente acerca do conhecimento da flora nativa e de sua infinidade de usos, que são cada vez mais pesquisados, com o objetivo de otimizar o emprego de materiais bem adaptados ao ambiente, de forma sustentável, sem atentar contra fatores que favoreçam sua ocorrência natural. Nesse viés, tornam-se importantes as contribuições provenientes de estudos direcionados à amplificação do conhecimento acerca dessas espécies nativas, no que se refere aos processos de propagação, diferentes dos sistemas convencionais, principalmente aquelas direcionadas a produção de mudas com alta qualidade genética e sanitária.

Nesse contexto, insere-se a espécie nativa *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., integrante da família Malvaceae, conhecida popularmente no Brasil como açoita-cavalo. A planta que quando adulta atinge o diâmetro de 50 a 80 cm à altura do peito, e 20 a 25 m de altura, apresenta tronco geralmente tortuoso e nodoso, e de base larga. Em termos de comprimento de fuste, pode alcançar de 4 a 6 m, o qual é, tecnicamente, considerado curto, sendo, no entanto, passível de desenvolver troncos quase retos e bastante altos quando se desenvolve no interior da floresta (SOBRAL et al., 2006). Sua madeira apresenta baixa durabilidade natural, porém boa permeabilidade ao tratamento preservativo, sendo, no entanto, indicada para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, devido aos excelentes resultados que proporciona neste sentido (REITZ et al., 1988; CARVALHO, 2008).

A crescente necessidade de recuperação e restauração de áreas degradadas, têm gerado um aumento considerável da demanda por sementes e mudas de espécies florestais nativas, conduzindo à procura de mecanismos que tornem mais eficientes os sistemas de produção/provisão desses insumos, podendo garantir dessa maneira o sucesso dos projetos direcionados nessa área. Nesse sentido, a cultura de tecidos destaca-se entre os métodos clássicos de propagação vegetativa, principalmente por necessitar de menor espaço físico e pelo fato de poder ser desenvolvida em qualquer época do ano. Em função disso, inúmeros trabalhos com espécies florestais vêm sendo desenvolvidos, com o intuito de tornar essa tecnologia acessível e economicamente viável (XAVIER et al., 2009).

Recentemente, a utilização de técnicas de cultura de tecidos para propagação de espécies florestais nativas tem registrado um considerável aumento, sendo a micropropagação uma das técnicas mais difundidas para multiplicação de espécies lenhosas. Porém, entre as diversas fases do processo de produção, há ainda etapas consideradas como entraves, ou gargalos da técnica. Entre os principais obstáculos podem-se destacar a formação e o desenvolvimento de raízes e a aclimatização das mudas produzidas *in vitro*, etapas estudadas no presente artigo.

A técnica que preconiza a utilização de um meio nutritivo para o desenvolvimento das plantas admite, ainda, a adição a este, de outros reagentes e soluções, como vitaminas, reguladores de crescimento, entre outros. Estima-se que tais aditivos, possam contribuir para o estímulo de respostas específicas dos explantes, ou simplesmente, para garantir a sua sobrevivência nas condições em que serão mantidas. Nesse sentido, a sacarose é um dos principais componentes do meio nutritivo, utilizado quase que universalmente, uma vez que favorece o suprimento das necessidades dos carboidratos demandados pela planta para realizar a fotossíntese. Desta forma, contribui para o suprimento da necessidade decorrente da condição de cultivo *in vitro*, em que não se desenvolve sua capacidade autotrófica.

Por sua vez, a aclimatização *ex vitro*, pode ser considerada como um dos principais entraves neste contexto da utilização da técnica de cultura de tecidos com espécies florestais, da mesma forma que ocorre nas espécies de frutíferas (SOUZA JUNIOR et al., 2001). Trabalhos visando a otimização deste processo, principalmente em espécies de maior interesse econômico, como as frutíferas e as ornamentais, e em menor grau, espécies florestais, foram desenvolvidos durante a última década (RIBAS et al., 2005; TELLES; BIASI, 2005; ROCHA, et al, 2007a; ROCHA et al., 2007b; PEÑA-RAMIREZ et al., 2010; MILLÁN-OROZCO et al., 2011; SILVA et al., 2011; BAHRI; BETTAIEB, 2013). No que se refere às espécies florestais nativas, os trabalhos relacionados com o processo de aclimatização *ex vitro*, se encontram em estado ainda mais incipiente.

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da sacarose no enraizamento *in vitro* de segmentos nodais e da sacarose e do tipo de substrato na subsequente aclimatização *ex vitro* das plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) obtidas *in vitro*.

## 6.4 Material e métodos

### 6.4.1 Experimento I

Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais de açoita-cavalo, com 10 mm de comprimento, oriundos de brotações de plantas cultivadas *in vitro* em meio nutritivo WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), desprovido de reguladores de crescimento, com, aproximadamente, 45 dias de idade.

Os tratamentos consistiram do acréscimo de concentrações de sacarose (10; 20; 30; 40 ou 50 g L<sup>-1</sup>), ao meio nutritivo WPM. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 25 repetições e três explantes por unidade experimental. Ao meio nutritivo acrescentaram-se, ainda, 0,7% (p/v) de ágar e 0,01% (p/v) de mio-inositol, ajustando-se o pH para 5,8. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121°C e 1 atm, por 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±3 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo consideradas: porcentagem de sobrevivência e estabelecimento; número de folhas e de segmentos nodais; porcentagem de raiz primária e raiz secundária e porcentagem de clorose e abscisão foliar, sendo esta última calculada a partir do número total de folhas produzidas por tratamento. A obtenção dos valores de altura (mm) a partir da base do explante, massa fresca total (mg) e massa seca total (mg) dos explantes ocorreu a partir de mensurações realizadas em 10 unidades experimentais, retiradas aleatoriamente em cada parcela experimental.

### 6.4.2 Experimento II

Decorridos 45 dias de cultivo *in vitro*, nas condições anteriormente descritas (Experimento I), as culturas foram submetidas à aclimatização, sendo os tratamentos deste experimento resultantes da combinação fatorial (5x2) entre concentrações de sacarose (10; 20; 30; 40 ou 50 g L<sup>-1</sup>), às quais as culturas foram previamente submetidas (Experimento I), e tipos de substrato, Mecplant® a base de casca de

pinus bio-estabilizada e H-Decker® (para sementes e plantas florestais) a base de turfa, calcário calcítico e casca de pinus compostada, constituindo 10 tratamentos com diferentes números de repetições (de seis a 15 por tratamento, de acordo com a disponibilidade de plantas). A unidade experimental foi constituída por uma planta por recipiente (copo plástico, com capacidade para 250 mL, preenchido com substrato, de acordo com o tratamento), sendo distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. As culturas/plantas submetidas à aclimatização foram avaliadas em diferentes períodos, a seguir denominados e descritos:

**Período de aclimatização *in vitro*** (7 dias em sala de crescimento)

Após 45 dias de cultivo *in vitro* das culturas do experimento I, a cobertura dos frascos foi retirada até atingir 50% da superfície de vedação (com papel alumínio) de cada frasco, permanecendo, assim, durante sete dias na sala de crescimento, com temperatura controlada de  $25 \pm 3$  °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Este intervalo de tempo (7 dias) consistiu no período de aclimatização *in vitro*.

**1º período de aclimatização *ex vitro*** (7 dias em sala de crescimento, com os copos cobertos)

Na sequência, todos os explantes que formaram raízes (plantas) foram transferidos, individualmente, para copos plásticos com capacidade para 250 mL, com cinco perfurações de, aproximadamente, 5mm de diâmetro em suas bases inferiores. Os copos foram preenchidos com 250 mL de substrato H-Decker® ou Mecplant®, e irrigadas com água destilada, de acordo com o tratamento. Com a finalidade de criar um microclima adequado, após o transplante de cada planta para os respectivos tratamentos, as unidades experimentais foram, novamente, cobertas, utilizando-se, para tanto, copos plásticos - de volume idêntico àquele que comportou o substrato- contendo o mesmo número de perfurações. Finalmente, os copos plásticos com as plantas, foram distribuídos em bandejas plásticas contendo, em sua base, uma lâmina de água destilada de 10mm, as quais foram dispostas em sala de crescimento sob as mesmas condições ambientais da cultura *in vitro*, durante sete dias.

**2º período de aclimatização *ex vitro*** (7 dias em sala de crescimento, com os copos abertos)

Decorridos 14 dias desde o início da aclimatização, após a avaliação do 1º período de aclimatização *ex vitro*, foram retiradas as coberturas dos recipientes,

sendo estes dispostos, novamente, em sala de crescimento, onde permaneceram por mais sete dias. Este intervalo de tempo (21 dias de aclimatização) foi denominado segundo período da aclimatização *ex vitro*.

**3º período de aclimatização *ex vitro*** (7 dias em casa de vegetação climatizada)

Na sequência, deu-se início ao terceiro período da aclimatização *ex vitro* (7 dias adicionais, após 7 dias de aclimatização *in vitro* + 14 dias de aclimatização *ex vitro*, totalizando, ao final, 28 dias de aclimatização), no qual os copos plásticos contendo as plantas foram transferidos para a casa de vegetação, com ambiente controlado de  $25 \pm 5$  °C e umidade relativa (UR) de 70 a 80%, permanecendo dentro das bandejas plásticas, sendo mantido o aporte de 10mm de lâmina de água.

**4º período de aclimatização *ex vitro*** (28 dias em casa de vegetação não climatizada)

A seguir, as plantas foram transferidas para vasos plásticos, com capacidade para 1L, os quais foram totalmente preenchidos com os respectivos substratos, de acordo com o tratamento. Os vasos foram dispostos em casa de vegetação, sem controle de temperatura e umidade, onde permaneceram por mais 28 dias, totalizando 56 dias de aclimatização. Este intervalo de tempo constituiu o 4º período de aclimatização *ex vitro*.

A partir do quarto período de aclimatização *ex vitro*, as plantas receberam aplicações semanais de uma mistura modificada de adubos de síntese química, denominada adubação de arranque (WENDLING; DUTRA, 2010). Essa adubação consistiu de uma solução de Super Fosfato Simples ( $4,6 \text{ g L}^{-1}$ ), Sulfato de Amônio ( $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ), Cloreto de Potássio ( $2,1 \text{ g L}^{-1}$ ) e a solução F (micronutrientes) do meio nutritivo WPM ( $5 \text{ mL L}^{-1}$ ), que foi adicionada aos vasos, na concentração  $30 \text{ mL L}^{-1}$ .

Após o término de cada um dos períodos de aclimatização, anteriormente descritos, foram analisadas as seguintes variáveis: porcentagens de sobrevivência e estabelecimento das plantas, altura das plantas (mm) e número de folhas produzidas por planta.

#### 6.4.3 Análise estatística dos dados

Foram verificados os pressupostos do modelo matemático, e quando necessário, os dados transformados para  $\sqrt{x+1}$ . Na sequência, as variáveis foram

submetidas à análise de variância, e quando obtido valor de F significativo, empregou-se a comparação das médias pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o índice de variação (IV), calculado por  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009). Para estimar o IV em experimentos com números diferentes de repetições, para o valor de N foi considerado o número menor de repetições.

## 6.5 Resultados e discussão

### 6.5.1 Experimento I

A concentração de sacarose no meio nutritivo apresentou efeito significativo sobre a sobrevivência e o estabelecimento *in vitro* dos explantes de açoita-cavalo, os quais ajustaram-se a uma equação linear e de segundo grau respectivamente. As médias obtidas para sobrevivência reduziram-se com o aumento na concentração de sacarose, atingindo cerca de 97% com 10 g L<sup>-1</sup> e diminuindo para 88% na presença de 50 g L<sup>-1</sup> (Figura 1). Já o estabelecimento dos explantes atingiu uma média máxima de 96% a 20 g L<sup>-1</sup> (Figura 1), sendo que a Máxima Eficiência Técnica (MET) seria obtida a 19,87 g L<sup>-1</sup>. O índice de variação (IV) para a variável sobrevivência foi 3,38%, e para estabelecimento foi 4,73%.

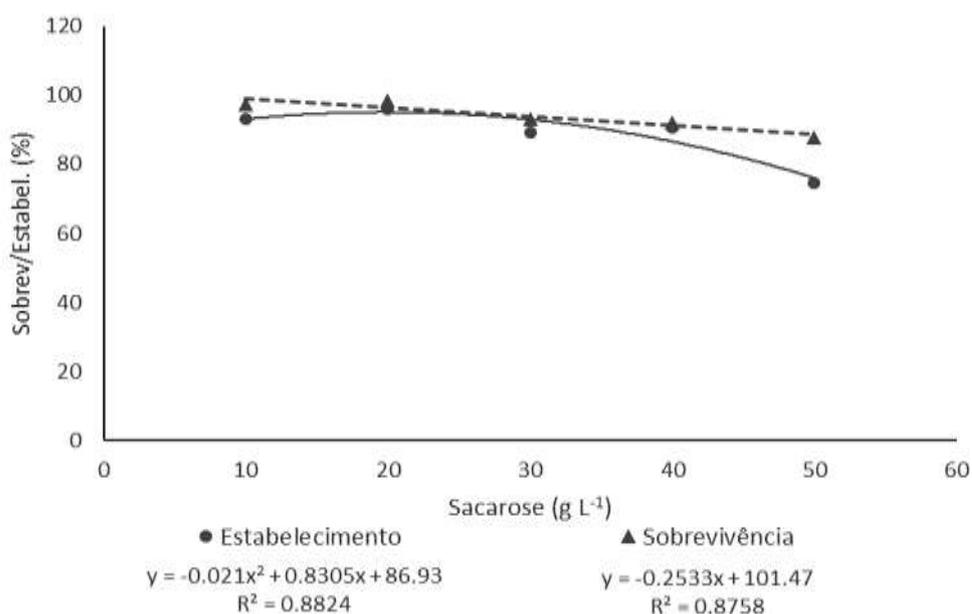


Figura 1. Porcentagem média de estabelecimento e sobrevivência *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Considerando-se que as plantas em condições de cultivo *in vitro* não podem realizar o processo de fotossíntese, a sacarose no meio nutritivo desempenha um papel de grande importância, ao assegurar seu crescimento e desenvolvimento. Isto

decorre do fato de que esta fonte de energia supre as exigências de carboidratos, proporcionando tanto a sua sobrevivência inicial, como seu posterior estabelecimento, que advém da formação de novos órgãos, quais sejam brotos, raízes e/ou folhas. Nesse sentido, o comportamento dos explantes em relação ao aumento nas concentrações de sacarose, para ambas as variáveis deste estudo, apresentam respostas similares até aproximadamente  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose no meio nutritivo, a partir da qual, a porcentagem de estabelecimento registrou quedas maiores comparada com a sobrevivência dos explantes, demonstrado nos respectivos ajustes. Essa resposta obtida para as duas variáveis, confere com Erig; Schuch (2003), confirmando que a sobrevivência dos explantes nem sempre garante a retomada do crescimento. Os resultados do presente estudo, sugerem, ainda, que o estabelecimento dos explantes não é determinado somente pela concentração de sacarose no meio nutritivo, uma vez que em concentrações superiores a  $20 \text{ g L}^{-1}$ , o estabelecimento de segmentos nodais de açaíta-cavalo tende a diminuir expressivamente.

O efeito das concentrações de sacarose na etapa inicial de cultivo *in vitro* dos explantes (sobrevivência e estabelecimento), refletiu-se na formação de segmentos nodais e folhas, assinalando a ocorrência de uma estreita relação entre todas essas variáveis. Tanto o número de segmentos nodais (IV= 7,63%) quanto o número de folhas (IV=7,35%) se ajustaram a equações polinomiais de segundo grau, sendo que as concentrações de sacarose mais eficientes, calculadas pela MET, foram de  $24,5 \text{ g L}^{-1}$  para número de folhas e  $27,6 \text{ g L}^{-1}$  para número de segmentos nodais (Figura 2).

Durante a aclimatização *ex vitro* das plantas, as folhas formadas nas etapas precursoras a esta, aliadas às condições ambientais em que serão dispostas para completar o processo de adaptação, desempenham papel fundamental na promoção do seu crescimento e desenvolvimento subsequente. Nesse sentido, a variável que apresenta relação com o número de folhas é o número de segmentos nodais produzidos, já que é na base destes que as folhas estarão inseridas. Isto significa que a formação de um número adequado de segmentos nodais poderá se refletir na formação de folhas, as quais desempenham importante papel no processo da fotossíntese das plantas.

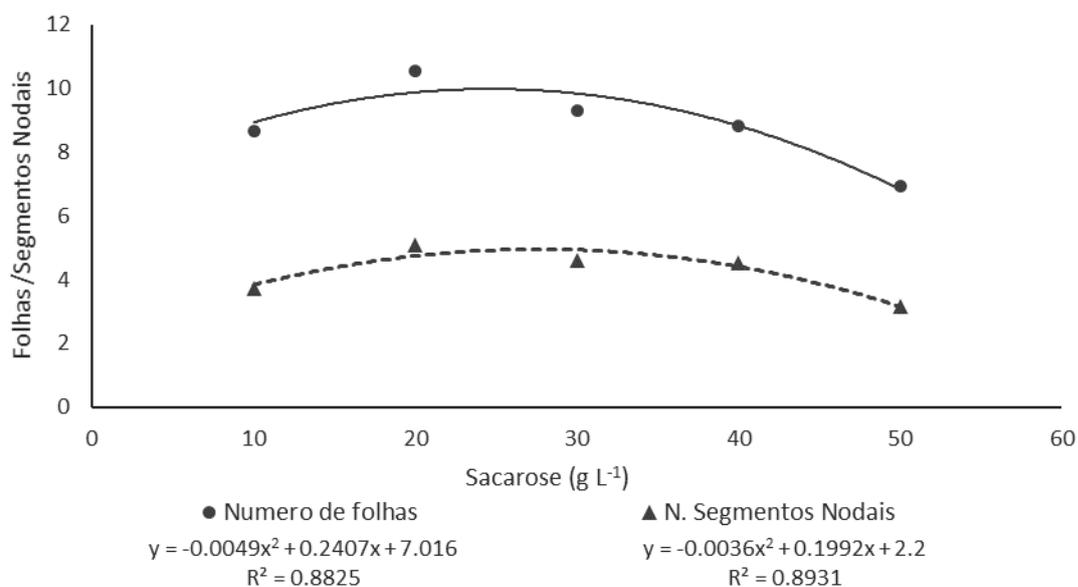


Figura 2. Número médio de folhas e número médio de segmentos nodais formados a partir do cultivo de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a resposta dos explantes tanto em relação à formação de segmentos nodais, como de folhas, refletiram um mesmo padrão. As concentrações mais eficientes, calculadas pela MET, demonstraram que existe uma concentração ótima de sacarose que pode ser adicionada ao meio nutritivo. Como resultado da sua utilização, é possível obter um máximo de formação de segmentos nodais e de folhas. Por outro lado, com o emprego da máxima concentração testada, além dos custos mais onerosos, não se evidenciou benefícios aos cultivos com relação à formação de novas partes vegetativas.

Quanto aos efeitos sobre a formação de raízes, primárias (IV=19,46%) e secundárias (IV=22,18%), os tratamentos testados apresentaram diferentes respostas, dependendo da concentração de sacarose no meio nutritivo. Para estas duas variáveis ajustaram-se equações polinomiais de segundo grau, sendo estimadas 37 g L<sup>-1</sup> e 32 g L<sup>-1</sup> as concentrações mais eficientes (MET) para raiz primária e raiz secundária respectivamente (Figura 3).

A formação de raízes em explantes cultivados *in vitro* guarda relação com vários fatores, dentre os quais destacam-se, além das características físicas apresentadas pelos explantes, suas características fisiológicas. Nesse viés, as

concentrações de sacarose adicionadas ao meio nutritivo utilizadas no presente ensaio, demonstraram exercer influência sobre a formação de raízes, tanto primárias como secundárias.

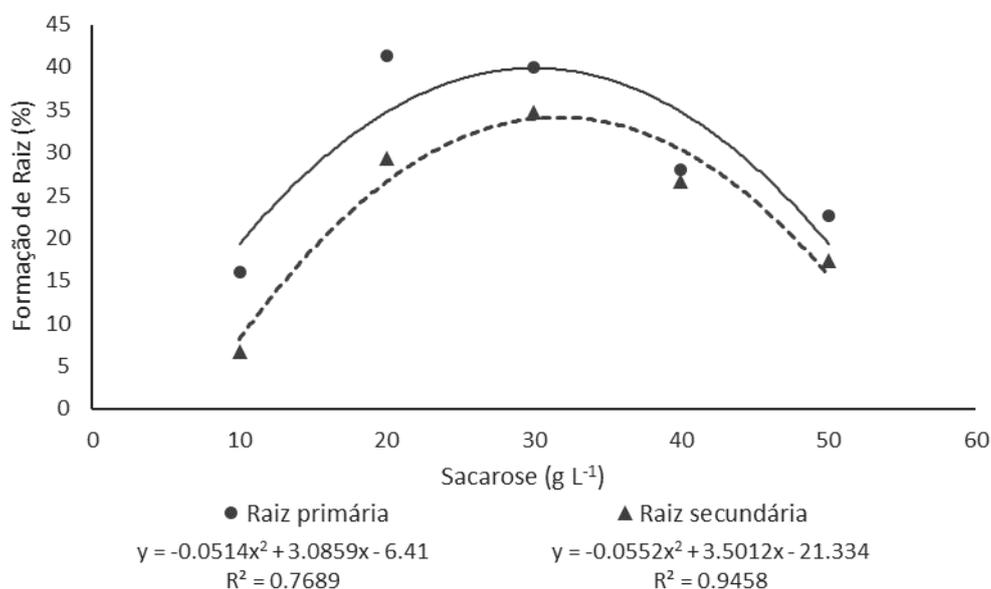


Figura 3. Porcentagem média de formação de raízes primária e secundárias, em segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

De acordo com o exposto na Figura 3, o pico de máxima formação de raízes ocorre ao redor de, aproximadamente, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, concentração utilizada rotineiramente na maioria dos trabalhos de cultura de tecidos vegetais (CALDAS, et al., 1998). No entanto, faz-se necessário destacar a ocorrência de um decréscimo na formação de raízes, quando ultrapassada essa concentração.

Por sua vez, tanto a porcentagem de clorose foliar (IV= 24,71%) como a de folhas em abscisão (IV=55,83%) foram ajustadas a equações lineares e em ambos os casos, o incremento nas concentrações de sacarose no meio nutritivo, foi acompanhado por elevação nessas médias. Embora, geralmente, as duas variáveis guardem grande relação, neste ensaio a tendência não foi necessariamente essa, visto que folhas que desenvolveram sintomas de clorose nem sempre acabaram abscissas, comportamento que pode ser observado nas tendências das retas que representam as equações de regressão (Figura 4). Assim, à medida que a linha de tendência da clorose foliar esteve crescente, acompanhando o aumento nas

concentrações de sacarose, a linha referente à abscisão foliar, embora também tenha demonstrado crescimento, se afastou da primeira.

Essa resposta também pode estar relacionada ao número de folhas produzidas, em que, nas concentrações mais elevadas de sacarose, foram registradas os menores números de folhas. Desta forma, uma justificativa seria que, estas folhas possam ter sido mais afetadas pela clorose, e, em menor nível pela abscisão, resposta que refletiria uma reação natural das plantas, visando garantir a manutenção mínima das suas funções vitais.

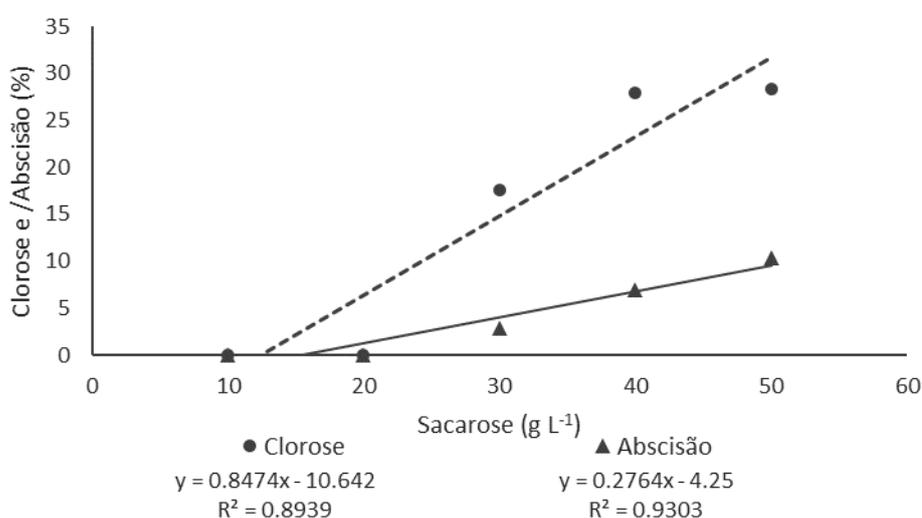


Figura 4. Porcentagem média de clorose e abscisão foliar em segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

As variáveis altura dos explantes e comprimento da raiz principal também responderam aos tratamentos apresentando comportamentos distintos, conforme foi alterada a concentração de sacarose no meio nutritivo. Em ambos os casos, as variáveis ajustaram-se a equações polinomiais de segundo grau, em que a concentração mais eficiente para altura de explantes seria obtida a 25 g L<sup>-1</sup> e, para comprimento de raiz principal, de 28,5 g L<sup>-1</sup> (Figura 5). Os valores de IV obtidos para as duas variáveis foram 7,84% para altura da parte aérea, e 48,51% para comprimento de raízes.

Diante dos resultados obtidos, infere-se que, nas condições testadas, a concentração 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi a que mais favoreceu o crescimento em altura dos explantes, embora a MET tenha apontado como concentração ideal para esta variável, o valor de 25 g L<sup>-1</sup>. Já o comprimento da raiz principal demonstrou melhor desempenho nas concentrações e 20 e 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo, sendo o valor de MET 28,5 g L<sup>-1</sup> a concentração na qual se obteria uma boa formação de raízes, atendendo às condições em que foram conduzidas este trabalho.

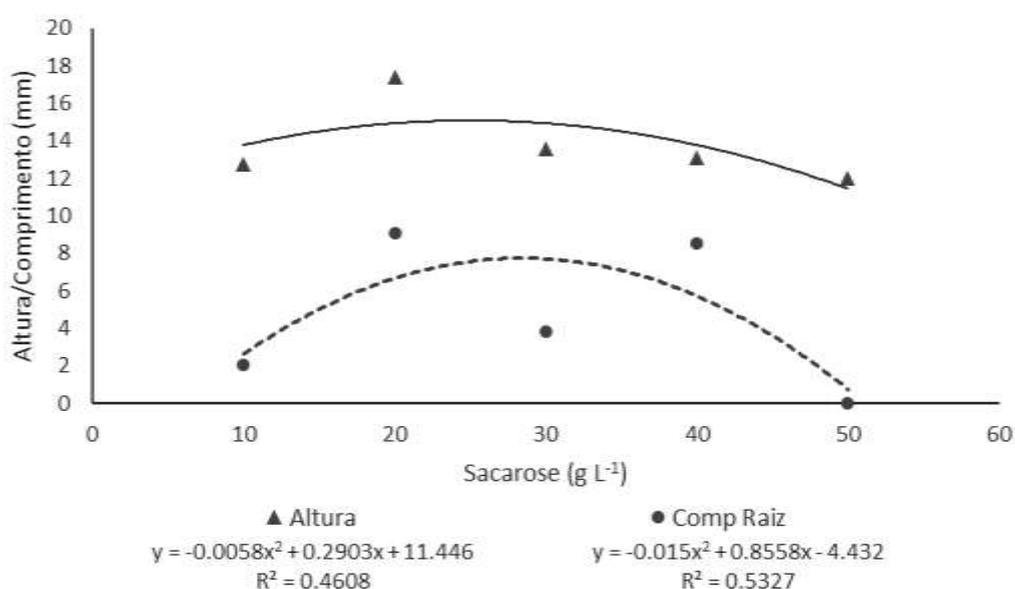


Figura 5. Altura média da parte aérea e comprimento médio das raízes produzidas em segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Existe o consenso de que o crescimento da parte radicular das plantas vincula-se com o crescimento da sua parte aérea, ao ponto que, na produção de mudas utilizando-se técnicas usuais, tais como via sementes, um dos parâmetros determinantes da qualidade das mudas, é a relação raiz/parte aérea. Assim, transcender esta premissa para plantas produzidas por meio de técnicas de cultura de tecidos poderia ser igualmente válida, sobretudo para predizer a resposta que essas plantas podem fornecer quando dispostas em condições ambientais de maior exigência.

Quanto à massa fresca total dos explantes (IV=15,55%), após 30 dias de cultivo *in vitro*, essa variável, que, também, apresentou influência das concentrações de sacarose, se ajustou a uma equação polinomial quadrática, sendo a concentração ótima de 38,1 g L<sup>-1</sup>, enquanto a massa seca total (IV= 16,67%) foi explicada por uma equação linear (Figura 6). Ao contrário do que, genericamente, poderia ser esperado, a produção de massa fresca não acompanhou o aumento nas concentrações de sacarose, uma vez que se entende que o aumento no fornecimento de carboidratos, também poderia elevar a produção de massa fresca. Para essa variável, obtiveram-se picos elevados de massa fresca nas concentrações 20 g L<sup>-1</sup> e 50 g L<sup>-1</sup>, enquanto as concentrações 30 g L<sup>-1</sup> e 40 g L<sup>-1</sup> produziram quase o mesmo valor, ou seja, aparentemente, já a partir da segunda concentração testada, o comportamento respondeu de maneira muito semelhante ao observado no maior suprimento da fonte energética fornecido (Figura 6).

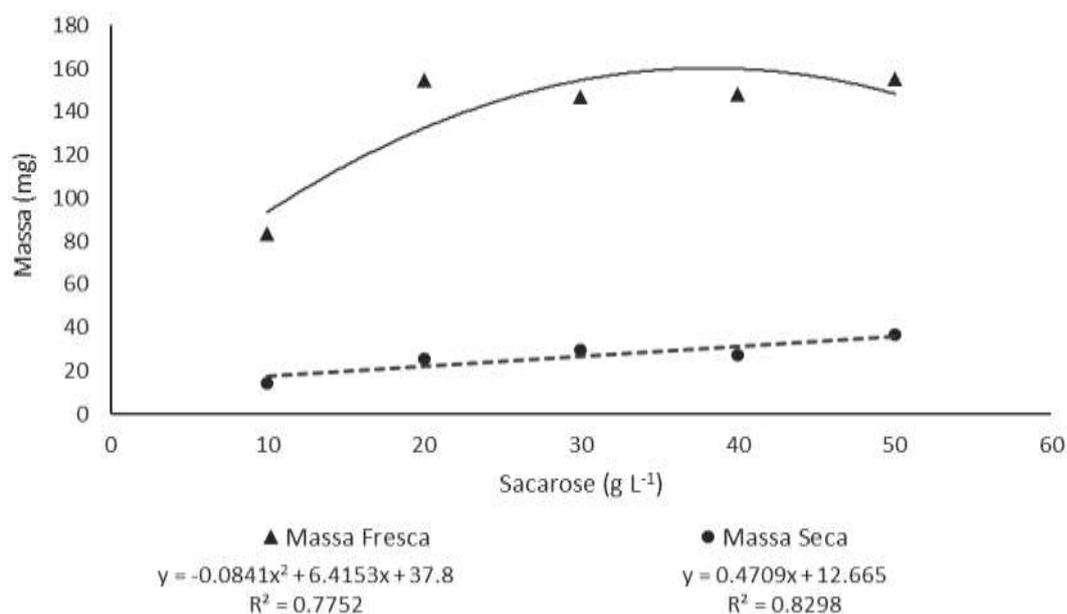


Figura 6. Massa fresca média e massa seca total média dos segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Ao contrário do que aconteceu com a produção de massa fresca das plantas, a produção de massa seca acompanhou o aumento nas concentrações de sacarose

no meio nutritivo, exceto no tratamento que recebeu  $40 \text{ g L}^{-1}$ , no qual a produção de massa seca teve um pequeno decréscimo, elevando-se, novamente, a  $50 \text{ g L}^{-1}$ .

Uma possível explicação para as diferenças obtidas nos comportamentos dos valores observados para massa fresca e massa seca, pode vincular-se à influência do conteúdo de água ainda presente no material vegetal durante a determinação da primeira variável. Assim, uma vez que este tenha sido submetido ao processo de secagem em estufa, a perda de água decorrente disto, pode explicar o comportamento desigual identificado, já que na variável massa seca, provavelmente restaria somente a parte da massa que reflete a real conversão da fonte energética em componentes estruturais da planta.

### 6.5.2 Experimento II

#### **Período de aclimatização *in vitro*** (7 dias de cultivo em sala de crescimento)

No período de aclimatização *in vitro* das plantas de açoita-cavalo, no qual procedeu-se à abertura de 50% da superfície de vedação de cada frasco, a formação de raízes, para transferência das plantas ao 1º período de aclimatização *ex vitro*, foi considerada àquela formada no experimento I. As variáveis sobrevivência (IV=12,82%), estabelecimento (IV=12,82%) e número de folhas (IV=6,48%) foram influenciados de maneira significativa pela concentração de sacarose (Figura 7). Foram ajustadas equações polinomiais de segundo grau para todas as variáveis, onde as variáveis sobrevivência e estabelecimento, apresentaram médias idênticas, e obtiveram a mesma equação resultante (Figuras 7A; 7B). Para essas duas variáveis, a concentração de  $18,5 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose foi estimada como a mais eficiente (MET). A variável número de folhas, apresentou resposta quadrática (Figura 7C), sendo estimada  $26,6 \text{ g L}^{-1}$  como a concentração onde a formação de folhas seria máxima (MET). O número de folhas formadas, nesse período da aclimatização, registrou quedas a partir de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose.

Observou-se que uma vez os explantes foram submetidos a condições ambientais mais exigentes, as respostas de sobrevivência diminuíram, de maneira inversamente proporcional às concentrações de sacarose no meio nutritivo, registrando assim, quedas na porcentagem de sobrevivência, em detrimento da manutenção dos explantes estabelecidos. Além da condição ambiental mais

exigente ao que os explantes foram expostos, cabe mencionar, também, que a contaminação causada por agentes fúngicos (dados não amostrados), influenciou de maneira significativa na diminuição de plantas com boas características físicas e fisiológicas disponíveis para transferência ao próximo período do processo de aclimatização. A exposição direta ao ambiente, e as concentrações mais elevadas de carboidrato no meio nutritivo, talvez influenciaram para uma rápida proliferação desses agentes contaminantes. A maior perda de plantas ocorreu nos tratamentos onde as concentrações de sacarose foram superiores a 30 g L<sup>-1</sup>.

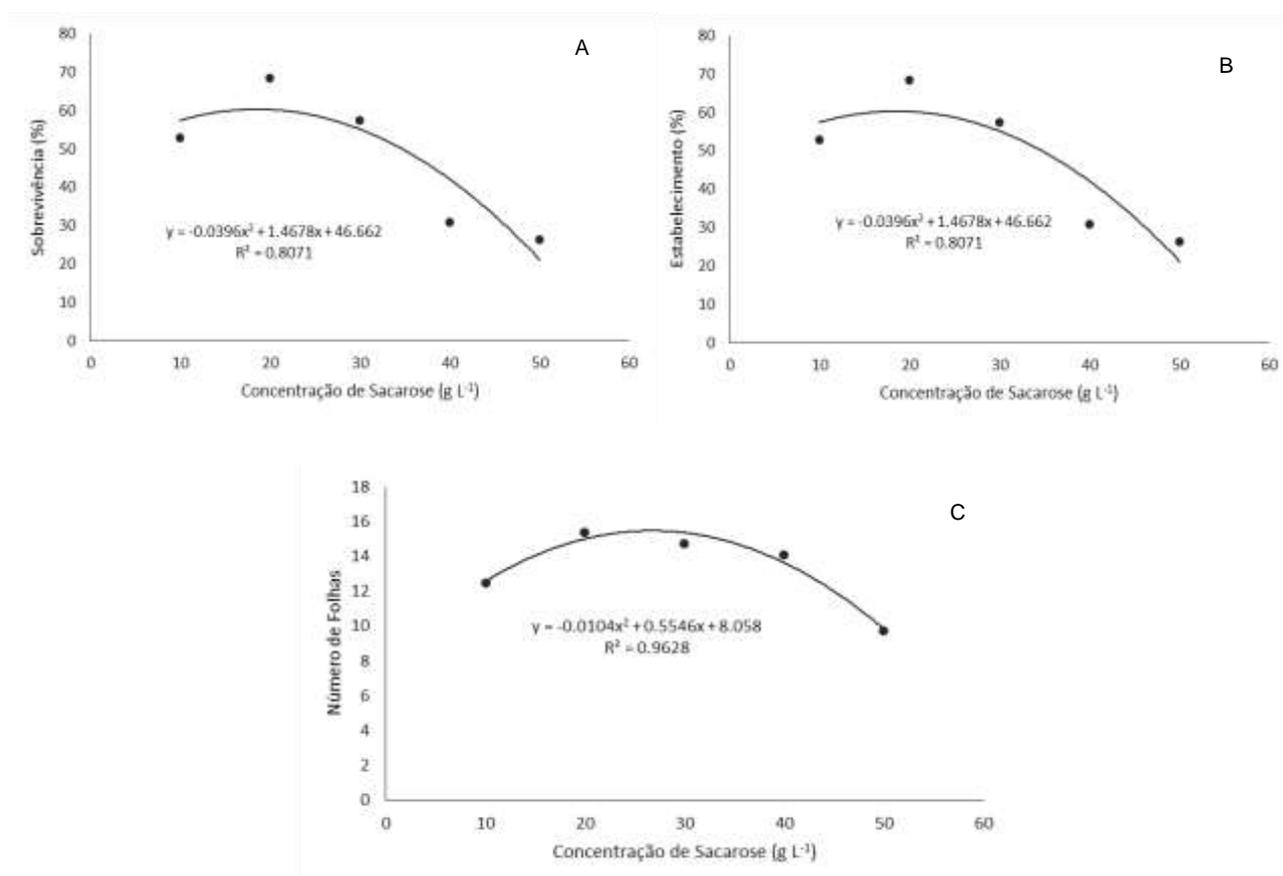


Figura 7. Médias de sobrevivência (A), estabelecimento (B), e número de folhas (C) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no primeiro período de aclimatização *in vitro* (sete dias de cultivo em sala de crescimento a 25±3 °C, 16h de fotoperíodo e 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa) UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

**1º Período de aclimatização *ex vitro*** (7 dias de cultivo *in vitro* em sala de crescimento, copos cobertos)

No 1º período de aclimatização *ex vitro* das plantas de açoitacavalo propagadas *in vitro*, no qual procedeu-se à transferência das mudas que tiveram enraizamento bem sucedido no experimento I, as variáveis sobrevivência (IV=15,6%), estabelecimento (IV=15,6%) e número de folhas (IV=16,9%) não foram afetadas de maneira significativa pelos fatores testados (sacarose e tipo de substrato), tampouco pela interação entre eles. Para as concentrações de sacarose foram ajustadas equações lineares para as variáveis sobrevivência e estabelecimento, as quais, apresentando médias idênticas, obtiveram a mesma equação resultante (Figuras 8A e 8B). Da mesma forma, para a variável número de folhas, foi ajustada uma equação linear (Figura 8C). Nesse caso, a resposta dos explantes foi inversamente proporcional às concentrações crescentes de sacarose adicionadas no meio nutritivo. Observou-se assim, que, na fase preparatória da aclimatização *ex vitro*, nas plantas provenientes de meios nutritivos contendo 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a sobrevivência e o estabelecimento foram maiores em comparação às oriundas das demais concentrações testadas, decrescendo conforme essas foram aumentando. Resposta semelhante foi observada na formação de folhas.

A altura dos explantes (IV=24,4%), neste período da aclimatização, teve interação significativa entre os fatores testados, ajustando-se apenas para equações polinomiais de terceiro grau (Figura 8D). A relação entre as concentrações de sacarose, e o tipo de substrato apresentou variações consideráveis na resposta para esta variável. Ao observar as curvas da equação ajustada, pode-se inferir que com o emprego de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo, na etapa de pre-aclimatização, independente do tipo de substrato utilizado, e após permanência por sete dias em sala de cultivo, com temperatura e fotoperíodo controlados, as plantas irão atingir alturas semelhantes, com valores em torno de 17 mm, aproximadamente.

Com o aumento nas concentrações de sacarose no meio nutritivo, o crescimento em altura dos explantes demonstrou respostas fortemente relacionadas ao tipo de substrato, tanto que, na concentração de 40 g L<sup>-1</sup>, a altura dos explantes variou entre 3,86mm e 19,43mm para os substratos H-Decker® e Mecplant®, respectivamente, enquanto que, com 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, o efeito observado foi o oposto. Assim, nesta condição, plantas cultivadas no primeiro substrato, obtiveram altura média de 14,5mm e as plantas transferidas para o Mecplant®, apresentaram 4,33mm de altura média.

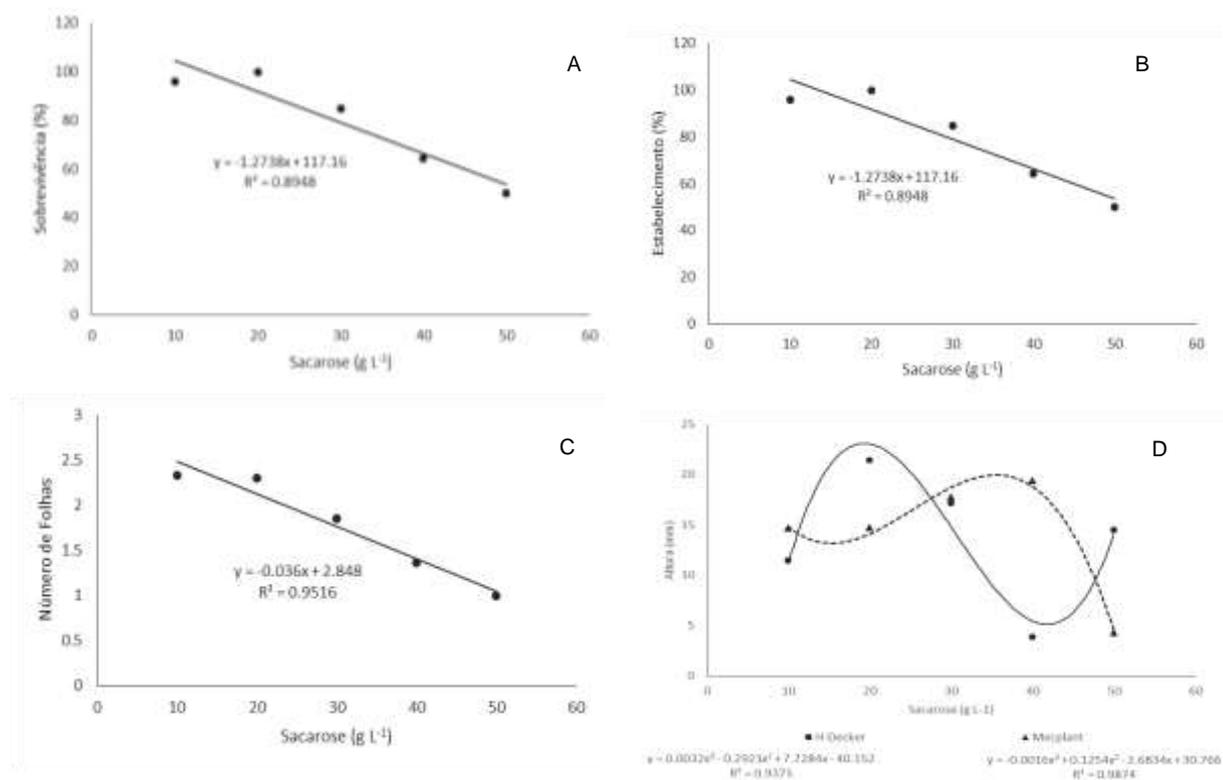


Figura 8. Médias de sobrevivência (A) e estabelecimento (B), e número de folhas (C) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 1º período de aclimatização *ex vitro* (sete dias de cultivo em sala de crescimento a  $25\pm 3$  °C, 16h de fotoperíodo e  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa), em copos plásticos com capacidade para 250 mL, cobertos com copo plástico de mesmo volume, independentemente do substrato em que foram cultivadas. Médias de altura de plantas (D) de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação, durante 45 dias, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 1º período de aclimatização *ex vitro* (sete dias de cultivo em sala de crescimento a  $25\pm 3$  °C, 16h de fotoperíodo e  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa) em copos plásticos com capacidade para 250 mL, cobertos com copo plástico de mesmo volume, em função do substrato em que foram cultivadas. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

**2º período de aclimatização *ex vitro*** (7 dias de cultivo em sala de crescimento, copos abertos)

Após os sete dias iniciais de aclimatização *ex vitro*, cujos resultados foram anteriormente descritos, na sequência, desta feita com os recipientes sem cobertura, as variáveis sobrevivência (IV=12,2%), número de folhas (IV=13,5%) e altura das plantas (IV=20,2%) apresentaram interação significativa entre os fatores, ajustando-se a equações polinomiais (Figuras 9A, C e D). Já o estabelecimento *in vitro*

(IV=24,3%) foi afetado significativamente apenas pelas concentrações de sacarose, ajustando-se a uma equação linear (Figura 9B).

Analisando-se as respostas das plantas quando ainda estavam sendo cultivadas em sala de crescimento, com ambiente controlado, sete dias após a retirada da cobertura dos recipientes em que estavam sendo mantidas, pode-se perceber melhor o efeito dos fatores sobre as culturas. Para a sobrevivência, por exemplo (Figura 9A), em que foram ajustadas equações de segundo grau, nota-se que as concentrações de sacarose exerceram efeito evidente, com as plantas cultivadas no substrato H-Decker® registrando picos de sobrevivência nas concentrações  $10 \text{ g L}^{-1}$  e  $20 \text{ g L}^{-1}$ , diminuindo, gradualmente, na presença de  $30 \text{ g L}^{-1}$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$ , para, finalmente, manifestar um novo aumento a  $50 \text{ g L}^{-1}$ , sendo  $44 \text{ g L}^{-1}$  a MET calculada. Entretanto, o substrato Mecplant® demonstrou estabilidade até a concentração  $30 \text{ g L}^{-1}$ , proporcionando 100% de sobrevivência, caindo, nas duas últimas concentrações, para 83% e 33% na presença de  $40 \text{ g L}^{-1}$  e  $50 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose respectivamente, a MET calculada foi de  $21 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose.

As porcentagens médias de estabelecimento, que foram influenciadas apenas pelas concentrações de sacarose, foram ajustadas a uma equação de primeiro grau (Figura 9B). Observou-se um decréscimo no estabelecimento, uma vez que 85% das plantas se estabeleceram na concentração mais baixa ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), enquanto somente 25% a  $50 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (Figura 9B). Essa resposta indica que, nem sempre o explante que sobrevive consegue se estabelecer e desenvolver novas partes vegetativas (ERIG; SCHUCH, 2003). Da mesma maneira, o emprego de sacarose em concentrações mais elevadas, visando garantir um maior suprimento energético, nem sempre se reflete em benefícios para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Concentrações altas de sacarose no meio nutritivo podem aumentar a concentração de etileno (SANTOS et al., 2011), também podem aumentar a pressão osmótica do meio nutritivo (CALDAS et al., 1998), em detrimento da qualidade do desenvolvimento do explante.

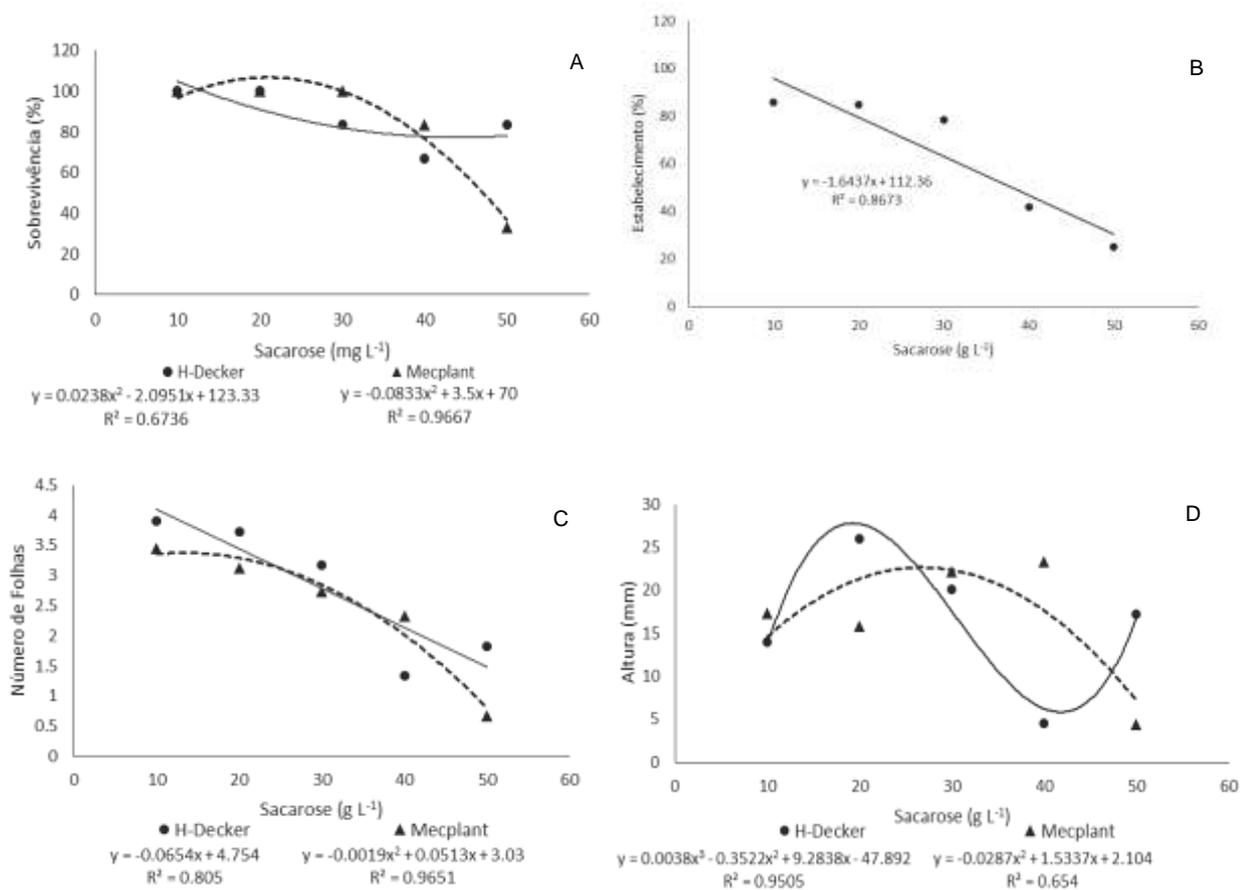


Figura 9. Médias de sobrevivência (A), número de folhas (C) e altura (D) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 2º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo em sala de crescimento (a 25±3°C, 16h de fotoperíodo e 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa) em copos plásticos com capacidade para 250 mL, em função do substrato em que foram cultivadas. Médias de estabelecimento (B) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação, durante 45 dias, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 2º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo em sala de crescimento (a 25±3°C, 16h de fotoperíodo e 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa) em copos plásticos com capacidade para 250 mL, independentemente do substrato em que foram cultivadas. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

O número de folhas formadas, neste 2º período de aclimatização *ex vitro*, apresentou respostas diferentes em relação ao tipo de substrato utilizado (Figura 9C). Com o emprego do substrato H-Decker®, o número de folhas se manteve com pouca variação até a concentração 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (entre 3 a 4 folhas), diminuindo esta média em mais de 50% a 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose, ajustando-se a uma equação de primeiro grau. Entretanto, com o uso de Mecplant®, a produção de

folhas, que se ajustou a uma equação de segundo grau, foi diminuindo com o aumento nas concentrações de sacarose que foi utilizada na fase de pre-aclimatização. Comparando a eficiência dos dois substratos para formação de novas folhas no processo de aclimatização *ex vitro* de plantas de açoitaca-cavalo, o H-Decker® foi mais eficiente, uma vez que conseguiu produzir maior número, apesar de que, a partir de uma determinada concentração de sacarose no meio nutritivo que deu origem às plantas, a resposta não foi satisfatória.

A altura das plantas foi influenciada, também, por ambos os fatores estudados, concentração de sacarose e tipo de substrato, porém, da mesma maneira que a variável número de folhas, a resposta variou de acordo com o substrato empregado (Figura 9D). O crescimento em altura das plantas cultivadas em substrato H-Decker®, durante esta fase, ajustou-se a uma equação de terceiro grau, apresentando médias altas e baixas, em função das diferentes concentrações de sacarose. Na Figura 9D pode-se notar que as plantas com maiores médias de altura (26mm) foram obtidas neste substrato com plantas cultivadas, inicialmente, com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo. No entanto, com a concentração 40 g L<sup>-1</sup> foi obtida uma altura média de 4,5mm que aumentou para 17,66mm na presença de 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Já quando as plantas foram aclimatizadas no substrato Mecplant®, as médias de altura ajustaram-se a uma curva de segundo grau, a qual registrou o seu valor máximo (23,33mm) na presença de 40 g L<sup>-1</sup> no meio nutritivo e o mínimo (4,33mm), na concentração máxima testada (50 g L<sup>-1</sup>). Ou seja, exatamente o contrário do que foi observado com o substrato H-Decker®. Com o emprego de Mecplant®, a altura máxima (MET) seria obtida na presença de 26,72 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Essas variações, de quase 400% de aumento, no primeiro caso, e de mais de 500% de redução, no segundo, observadas nas médias de altura com o emprego das duas concentrações mais altas, demonstra, mais uma vez, que o aumento nas concentrações de sacarose nem sempre é refletido em ganhos para as plantas, e, simultaneamente, que a composição, física e química, do substrato influencia o crescimento em altura das plantas de *Luehea divaricata* em processo de aclimatização.

A disposição das plantas em bandejas, mantendo-se uma lâmina de água em sua base, também pode ter favorecido a sobrevivência e o estabelecimento das plantas, evitando perdas de umidade dos substratos, as quais poderiam ser

prejudiciais para as plantas. Igualmente, contribuiu para amenizar essa passagem do ambiente *in vitro*, com todos os suprimentos nutricionais garantidos, para uma condição em que a disponibilidade de nutrientes não poderia ser totalmente satisfeita.

**3º período de aclimatização *ex vitro*** (7 dias de cultivo em casa de vegetação climatizada)

As plantas mantidas em casa vegetação no terceiro período de aclimatização *ex vitro* (após 21 dias de cultivo), apresentaram interação significativa dos fatores estudados sobre a variável altura das plantas (IV=33,4%), enquanto a sobrevivência (IV=29,6%), o estabelecimento (IV=35,9%) e o número de folhas (IV=32,3%) foram influenciados, de maneira significativa, apenas pela sacarose (Figura 10). Enquanto a sobrevivência e o estabelecimento tiveram seu desempenho ajustado a equações polinomiais de segundo grau (Figura 10A), o número de folhas ajustou-se a uma equação de primeiro grau (Figura 10B) e a altura de plantas foi ajustada a uma equação de terceiro grau (Figura 10C).

As porcentagens de sobrevivência (MET=32,5 g L<sup>-1</sup>) e estabelecimento (MET=23,3 g L<sup>-1</sup>), responderam de maneira semelhante até a concentração 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (médias de 86,67%) (Figura 10A). A partir dessa concentração, as respostas de cada uma das variáveis foi diferente em, pelo menos, 50% entre suas médias, observando-se na concentração 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose 82% de sobrevivência e apenas 45% de estabelecimento, igual resposta foi obtida a 50 g L<sup>-1</sup>, sendo que, do total de plantas inicialmente transferidas para a casa de vegetação, 58% sobreviveram, mas somente 25% conseguiram se estabelecer.

O número de folhas formadas seguiu um modelo linear, onde a concentração que se mostrou mais eficiente foi a de 20 g L<sup>-1</sup>, aumentando ligeiramente na concentração 20 g L<sup>-1</sup>, a partir da qual o número de folhas produzidas mostrou-se inversamente proporcional às concentrações de sacarose no meio nutritivo (Figura 10B).

A variável altura das plantas apresentou respostas antagônicas para algumas concentrações de sacarose (Figura 10C). Somente nas concentrações 10 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup> os valores de altura estiveram relativamente equivalentes. No entanto, na presença de 20 g L<sup>-1</sup>, 40 g L<sup>-1</sup> e 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, estes valores se mostraram

opostos para cada tipo de substrato testado: com 20 g L<sup>-1</sup> no substrato Mecplant® foi obtida uma média de 14,87mm de altura, no substrato H-Decker®, a altura média foi de 32,5mm, médias menos discrepantes que aquelas observadas na concentração 40 g L<sup>-1</sup>, 4,5mm para H-Decker® e 29,2mm para Mecplant®.

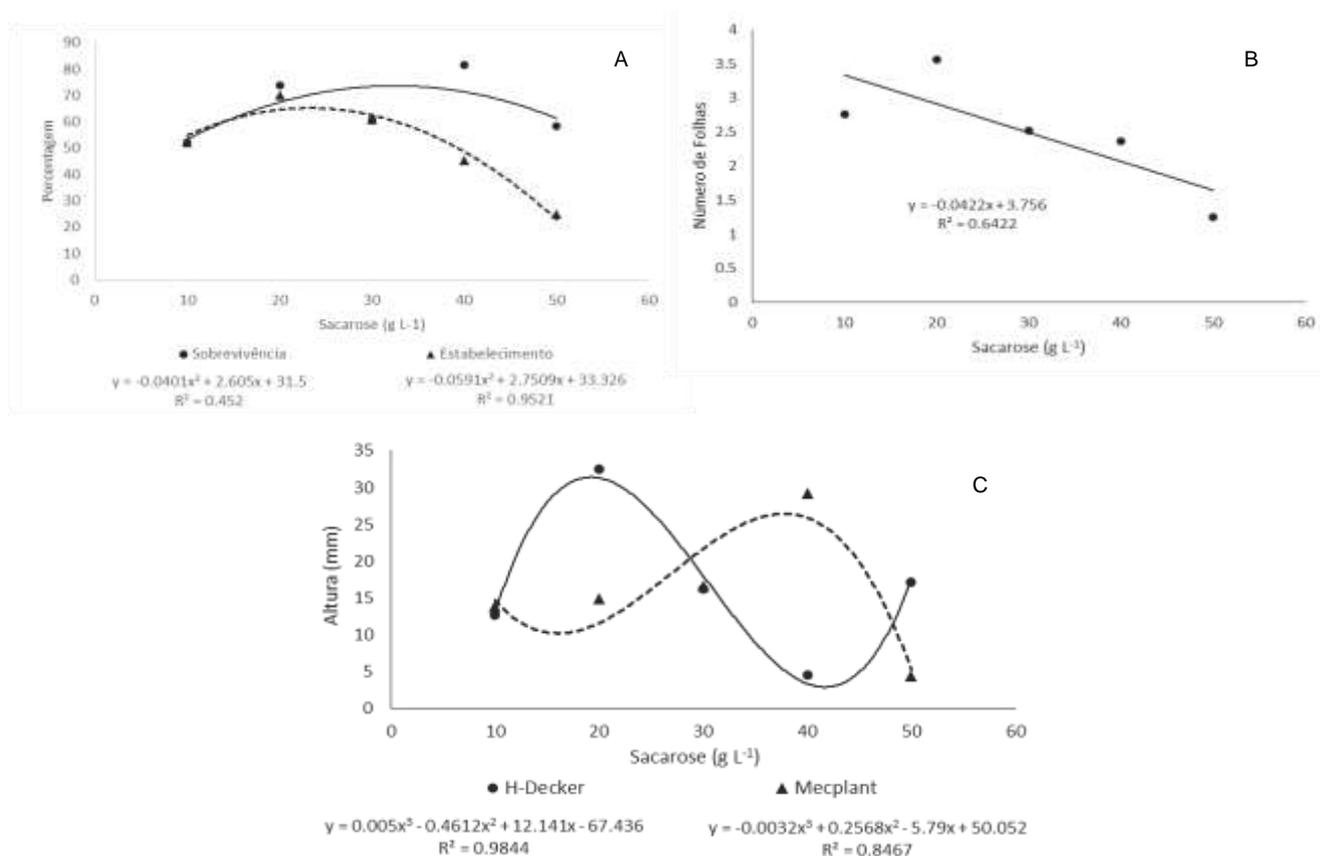


Figura 10. Porcentagens médias de sobrevivência e estabelecimento (A) e número médio de folhas (B) de plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação durante 45 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 3º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo casa de vegetação climatizada, em copos plásticos com capacidade para 250 mL, cobertos com copo plástico de mesmo volume, independentemente do substrato em que foram cultivadas. Altura média das plantas (C) de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) oriundas de micropropagação, durante 45 dias, em meio nutritivo WPM acrescido de diferentes concentrações de sacarose, no 3º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 7 dias de cultivo em casa de vegetação climatizada, em copos plásticos com capacidade para 250 mL, em função do substrato em que foram cultivadas. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

**4º período de aclimatização *ex vitro*** (28 dias de cultivo em casa de vegetação não climatizada)

No 4º período de aclimatização *ex vitro*, as variáveis porcentagem de estabelecimento (IV=22,4%), número de folhas (IV=19,4%) e altura das plantas (IV=25,5%) apresentaram efeito significativo apenas para o fator concentração de sacarose. As concentrações de sacarose, no meio nutritivo de culturas *in vitro* que foram submetidas, posteriormente, ao processo de aclimatização *ex vitro*, demonstraram estar relacionadas às porcentagens de sobrevivência (IV=17,9%) e de estabelecimento, desde as concentrações mais reduzidas até a concentração de 30 g L<sup>-1</sup>, a mais utilizada em experimentos de cultura de tecidos vegetais. Concentrações maiores até favoreceram a sobrevivência das plantas, mas não contribuíram, da mesma maneira, para a obtenção de elevadas taxas de estabelecimento (Figura 11A).

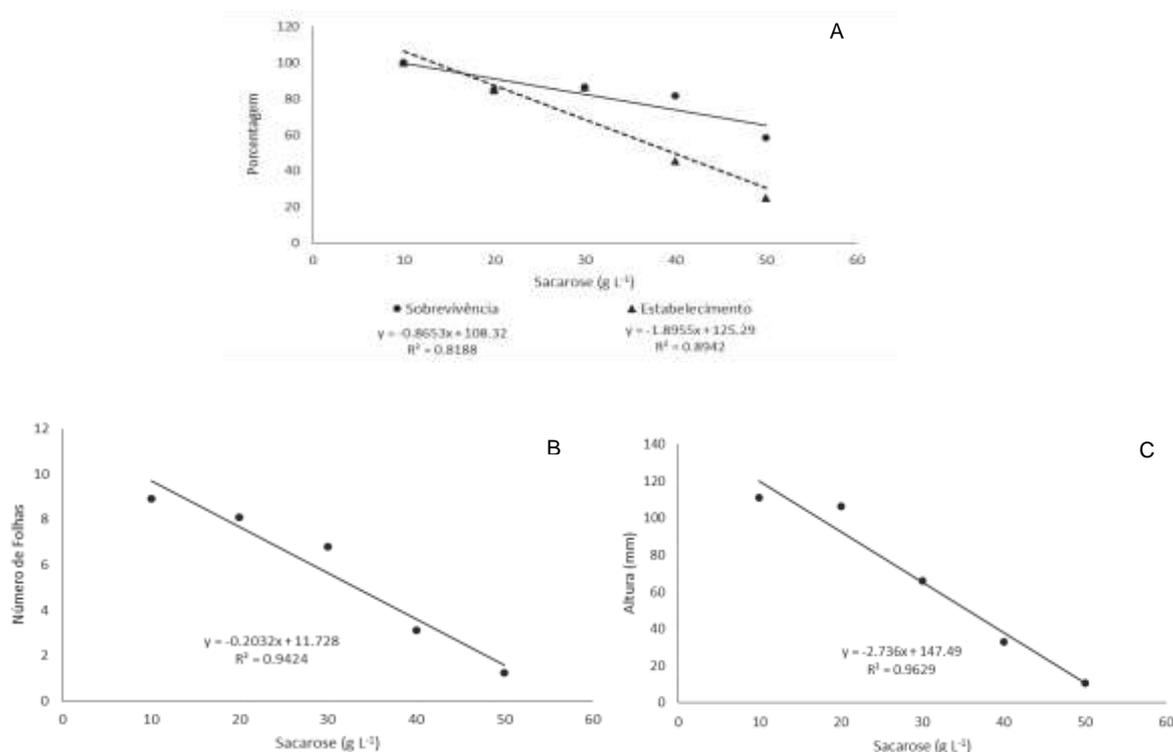


Figura 11. Porcentagens médias de sobrevivência e estabelecimento (A), número médio de folhas (B) e altura média (C) em plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açóita-cavalo) em função das concentrações de sacarose do meio nutritivo WPM do cultivo inicial, de 45 dias, no 4º período de aclimatização *ex vitro*, constituído por 28 dias de cultivo em casa de vegetação não climatizada, em vasos de 1L preenchidos com 1L de substrato, independentemente do substrato. As plantas foram submetidas, previamente, a 7 dias de aclimatização *in vitro* seguida de 21 dias de aclimatização *ex vitro*. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

O número de folhas produzidas, em relação às diferentes concentrações de sacarose, teve uma relação inversa: aumentando-se a sacarose, o número de folhas produzidas foi diminuindo, reportando valores que podem ser considerados razoáveis, com o uso de 10 g L<sup>-1</sup> até 30 g L<sup>-1</sup>. Contudo, a partir desta concentração, a produção foi baixando em proporções praticamente geométricas (Figura 11C).

A resposta da variável altura foi semelhante àquela obtida para o número de folhas, porém, com menor faixa de concentrações que podem ser consideradas eficientes. As plantas com maiores crescimentos em altura foram obtidas nas concentrações de 10 g L<sup>-1</sup> (111mm) e 20 g L<sup>-1</sup> (106,2mm). Já para 30 g L<sup>-1</sup>, 40 g L<sup>-1</sup> e 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, as plantas apresentaram reduções, com médias de altura que corresponderam a 66mm, 33,1mm e 10,8mm respectivamente (Figura 11B).

Em *Cabralea canjerana* (canjarana), segmentos nodais enraizados *in vitro* com 5 ou 10 mM de ácido indolbutírico (AIB) no meio nutritivo MS ou WPM, transferidos para recipientes contendo substrato Plantmax® e mantidos por 30 dias em casa de vegetação, apresentaram até 95% de sobrevivência (ROCHA et al., 2007a).

Entretanto, brotações de *Cedrela odorata* (cedro-rosa) enraizadas em biorreatores de imersão temporária, submetidos a um processo de aclimatização *ex vitro*, que consistiu na transferência das plantas para sacos plásticos com substrato composto por turfa e perlita (70%:30%; v/v) e mantidas em casa de vegetação por três meses, as plantas apresentaram 98% de sobrevivência (PEÑA-RAMIREZ et al., 2010).

Também foram realizados ensaios de aclimatização *ex vitro* em *Gmelina arborea*, sendo transferidas plantas enraizadas *in vitro* para vasos plásticos preenchidos com vermiculita e mantidas em câmara de crescimento. Nesse caso, foram obtidos até 90% de sobrevivência em períodos que variaram de quatro a oito semanas (SUKARTININGSIH; IDE, 1999). No entanto, na aclimatização *ex vitro* de *Ficus carica*, provenientes do cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM por diferentes tempos (15; 30; 45 e 60 dias), foram observadas porcentagens de sobrevivência de até 95% em substratos composto pela mistura de Plantmax® e Vermiculita (CHIRINÉA et al., 2012). Os autores afirmaram, adicionalmente, que, com um tempo de 30 dias no meio nutritivo, já são obtidos resultados satisfatórios no processo de aclimatização *ex vitro*.

Trabalhos relacionados à aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas também foram realizados em *Genipa americana* (ROCHA et al., 2008), clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (BANDEIRA, et al., 2007); plantas de *Paulownia tomentosa* (BAHRI; BETTAIEB, 2013), *Eucalyptus saligna* (SILVA et al., 2011), entre outros, todos eles reportando elevados níveis de sobrevivência. O estado da ciência da aclimatização *ex vitro* de mudas de espécies florestais nativas produzidas na cultura de tecidos é, ainda, incipiente. Porém, o avanço das técnicas e a progressiva disponibilização de resultados obtidos nos trabalhos que vêm sendo conduzidos nos últimos tempos poderão contribuir para o aumento e aperfeiçoamento dos testes que vêm sendo realizados.

## 6.6 Conclusões

Com a utilização de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo WPM, utilizado na micropropagação de segmentos nodais de açoitacavalo, é possível obter plantas enraizadas e com adequadas características físicas, aptas a serem submetidas ao processo de aclimatização *ex vitro*.

Procedimentos de aclimatização progressiva a ambientes sem controle de umidade e da temperatura, que permitam uma mudança gradual nas condições ambientais em que as plantas micropropagadas são cultivadas, tais como o descrito no presente estudo, podem ser empregados para se obter sucesso na aclimatização *ex vitro*.

A aclimatização *ex vitro* de plantas de açoitacavalo obtidas via cultura de tecidos pode ser efetuada, com sucesso, empregando-se qualquer um dos substratos testados.

## 6.7 Referências bibliográficas

BAHRI, N.B.; BETTAIEB, T. *In vitro* propagation of a forest tree *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. - A valuable medicinal tree species. **Albanian Journal of Agricultural Sciences**, v. 12, n. 1, p. 37 – 42, 2013.

BANDEIRA, F.S. et al. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 31, n. 5, p. 773-781, 2007.

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

CARVALHO, P.E.R. Açoita-Cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular Técnica 147**. Colombo, PR, Outubro, 2008.

CHIRINÉA, C.F. et al. Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 4, p. 1180-1188, 2012.

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

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

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

MILLÁN-OROZCO, L.; CORREDOIRA, E.; SAN JOSE, M.C. In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 59, n. 1, p. 447-453, 2011.

PEÑA-RAMIREZ, Y.J. et al. Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species.

**In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 149 – 160, 2010.

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

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

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

ROCHA, M.A.C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

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

ROCHA, P.S.G. et al. Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 32-40, 2007b.

SANTOS, M.C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SILVA, A.L.L. et al. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 179-184, 2011.

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

SOUZA JUNIOR, E.E.; BARBOZA, S.B.S.C.; SOUZA, L.A.C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] cv. Pérola, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás – MG, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

SUKARTININGSIH, K.N.; IDE, Y. Clonal propagation of *Gmelina arborea* Roxb. by *in vitro* culture. **Journal Forest Research**, v. 4, p. 47-51,1999.

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

WENDLING, I.; DUTRA, L.F. **Produção de mudas de Eucalipto**. Embrapa Florestas, Colombo, 1 Ed. p. 39, 2010.

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

## 7 CAPITULO V

### CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANITOL E SACAROSE

#### 7.1 Resumo

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc. é uma espécie florestal nativa dos biomas Mata Atlântica e Pampa, cuja população tem sido amplamente explorada. A conservação *in vitro* pode se constituir em uma alternativa para garantir a disponibilidade de genótipos para emprego em eventuais programas de melhoramento e projetos ambientais. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do manitol, associado ou não à sacarose, sobre o desempenho *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata*. Os tratamentos consistiram da combinação de concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e de manitol (0; 10; 20 ou 30 g L<sup>-1</sup>), avaliados em quatro períodos de cultivo *in vitro* (30; 60; 90 e 120 dias), conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. Avaliações foram realizadas a cada 30 dias, analisando: sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, oxidação fenólica, formação *in vitro* de raízes, clorose e abscisão foliar, todas em porcentagem, também foram, avaliados o número de folhas e o número de brotos. Aos 120 dias de cultivo, foram mensurados a altura dos explantes (mm) e o comprimento da raiz principal (mm), quando presente. As principais variáveis relacionadas ao desenvolvimento *in vitro* de *Luehea divaricata*, formação de brotos, formação de raízes e formação de folhas, são controlados quando aumenta a concentração de manitol no meio nutritivo, combinado com baixas concentrações de sacarose. O regulador osmótico manitol, combinado com concentrações de sacarose até 15 g L<sup>-1</sup>, no meio nutritivo ½ MS, é eficiente no controle do crescimento de segmentos nodais de *Luehea divaricata*, conservando os explantes em boas condições para seu estabelecimento, após 120 dias de cultivo *in vitro*.

**Palavras-chave:** crescimento mínimo, regulador osmótico, germoplasma.

## **IN VITRO CONSERVATION OF *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. IN DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MANNITOL AND SUCROSE**

### **7.2 Abstract**

*Luehea divaricata* Mart. & Zucc. is a native tree species of the Atlantic Forest and Pampa biomes, whose population has been widely exploited. The *in vitro* conservation may be a promising alternative to ensure the availability of employable genotype in any breeding program and environmental projects. The aim of this study was to evaluate the effect of mannitol, with or without sucrose, on the performance of *in vitro* nodal segments of *Luehea divaricata*. Treatments included a combination of sucrose concentrations (0, 15 or 30 g L<sup>-1</sup>) and mannitol (0, 10, 20 or 30 g L<sup>-1</sup>), evaluated in four periods of *in vitro* culture (30, 60; 90 and 120 days), conducted in a completely randomized design with eight replications. Evaluations were carried out every 30 days, analyzing: survival and establishment *in vitro*, phenolic oxidation, *in vitro* formation of roots, chlorosis and leaf abscission, all in percentage, and also the number of leaves and number of shoots. After 120 days of cultivation the height of the explants (mm) and length of the primary root (mm), when present, were measured. The main variables regarding the *in vitro* development of *Luehea divaricata*, shoot formation, root formation and leaf formation, responded to increased mannitol concentration in the nutrient medium, combined with low concentrations of sucrose. The osmotic regulator, mannitol, combined with sucrose concentrations of up to 15 g L<sup>-1</sup>, in the nutrient medium ½ MS, was effective in controlling the growth of nodal segments of *Luehea divaricata*, keeping the explants in good condition for establishment, after 120 days *in vitro*.

**Keywords:** minimal growth, osmotic regulator, germplasm bank.

### 7.3 Introdução

O avanço tecnológico da agricultura e a expansão demográfica com a formação de grandes centros urbanos, sempre aconteceram em detrimento das áreas florestais, fatos que levaram à perda de grandes superfícies de floresta (FAO, 2012). Em função dessa crescente ocupação de áreas de vegetação nativa e a consequente erosão genética de muitas espécies de plantas de importância econômica e ambiental, é cada vez mais premente a necessidade do desenvolvimento de técnicas de conservação de germoplasma de maneira a garantir sua disponibilidade no futuro (SÁ et al., 2011).

A biotecnologia vegetal oferece uma série de técnicas que podem ser incorporadas às estratégias clássicas de conservação de espécies ameaçadas, dentre as quais se destacam aquelas relacionadas à cultura de tecidos vegetais (BALCH et al., 2012). A utilização de técnicas simples de conservação *in vitro*, ajuda a produzir propágulos de qualidade, contribuindo com eventuais projetos de recuperação, restauração, reintrodução e armazenamento de germoplasma (SARASAN, 2010). Nesse sentido, trabalhos de conservação *in vitro* estão sendo conduzidos em países da Ásia (NOOR et al., 2011), Europa (GONZÁLEZ-BENITO; MARTÍN, 2011) e América Latina (PILATTI et al., 2011).

A cultura de tecidos é uma das ferramentas biotecnológicas de maior sucesso, visto que pode envolver um leque heterogêneo de técnicas, que inclui, entre outros, métodos de multiplicação e conservação de genótipo selecionado. Em algumas espécies que se caracterizam pela impossibilidade de conservar sementes por longos períodos, e que, simultaneamente, multiplicam-se por propagação vegetativa, a manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerada um método alternativo à conservação de germoplasma na modalidade mais usual, *in vivo* (SANTOS et al., 2011).

Face ao exposto e considerando que *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. é uma espécie florestal nativa dos biomas Mata Atlântica e Pampa, pertencente à família Malvaceae (SOBRAL et al., 2006; CARVALHO, 2008), cuja população tem sido amplamente explorada pelas boas características da sua madeira (FARIAS, 2006), e propriedades medicinais da espécie (TANAKA et al., 2005), a conservação *in vitro* pode se constituir em uma alternativa para garantir a disponibilidade de material

genético da espécie para emprego em eventuais programas de melhoramento genético e projetos ambientais. Entre as inúmeras técnicas disponíveis para a conservação *in vitro* de plantas, destacam-se aquelas relacionadas ao crescimento mínimo, que pode ser obtido mediante a utilização de reguladores osmóticos, os quais atuam reduzindo o metabolismo das plantas pelas modificações que causam às condições químicas do meio nutritivo. Estudos de conservação *in vitro* empregando técnicas de crescimento mínimo têm mostrado resultados promissores em várias espécies de importância econômica e ambiental, podendo-se citar *Eucalyptus grandis* (WATT et al., 2000), *Cedrela fissilis* Vell. (NUNES et al., 2003), *Cedrus atlantica* e *Cedrus libani* (RENAU-MORATA et al., 2006), *Hancornia speciosa* (SÁ et al., 2011; SANTOS, et al., 2011), *Ulmus americana* (SHUKLA et al., 2012), *Populus alba* (HWIDA, 2012), entre outros. Contudo, embora exista uma infinidade de resultados promissores nesses estudos citados anteriormente, seus protocolos não podem ser padronizados, já que as respostas podem variar em função da espécie, população, genótipo, parte e idade da planta que será conservada, entre outros fatores, que são característicos para cada caso.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do regulador osmótico manitol, associado ou não à sacarose, sobre o desempenho *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., visando à conservação *in vitro* de germoplasma.

## 7.4 Material e métodos

Foram utilizados segmentos nodais de açoita-cavalo provenientes do cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS com aproximadamente 60 dias de idade, apresentando 10mm de comprimento. Os tratamentos consistiram da combinação de diferentes concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e do regulador osmótico manitol (0; 10; 20 ou 30 g L<sup>-1</sup>), avaliados em quatro períodos de cultivo *in vitro* (30; 60; 90 e 120 dias). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema trifatorial 3x4x4, em que o fator A representou as concentrações de sacarose, o fator B, as concentrações de Manitol e o fator C, os períodos de avaliação, totalizando 48 tratamentos com oito repetições, sendo cada uma composta por um frasco com capacidade para 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes, completando 96 unidades experimentais e 288 unidades amostrais para cada período de avaliação.

O meio nutritivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) cuja concentrações de sais foi reduzida à metade (½MS), acrescido de 0,01% (p/v) de mio-inositol e 0,7% (p/v) de ágar. Antes da inoculação dos explantes, houve o ajuste do pH para 5,8, e, após, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm, por 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±3 °C e intensidade luminosa de 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Avaliações foram realizadas a cada 30 dias, pelo período de 120 dias, totalizando quatro coletas de dados, sendo consideradas as seguintes variáveis: sobrevivência e estabelecimento *in vitro* dos explantes, oxidação fenólica, formação *in vitro* de raízes, clorose e abscisão foliar, todas expressas em porcentagem. Foram, adicionalmente, avaliados o número de folhas e o número de brotos. Foi considerada folha com clorose, aquela que apresentava amarelecimento superior a ¼ parte da área foliar. A porcentagem de abscisão foliar foi calculada em função da diferença entre o número total de folhas presente na avaliação anterior e o número de folhas na avaliação em curso. Na última avaliação, efetuada aos 120 dias de cultivo, também foram mensurados a altura dos explantes (mm) e o comprimento da raiz principal (mm), quando presente.

### 7.4.1 Análise estatística dos dados

As variáveis, após verificados e satisfeitos os pressupostos do modelo matemático, e quando necessário, os dados transformados para  $\sqrt{x+1}$ , foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F resultou significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Para tratamentos quantitativos foi realizada análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o índice de variação (IV), calculado por  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

## 7.5 Resultados e discussão

### 7.5.1 Sobrevivência *in vitro*

A sobrevivência média geral dos explantes ao longo dos 120 dias de cultivo *in vitro* foi elevada (96,01 %) e foi observado efeito significativo apenas para a interação dupla entre os fatores concentração de sacarose e de manitol ( $p=0,0172$ ). Neste caso, foram ajustadas equações de regressão polinomial de segundo grau para as concentrações 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose combinadas às concentrações de manitol avaliadas; o desempenho dos explantes em relação à sobrevivência na ausência de sacarose no meio nutritivo não apresentou ajuste adequado (Figura 1). O IV da variável foi 6,3%.

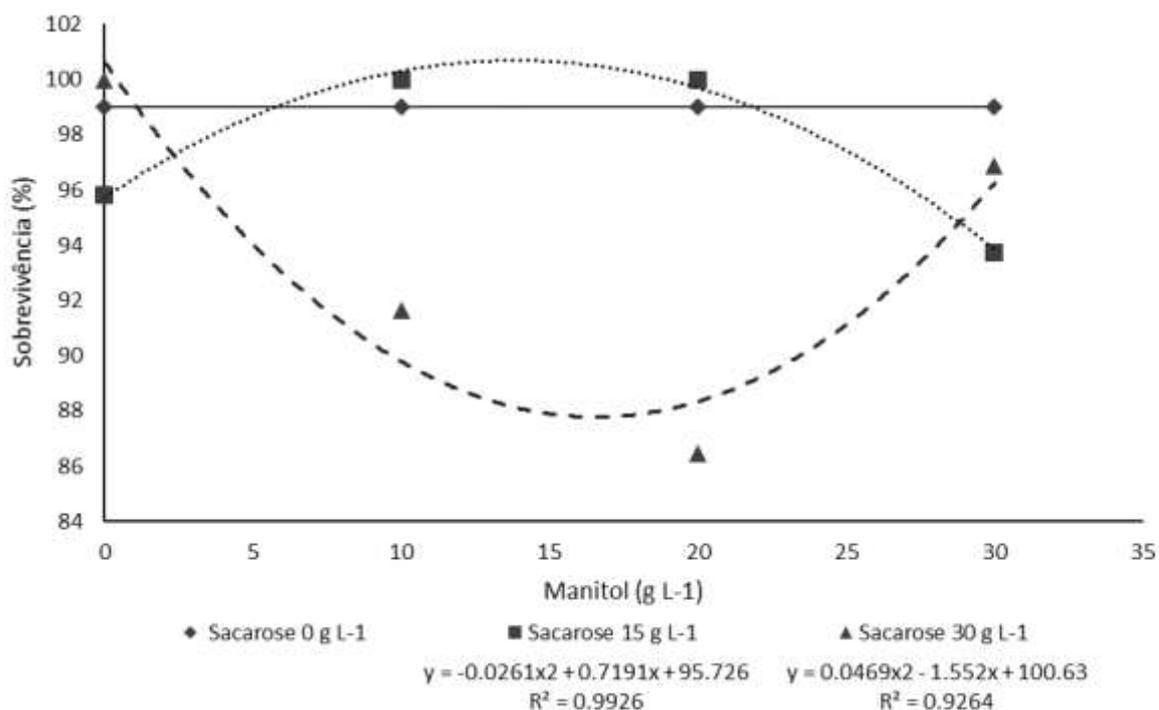


Figura 1. Porcentagem média de sobrevivência de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose e manitol acrescidos ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

A porcentagem de sobrevivência *in vitro* das culturas na ausência de sacarose (e presença de manitol) ou de manitol (e presença de sacarose) ou quando

ambos os componentes não foram adicionados ao meio nutritivo foi, igualmente, elevada, apresentando médias superiores a 96%. Na presença de ambos os componentes, sacarose e manitol, em suas diferentes concentrações, a sobrevivência foi variável. Dentre os tratamentos testados, as combinações 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 10 ou 20 g L<sup>-1</sup> de manitol foram as mais eficientes, resultando em 100% de sobrevivência dos explantes (Figura 1). A máxima eficiência técnica, calculada pelo modelo matemático  $Y = -b_1/2b_2$ , seria obtida com a suplementação de 13,78 g L<sup>-1</sup> de manitol para o tratamento que incluiu a combinação de com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo.

Analisando os resultados obtidos, provavelmente o uso do manitol seja promissor para conservação *in vitro* da espécie. Nesse sentido, a capacidade de sobrevivência dos explantes, durante o tempo a que foram submetidos a tratamentos de conservação *in vitro*, é uma propriedade importante a ser considerada, uma vez que é o ponto de partida para retomar o crescimento dos explantes submetidos ao tratamento (SARKAR; NAIK, 1998; LIMA-BRITO et al., 2011). Entretanto, quando a finalidade do cultivo *in vitro* é, além de assegurar a sobrevivência, promover um crescimento mínimo, deve-se considerar o desempenho das demais variáveis-resposta, a seguir apresentadas, em relação ao efeito da ausência da fonte de carbono e presença do regulador osmótico e, simultaneamente, da ausência do regulador osmótico e presença de sacarose.

Na conservação de brotações de *Populus alba* e de *Melaleuca ercifolia* cultivados em meio nutritivo MS, acrescido de 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose e manitol (9,1 ou 45,5 g L<sup>-1</sup>), foram observadas médias relativamente menores (72% e 80% respectivamente) de sobrevivência *in vitro* que aquelas observadas no presente estudo, no período de 120 dias. Porém *Melaleuca ercifolia*, após 12 meses de cultivo na presença de manitol, a 9,1 g L<sup>-1</sup> ou a 45,5 g L<sup>-1</sup>, teve a sobrevivência reduzida para 24% e 20% respectivamente (HWIDA, 2012). Igualmente, em *Eucalyptus grandis*, brotações cultivadas até 10 meses em meio nutritivo MS acrescido de 0,5 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 60 g L<sup>-1</sup> de manitol apresentaram reduzida porcentagem média de sobrevivência (inferior a 10%) (WATT et al., 2000). Entretanto, até o quarto mês de cultivo *in vitro*, a sobrevivência foi superior a 80%, decrescendo a partir desse período. Esses resultados demonstram que o período de tempo em que os explantes são cultivados em condições de crescimento mínimo influencia a sobrevivência, sendo importante determinar o tempo que assegura uma adequada

porcentagem de sobrevivência, de maneira a possibilitar a regeneração de uma boa representatividade do germoplasma objeto de conservação *in vitro*.

Além da questão do período de conservação *in vitro*, registros da literatura demonstram que há diferenças de desempenho entre as espécies, às vezes, até mesmo, entre aquelas de um único gênero. Nesse sentido, microestacas de *Cedrus atlantica* e *Cedrus libani* responderam diferentemente aos tratamentos de conservação *in vitro* em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), suplementado com 0,5 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 60 g L<sup>-1</sup> de Manitol, apresentando, respectivamente, 100% de mortalidade e 8,3% de sobrevivência *in vitro* para as duas espécies estudadas (RENAU-MORATA et al., 2006)

Informações relacionadas à atividade de reguladores osmóticos em espécies florestais nativas são mais escassas, mas resultados de conservação *in vitro* em outras espécies (agrícolas, frutíferas, e, inclusive, ornamentais) são mais comuns na literatura. Em brotações de *Syngonanthus mucugensis* (sempre-viva), submetidas a tratamentos de conservação *in vitro* em meio nutritivo  $\frac{1}{2}$ MS, acrescidos de sacarose (15; 30 ou 45 g L<sup>-1</sup>) combinado com de 15 g L<sup>-1</sup> de manitol, foram observadas elevadas porcentagens de sobrevivência no meio esteve composto de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g L<sup>-1</sup> de manitol (90%), ao final de 180 dias de cultivo (LIMA-BRITO et al., 2011). Entretanto, em plantas de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar), multiplicadas *in vitro*, concentrações de manitol que variaram de 0 a 30 g L<sup>-1</sup>, em meio nutritivo  $\frac{1}{2}$ MS, a sobrevivência dos explantes variou entre 50% e 80% (AGUILA et al., 2004). Em *Solanum tuberosum* (batata) entre 60 e 70% dos explantes sobreviveram quando armazenados *in vitro* por 30 meses na presença de sacarose (30; 40; 50; 60; 70 ou 80 g L<sup>-1</sup>) e manitol (0; 20; 40 ou 60 g L<sup>-1</sup>) (SARKAR; NAIK, 1998)

### **7.5.2 Estabelecimento *in vitro***

O estabelecimento *in vitro* dos explantes apresentou IV de 10,3% e média geral de 77,08%, sendo, portanto, inferior à média geral de sobrevivência *in vitro* (96,01%) observada, como ocorre, via de regra, uma vez que a sobrevivência, por si só, não garante a retomada do crescimento (ERIG; SCHUCH, 2003). Para esta variável, houve efeito significativo apenas para os fatores principais concentração de manitol ( $p= 0,0003$ ) e de sacarose ( $p= 0,0000$ ) e, também, para a interação entre

esses dois fatores ( $p= 0,0000$ ). Para as três concentrações de sacarose dentro de cada nível de concentração de manitol no meio nutritivo, foram ajustadas equações polinomiais de segundo grau (Figura 2).

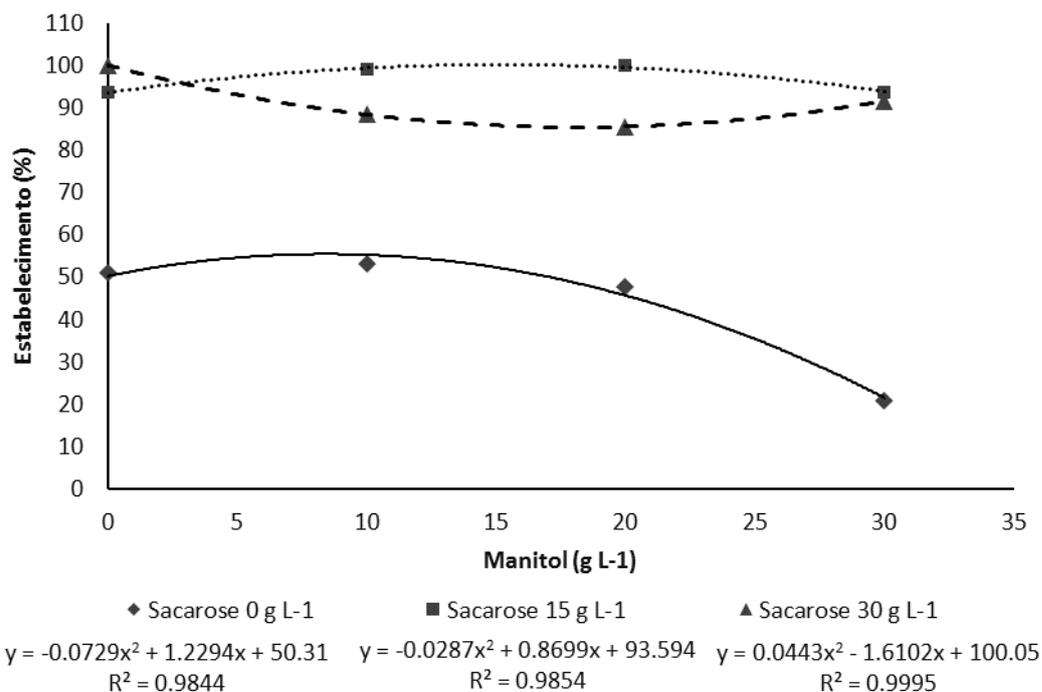


Figura 2. Porcentagem média de estabelecimento *in vitro* de culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 120 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose e manitol acrescidos ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$  MS). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

As porcentagens médias de estabelecimento *in vitro* das culturas na ausência de sacarose (e presença de manitol) ou de ambos os componentes avaliados, sacarose e manitol, foi reduzida (40,62% e 51,04%, respectivamente), porém, foi intermediária (79,97%) na presença de sacarose, independentemente da concentração de manitol, e elevada na ausência do regulador osmótico (e presença de sacarose) (96,88%). Por conseguinte, a presença de sacarose é determinante para a conservação *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo. Contudo, de maneira semelhante ao observado para a sobrevivência, dentre os tratamentos testados, as combinações 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 10 ou 20 g L<sup>-1</sup> de manitol foram as mais eficientes, resultando em mais de 98% dos explantes estabelecidos. A MET

para estabelecimento seria obtida com a suplementação de 15,15 g L<sup>-1</sup> de manitol em combinação com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Conseqüentemente, pode-se inferir que a inclusão de sacarose, em concentração inferior àquela geralmente utilizada (30 g L<sup>-1</sup>) nos meios nutritivos (CALDAS et al., 1998), quando a finalidade é a multiplicação, influencia positivamente o estabelecimento dos explantes na conservação *in vitro* mediante a estratégia de crescimento mínimo. Entretanto, de maneira semelhante ao que foi comentado em relação aos resultados obtidos para a sobrevivência, deve-se considerar, adicionalmente, o desempenho de outras variáveis-resposta avaliadas no presente estudo, a seguir apresentadas, em relação ao efeito da ausência do regulador osmótico e presença de sacarose, quando a finalidade do cultivo *in vitro* é, assegurar, simultaneamente, a sobrevivência e o estabelecimento, porém em um padrão de crescimento mínimo. Nessa circunstância, quando o objetivo é conservar material genético vegetal, em condições de crescimento mínimo, o almejado é que haja o desenvolvimento do menor número possível de partes vegetativas, porém, sem ocasionar a perda de sua viabilidade (OLORODE, 2004).

### 7.5.3 Oxidação fenólica

A oxidação fenólica (IV=18,9%) nas culturas *in vitro* avaliadas apresentou efeito significativo para os fatores principais DDC ( $p=0,0000$ ) e concentração de sacarose ( $p=0,0000$ ) e, também, para duas interações duplas: entre DDC e concentração de sacarose ( $p=0,0000$ ), e para concentração de sacarose e de manitol ( $p=0,0106$ ). Na primeira interação foram ajustadas equações polinomiais de primeiro grau para a ausência de sacarose e a para a menor concentração testada (15 g L<sup>-1</sup>), enquanto para 30 g L<sup>-1</sup> foi ajustada uma equação de segundo grau (Figura 3A).

Não foi observada oxidação nos explantes cultivados nos primeiros 30 DDC, na ausência de sacarose, porém, a partir da segunda avaliação e até o final do período de cultivo, aos 120 dias, observou-se oxidação nas culturas, porém em porcentagens médias muito reduzidas (entre 1 e 4,17%, média geral 1,91%) (Figura 3A). Entretanto, quando foram suplementados 15 g L<sup>-1</sup>, a oxidação foi muito elevada, passando de 8,33% aos 30 DDC a 84,38% na última avaliação realizada (Figura 3A). Com o emprego de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, observou-se, já aos 30 DDC, o dobro

de culturas oxidadas em comparação ao observado na presença de 15 g L<sup>-1</sup>, porém, a média máxima observada, aos 120 DDC, foi um pouco menor (82,29%); neste caso, a média máxima ocorreria, de acordo com o cálculo de MET, em torno dos 94 DDC.

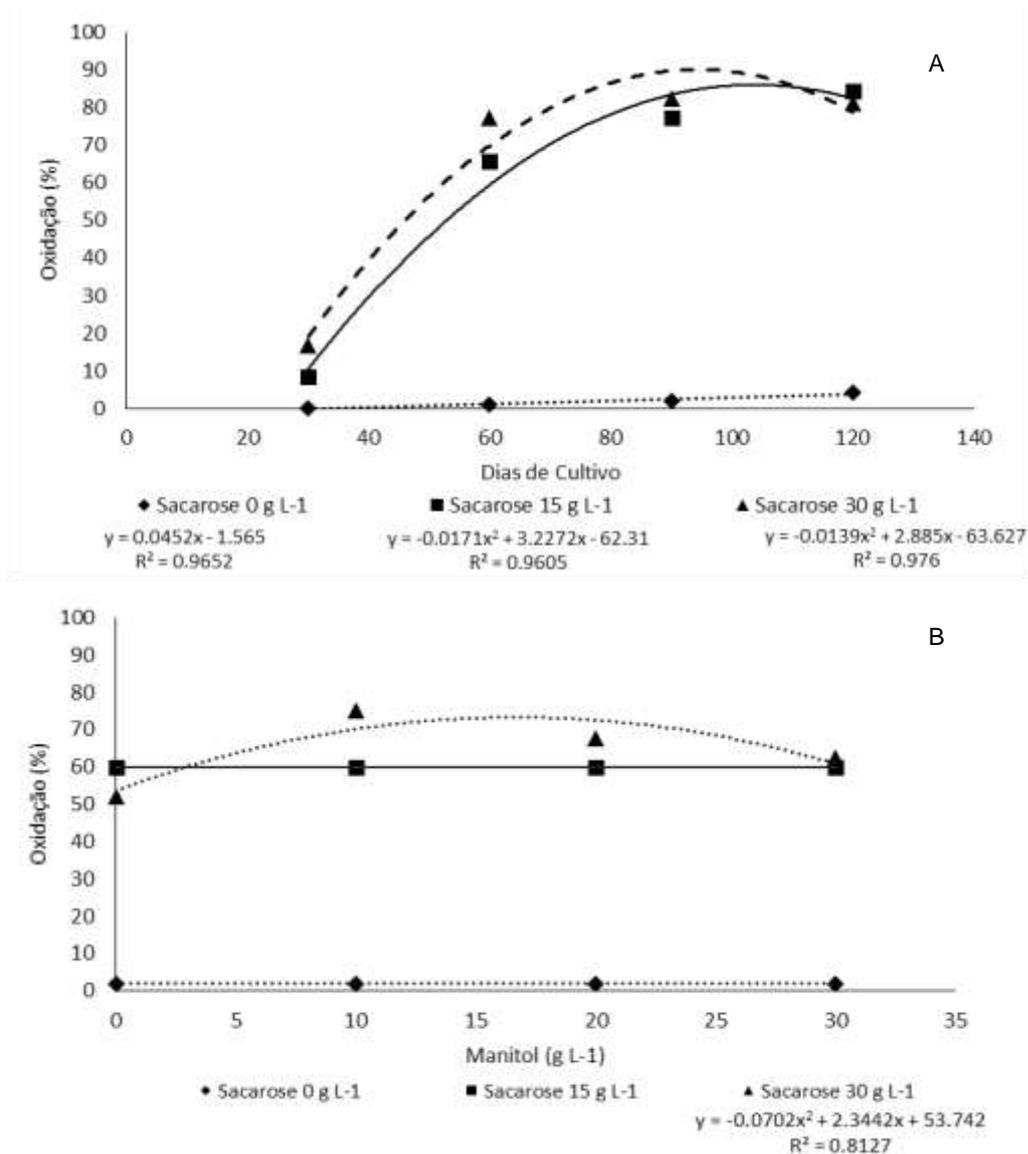


Figura 3. Porcentagem média de oxidação fenólica em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose acrescentadas ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS) (A); e após 120 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e manitol (B) acrescentadas ao meio nutritivo ½ MS. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Para a interação envolvendo sacarose e manitol, não houve ajuste adequado a nenhuma das equações compatíveis (1<sup>o</sup> ou 2<sup>o</sup> grau) com um padrão biológico, na

ausência de sacarose e na presença de 15 g L<sup>-1</sup>, porém foi obtido ajuste a uma equação de segundo grau para a maior concentração testada (30 g L<sup>-1</sup>) (Figura 3B). Quando não foi adicionada sacarose ao meio nutritivo foram observadas médias muito reduzidas (entre 1,04%, a 10 g L<sup>-1</sup> de manitol, 3,12, a 20 g L<sup>-1</sup>; com média geral 1,91%) de oxidação, independentemente da concentração de manitol. Entretanto, quando foi adicionada a sacarose, na menor concentração testada, as médias de oxidação foram muito elevadas (entre 53,13%, a 10 g L<sup>-1</sup> de manitol, e 61,46%, a 20 g L<sup>-1</sup>; média geral 58,86%). Na presença de 30 g L<sup>-1</sup>, as médias foram ainda um pouco mais elevadas (entre 52,08, na ausência de manitol, e 75%, a 10 g L<sup>-1</sup>; média geral 64,5%), sendo que a maior oxidação fenólica ocorreria na presença de 16,70 g L<sup>-1</sup> de manitol (Figura 3B).

Constatou-se que a oxidação fenólica, na presença de sacarose, independente da concentração deste carboidrato e, igualmente, da concentração de manitol utilizadas, constituiu um sério problema para a conservação *in vitro* de culturas de açoitaca-cavalo no período avaliado. Considerando-se, além disso, que os melhores desempenhos para sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, até o momento (observadas no tratamento que combinou 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 10 ou 20 g L<sup>-1</sup> de manitol), são, simultaneamente, aqueles em que a oxidação fenólica foi elevada, conclui-se que esse problema deverá ser solucionado, talvez pela adição de agentes antioxidantes, como polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, entre outros, para otimizar um protocolo de conservação *in vitro* de açoitaca-cavalo, em uma estratégia de crescimento mínimo.

#### **7.5.4 Formação *in vitro* de raízes**

A formação de raízes (IV=23,8%) apresentou efeito significativo para os fatores principais dias de cultivo (DDC) ( $p= 0,0000$ ), concentração de sacarose ( $p= 0,0000$ ) e concentração de manitol ( $p= 0,0000$ ). Entre as interações, apenas aquela relacionada à concentração de sacarose e de manitol ( $p= 0,0000$ ) apresentou efeito significativo.

Foram ajustadas equações polinomiais de primeiro grau para a variável DDC e para o desdobramento das concentrações de sacarose dentro das concentrações de manitol. Quando a sacarose esteve ausente e presente na concentração de 15 g L<sup>-1</sup>, enquanto para 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi ajustada uma equação de segundo grau

(Figura 4) para descrever o comportamento de formação *in vitro* de raízes. Na primeira avaliação, aos 30 DDC, apenas 20,14% dos explantes haviam formado raízes; 30 dias após, a média foi de 37,85% e, no final, após 120 DDC, essa porcentagem aumentou para 43,4% (Figura 4A), independentemente da sacarose e do manitol.

A formação *in vitro* de raízes na interação entre os dois fatores (manitol e sacarose), na ausência de sacarose e a 15 g L<sup>-1</sup>, foi inversamente proporcional ao aumento nas concentrações de manitol no meio nutritivo, e da mesma maneira, na concentração 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, observou-se a maior média (84,37%) na ausência de manitol, mas, na presença de manitol, a rizogênese foi reduzida nas concentrações 10 e 20 g L<sup>-1</sup>, verificando-se um ligeiro incremento a 30 g L<sup>-1</sup> (Figura 4B). Assim, o manitol, em interação com a sacarose, manifestou um efeito inibitório sobre a rizogênese naqueles tratamentos que, simultaneamente, promoveram médias satisfatórias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro*. Considerando-se que a rizogênese é desfavorável na conservação *in vitro* de germoplasma, os resultados obtidos cumulativamente, no presente ensaio, em relação às variáveis sobrevivência, estabelecimento e rizogênese são muito positivos.

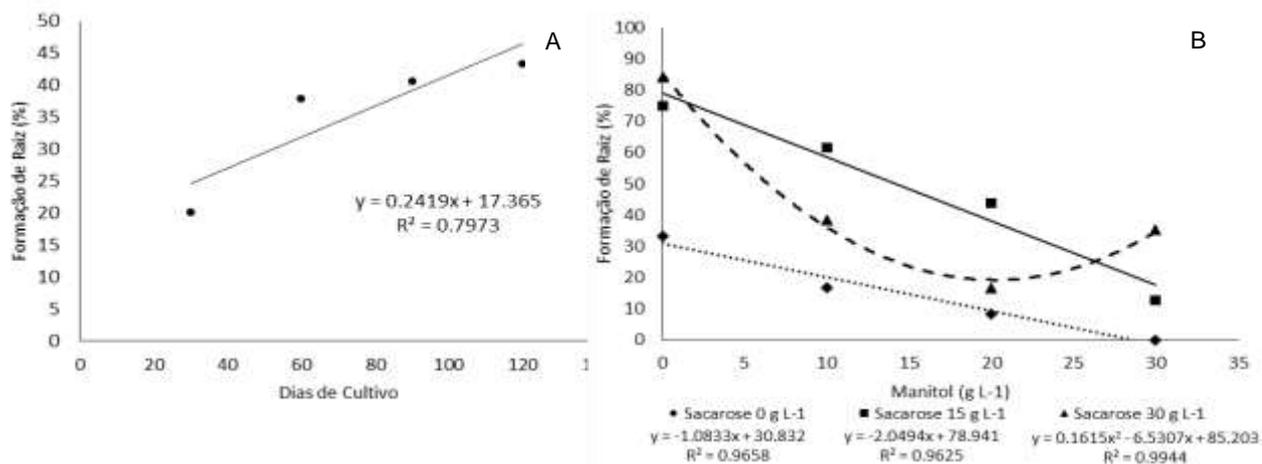


Figura 4. Porcentagem média de formação *in vitro* de raízes em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS) (A); e ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e manitol em meio nutritivo ½ MS (B). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Na conservação *in vitro* de gemas laterais de plantas de *Passiflora giberti* N. E. Brown (FARIA et al., 2006), com o emprego do regulador osmótico sorbitol (10; 20 ou 40 g L<sup>-1</sup>), as concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) também influenciaram na formação de raízes, sendo, porém, que, na presença de sorbitol, a formação de raízes foi maior. Entretanto, em brotações de *Populus alba*, cultivados por 12 meses em meio nutritivo MS, acrescidos de manitol (9,1 g L<sup>-1</sup> ou 45,5 g L<sup>-1</sup>), também foi observado efeito significativo sobre a porcentagem média de formação de raízes, sendo que, no meio com a menor concentração testada de manitol, houve apenas 1,3% de culturas com raízes, contra 32% na presença de 45,5 g L<sup>-1</sup> de manitol (HWIDA, 2012).

### 7.5.5 Clorose foliar

A clorose foliar (IV=21,6%) apresentou efeito significativo apenas para os fatores principais dias de cultivo (DDC) ( $p= 0,0000$ ), concentração de sacarose ( $p= 0,0000$ ) e concentrações de manitol ( $p= 0,0337$ ). Para o primeiro fator, foi ajustada uma equação linear simples, enquanto que para o manitol ajustou-se uma equação polinomial de segundo grau (Figura 5A e 5B). Para o fator concentração de sacarose, o teste de médias indicou haver diferenças significativas entre os níveis testados ( $p= 0,0000$ ).

A clorose foliar aumentou proporcionalmente ao aumento no período de cultivo dos explantes, apresentando, quando da primeira avaliação, aos 30 DDC, média de apenas 6,47%, e que aumentou em pouco mais de 10 vezes (64,9%), aos 120 DDC (Figura 5A). O mesmo foi observado em folhas de *Passiflora giberti*, cultivado em meio nutritivo MS combinando sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e sorbitol (10; 20 ou 40 g L<sup>-1</sup>), em que o percentual de clorose foliar progrediu até os 120 dias de cultivo *in vitro* (FARIA et al., 2006).

As concentrações de sacarose afetaram, igualmente, a ocorrência de clorose foliar, sendo que, na ausência de sacarose no meio nutritivo, registraram-se 24,47% de clorose foliar, enquanto que para as concentrações 15 e 30 g L<sup>-1</sup>, tiveram médias de 42,67% e 49,2% respectivamente. A coloração das folhas de outras espécies de plantas, submetidas a tratamentos de conservação *in vitro*, também foram afetadas pelo aumento de sacarose no meio nutritivo, como foi verificado em *Syngonanthus*

*mucugensis* Giul. (sempre-viva) (LIMA-BRITO et al., 2011) e *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) (SÁ et al., 2011).

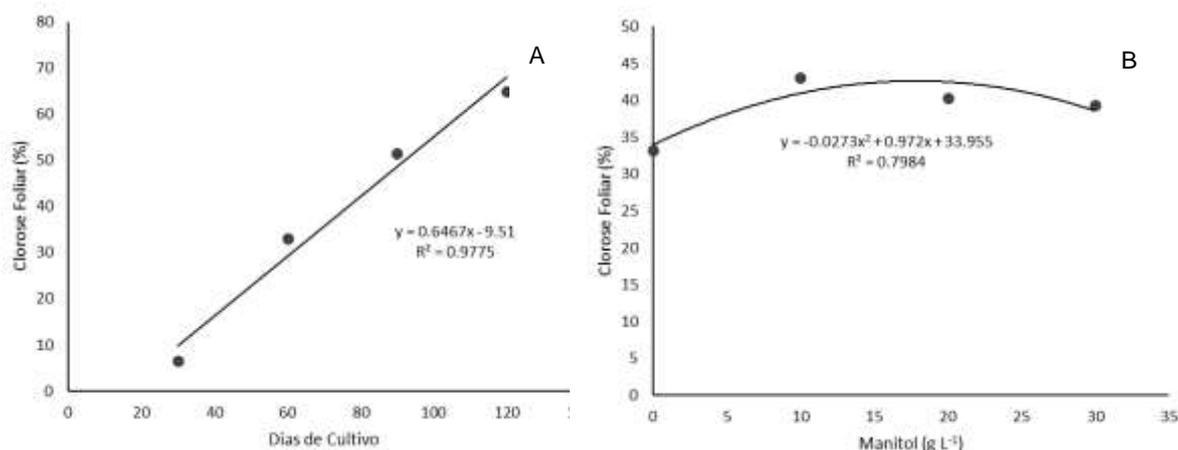


Figura 5. Porcentagem média de clorose foliar em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro*, independentemente das concentrações de sacarose e manitol, acrescidos ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS) (A); e porcentagem média de clorose foliar aos 120 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½MS suplementado com diferentes concentrações de manitol, independentemente das concentrações de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Em relação às concentrações de manitol, seu efeito sobre a clorose foliar das culturas se manteve entre 33% e 43% (Figura 5B), sendo que a máxima clorose ocorreria a 17,80 g L<sup>-1</sup> de manitol. Assim, pode-se inferir que o regulador osmótico empregado para o controle do crescimento dos explantes não exerce controle na clorose das folhas produzidas nos diferentes tratamentos, sendo necessário, a exemplo da oxidação, otimizar a conservação *in vitro* de maneira a reduzir sua manifestação nas culturas.

Brotações de *Syngonanthus mucugensis* Giul. (sempre-viva), cultivados por 180 dias em meio nutritivo ½MS com 15 g L<sup>-1</sup> de Manitol também foram afetadas pela presença deste regulador osmótico, perdendo a coloração verde das folhas (LIMA-BRITO et al., 2011), semelhante ao que foi relatado em *Passiflora giberti* (maracujazeiro) (FARIA et al., 2006) e *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) (SÁ et al., 2011).

### 7.5.6 Número de folhas por explante

O número de folhas produzidas por explante apresentou interação significativa entre os fatores DDC e concentração de manitol ( $p= 0,0000$ ), a qual foi avaliado por meio do método de superfície de resposta com um modelo de primeira ordem. A produção de novas folhas apresentou uma resposta inversamente proporcional às concentrações do regulador osmótico manitol e ao período de permanência dos explantes no meio nutritivo, uma vez que, com o aumento nas concentrações de manitol e, simultaneamente, no período de cultivo, o número de folhas produzidas foi relativamente menor comparado ao que foi observado quando o cultivo ocorreu na presença de meios nutritivos em que as concentrações de manitol foram menores ou ausentes e até os 120 DDC (Figura 6).

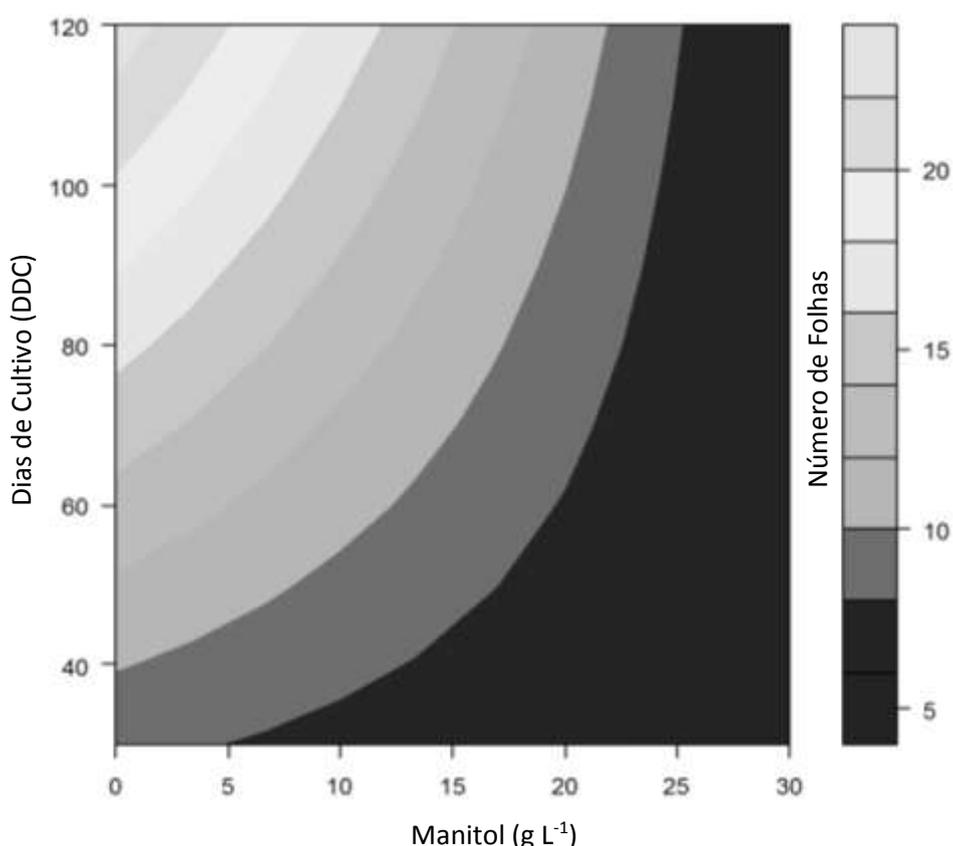


Figura 6. Superfície de resposta para número médio de folhas em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro*, na presença de diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), e independentemente da ausência ou presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Já em brotações de *Populus alba* sob tratamentos de conservação *in vitro*, o número de folhas produzidas, aos quatro, oito e 12 meses de cultivo, foram afetados pelo tempo de permanência na cultura de tecidos, sofrendo variações de 9,9 folhas no primeiro período, que aumentou para 15 folhas no segundo e, finalmente, registrando um decréscimo aos 12 meses (10 folhas). Entretanto, na presença de concentrações de manitol (9,1 g L<sup>-1</sup> ou 45,5 g L<sup>-1</sup>) em interação com o tempo de cultivo, nessa mesma espécie, foi observado que concentrações altas do regulador osmótico são mais eficientes no controle do crescimento dos explantes do que concentrações baixas (HWIDA, 2012).

O número de folhas produzidas aos 120 dias de cultivo, foi aproximadamente 68% superior quando da primeira avaliação (30 DDC), no tratamento que não recebeu concentrações de manitol, enquanto para o tratamento com a maior concentração do regulador osmótico (30 g L<sup>-1</sup>) o aumento na produção de folhas, no mesmo período de cultivo, foi de apenas 27%. Essa resposta pode ser considerada positiva, já que para fins de conservação *in vitro*, o objetivo principal é regular até o máximo, a formação de novos órgãos no material sujeito ao processo, procurando aumentar o intervalo entre os subcultivos (OLORODE, 2004).

### 7.5.7 Número de brotos

Em relação ao número de brotos, os fatores dias de cultivo (DDC) e concentrações de manitol apresentaram interação significativa ( $p= 0,0000$ ), ajustando-se a um modelo matemático de primeira ordem para a superfície de resposta.

A resposta dos explantes, em relação à produção de novos brotos, sob o efeito das concentrações de manitol para cada período de cultivo, foi inversamente proporcional. Na ausência desse regulador osmótico, o número de brotos produzidos registrou aumentos com o tempo que estes permaneceram no meio nutritivo, entretanto, considerando mesmos períodos de cultivo, para cada concentração de manitol, essa variável registrou decréscimos de até 50% no número de brotos formados (Figura 7).

No presente ensaio, observando as concentrações utilizadas do regulador osmótico manitol, e o tempo em que os explantes permaneceram no meio nutritivo, podemos considerar que o seu emprego, visando a conservação de genótipos de

açoita-cavalo, seria possível, uma vez que sob o seu efeito, e com o decorrer do tempo de conservação, a produção de novos brotos nas concentrações maiores de manitol, vê-se relativamente estagnada.

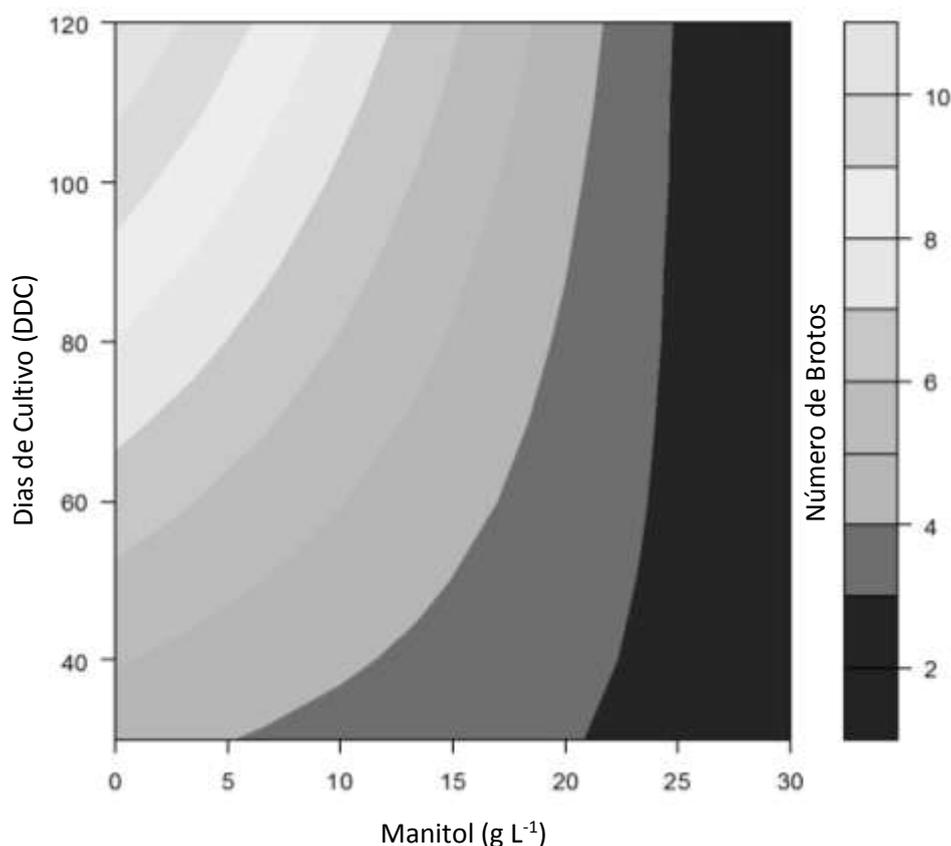


Figura 7. Superfície de resposta para número médio de brotos em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro* na presença de diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), e independentemente da ausência ou presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

O número de brotos produzidos pode variar de uma espécie para outra, tanto que num mesmo experimento, *Populus alba* e *Melaleuca ercifolia*, recebendo os mesmos tratamentos, manitol 9,1 ou 45,5 g L<sup>-1</sup> e, avaliações aos quatro, oito e 12 meses, ambas as espécies produziram médias de 1,7 ou 1,1 brotos por explante em *P. alba*, e, 1,9 e 0,5 brotos em *M. ercifolia*, nas respectivas concentrações de manitol. Quanto à variação de produção de brotos, no tempo, as duas espécies registraram variações mínimas, formando entre um ou dois brotos, no decorrer dos três períodos avaliados (HWIDA, 2012).

Já em sempre-viva, após 180 dias de cultivo em meio  $\frac{1}{2}$ MS com  $15 \text{ g L}^{-1}$  de manitol, a produção de brotos foi nula (LIMA-BRITO et al., 2011), demonstrando, novamente, que o manitol acrescido no meio nutritivo, pode atuar de diferentes maneiras sobre o explante. Entretanto, brotações de *Eucalyptus grandis*, cultivados em meio MS acrescidos com  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $60 \text{ g L}^{-1}$  de manitol, armazenados durante 10 meses, o tempo em que os explantes permaneceram no meio nutritivo afetou consideravelmente a formação de brotos, reduzindo-se de aproximadamente oito brotos por explante nos primeiros dois meses, para menos de dois e nenhum broto no oitavo e décimo mês, respectivamente (WATT et al., 2000). Igualmente, em microestacas de *Cedrus libani*, nas mesmas concentrações de sacarose e manitol do experimento supracitado, mas em  $\frac{1}{2}$ MS, o número de brotos por explante diminuiu de três no terceiro mês de cultivo para nenhuma brotação no sexto mês (RENAU-MAROTA et al., 2006).

#### 7.5.8 Folhas em abscisão

Para a porcentagem de folhas em abscisão, igualmente, os fatores DDC e concentrações de manitol apresentaram interação significativa ( $p= 0,0000$ ), ajustando, também, um modelo matemático de primeira ordem para superfície de resposta (Figura 8).

O tempo de permanência dos explantes nos meios nutritivos afetou consideravelmente a perda de folhas nos explantes que as produziram, porém, com o aumento das concentrações de manitol, essa porcentagem foi gradativamente menor. No entanto, essa menor perda de folhas nos tratamentos que receberam maiores concentrações do regulador osmótico, deve-se principalmente ao fato que nas mesmas, a produção de folhas também foi menor, inclusive em alguns tratamentos, a produção de folhas foi praticamente nula, indicando mais uma vez a eficiência do produto para fins de conservação de material propagativo de açoita-cavalo.

Em microestacas de *Hancornia speciosa* (mangabeira), observou-se um aumento da abscisão foliar com aumento do tempo (30; 60 e 90 dias) de cultivo *in vitro* na presença de manitol ( $10$ ;  $15$  ou  $20 \text{ g L}^{-1}$ ), contribuindo de sobremaneira para senescência (SÁ et al., 2011). Na mesma espécie, mas com o uso de Sorbitol ( $10$ ;  $20$  ou  $40 \text{ g L}^{-1}$ ) no meio nutritivo MS, suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido

indolacético (AIA) e 1 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), após 180 dias de cultivo, a porcentagem de folhas com abscisão foi relativamente menor, registrando apenas 1,20% e 8,62% na concentração mais baixa, e mais alta, respectivamente (SANTOS et al., 2011).

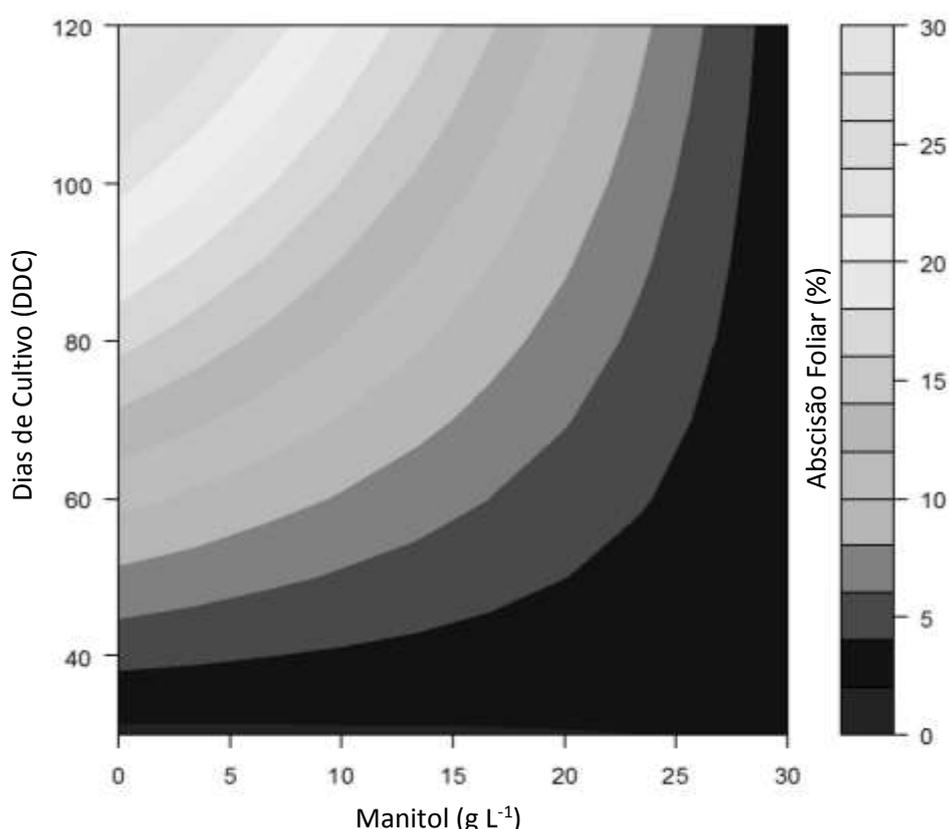


Figura 8. Superfície de resposta para porcentagem média de abscisão foliar em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro* na presença de diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cuja concentração e sais foi reduzida à metade (1/2MS), e independentemente da ausência ou da presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Em segmentos nodais de mangabeira, a resposta para abscisão foliar aos 90 dias de cultivo *in vitro*, registrou aumentos até aproximadamente 15 g L<sup>-1</sup> de manitol, acima dessa concentração a tendência foi a diminuição da perda de folhas (SÁ et al., 2011). Essa resposta, similar à obtida para açoita-cavalo neste ensaio, pode ser devido a que com o aumento das concentrações de manitol, a produção de folhas também diminuiu, conseqüentemente, também, baixaram os valores referentes a abscisão de folhas.

Os resultados obtidos em experimentos de conservação *in vitro* com outras espécies, indicam que a escolha do agente osmótico, ou a metodologia a ser aplicada para conservação de germoplasma vegetal, juntamente com a espécie, irão determinar o efeito dos tratamentos. Outro fator a considerar na hora de definir um protocolo de conservação é a concentração do regulador osmótico a ser utilizada, já que em algumas a exposição por longos períodos, pode resultar em efeito fitotóxico para o explante (SANTOS et al., 2011; SÁ et al., 2011)

### 7.5.9 Crescimento em altura e comprimento da raiz principal

O crescimento em altura e o comprimento de raiz das culturas conservadas em meio nutritivo  $\frac{1}{2}$  MS foram influenciados significativamente pela concentração de manitol ( $p=0,0000$ ). O desempenho dessas duas variáveis se ajustou a modelos quadrático e linear respectivamente, sendo que, enquanto o crescimento em altura apresentou um valor máximo na ausência do regulador osmótico, o comprimento da raiz foi linearmente reduzido com o aumento nas concentrações de manitol (Figura 9A e B).

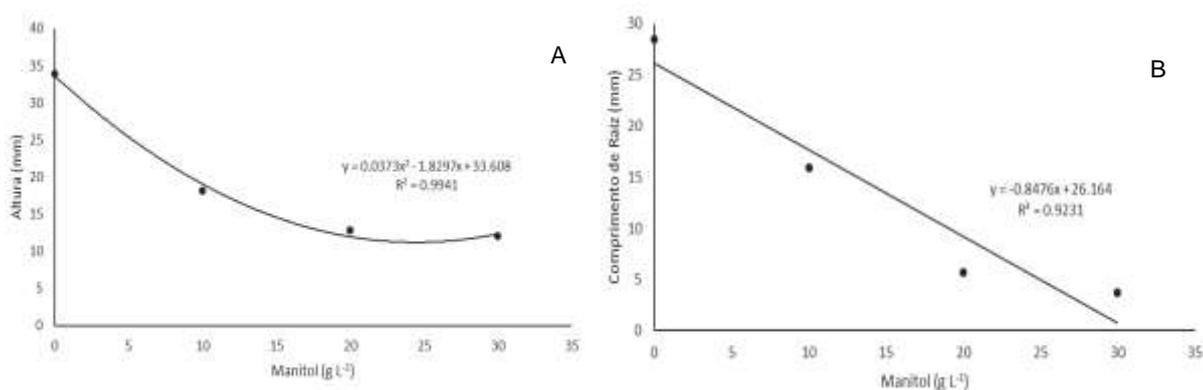


Figura 9. Crescimento médio em altura (A) e comprimento médio da raiz principal (B) em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de manitol acrescidas ao meio nutritivo MS cujos sais foram reduzidos à metade da concentração ( $\frac{1}{2}$ MS), independentemente da ausência ou presença de sacarose. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

O crescimento em altura dos explantes mostrou tendência de estabilizar a partir da concentração de 20 g L<sup>-1</sup> de Manitol no meio nutritivo, ficando o explante com a medida de 10mm de altura. Por tanto, não houve acréscimo nos valores dessa variável, já que o comprimento dos segmentos nodais, no momento da inoculação, era de 10mm (Figura 9A).

Em *Populus alba* e *Melaleuca ercifolia*, após 12 meses de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS acrescido de manitol, a 9,1 ou 45,5 g L<sup>-1</sup>, o comprimento dos brotos foi reduzido com o aumento na concentração do regulador osmótico, apresentando médias de 37mm e 4mm, respectivamente, na primeira espécie citada. Da mesma maneira, na segunda espécie, foram observadas médias de 38mm e 2mm, na presença das mesmas concentrações de manitol (HWIDA, 2012). Efeito similar ao observado em açoita-cavalo foi evidenciado em mangabeira, em que o comprimento da parte aérea dos explantes foi diminuindo conforme foram aumentando as concentrações de manitol no meio nutritivo, independente do período de cultivo, 30; 60 ou 90 dias de cultivo *in vitro* (SÁ et al., 2011).

Já, em sempre-viva, o comprimento médio da parte aérea, após 180 dias de cultivo *in vitro* em meio ½ MS, com 15 g L<sup>-1</sup> de manitol, combinado com 30 ou 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, foi de 0,3mm e 3,40mm respectivamente, mas, quando a concentração de sacarose foi reduzida para 15 g L<sup>-1</sup>, combinado com a mesma concentração de manitol, a média do comprimento da parte aérea foi até 3,40mm (LIMA-BRITO et al., 2011). Efeito contrário foi observado em açoita-cavalo, no presente ensaio, considerando o fator independente sacarose, onde na ausência desta, a altura média dos explantes foi de apenas 15,23mm, mas quando a sacarose esteve presente no meio nutritivo, as médias aumentaram para 22,25mm (15 g L<sup>-1</sup>) e 24,27mm (30 g L<sup>-1</sup>) (Tabela 1). Nesse sentido, o crescimento em altura e o comprimento da raiz principal dos explantes conservadas em meio nutritivo ½ MS, também, foram influenciados significativamente pela concentração de sacarose (p= 0,0000) (Tabela 1).

A resposta de brotos de sempre-viva, cultivadas em meio nutritivo ½ MS, quando cultivados somente na presença de sacarose (15; 30 e 45 g L<sup>-1</sup>), o comprimento médio da raiz principal foi inversamente proporcional à concentração dessa fonte de carbono. Esse efeito viu-se mais acentuado, quando naquelas concentrações de sacarose no meio nutritivo, foi acrescentado 15 g L<sup>-1</sup> de manitol,

não formando nenhuma raiz no meio nutritivo com 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (LIMA-BRITO et al., 2011).

Tabela 1. Crescimento médio em altura e comprimento médio da raiz principal em culturas iniciadas a partir de segmentos nodais *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose acrescidas ao meio nutritivo MS cujos sais foram reduzidos à metade da concentração (½MS), independentemente da ausência ou presença de manitol. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Altura do explante (mm)	Comprimento de raiz (mm)
0	15,23 a*	5,49 a
15	22,25 b	19,91 b
30	24,27 b	20,76 b
Média	20,43	15,06
IV (%)	9,34	27,41

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a', representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas.

Essas respostas obtidas em outras espécies, estudando o efeito das concentrações de sacarose e manitol, reforçam os resultados verificados com açoita-cavalo no presente experimento. A utilização desses compostos em concentrações adequadas, pode regular o crescimento de explantes cultivados *in vitro* aumentando o intervalo de transferência para novos meios nutritivos, e mantendo o material disponível para sua utilização para eventuais programas de melhoramento e/ou projetos de recuperação de áreas degradadas.

## 7.6 Conclusões

O regulador osmótico manitol pode ser empregado para a conservação *in vitro* de material propagativo de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., utilizando técnicas de crescimento mínimo.

As principais variáveis relacionadas ao desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, formação de brotos, formação de raízes e formação de folhas, são controlados quando a concentração de manitol aumenta no meio nutritivo ½ MS, combinado com baixas concentrações de sacarose.

O regulador osmótico manitol, combinado com concentrações de sacarose até 15 g L<sup>-1</sup>, no meio nutritivo MS com a metade da concentração dos sais (½ MS), é eficiente no controle do crescimento de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., conservando os explantes em boas condições para estabelecimento *in vitro*, após 120 dias de cultivo *in vitro*.

## 7.7 Referências bibliográficas

AGUILA, L.G. et al. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. **Biotecnología Vegetal**, v. 4, n. 2, p. 101 - 105, 2004.

BALCH, E.P.M.; ARAIZA; M.J.E.; REYES, M.E.P. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 35 n. 4, p. 279-287, 2012.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA, Brasília, DF. 1998. p87 – 132.

CARVALHO, P. E. Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular Técnica**, Colombo, PR: 2008.

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

FAO. **El estado de los bosques del mundo 2012**. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, 2012.

FARIA, G.A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora gibberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; MARTÍN, C. *In vitro* preservation of Spanish biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, n. 47, p. 46 – 54, 2011.

HWIDA, M.F. *In vitro* conservation of *Populus alba* and *Melaleuca ercifolia* germplasm. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 3, p.1373-1382, 2012.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.

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

NOOR, N.M. et al. *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity - achievements, challenges and future directions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, n. 47, p.26 – 36, 2011.

NUNES, E.D.C. et al. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, n. 12, p. 837 – 848, 2003.

OLORODE, O. Conservation of plant genetic resources. **African Journal Traditional Complementary and Alternative medicines**, n. 1, p. 4-14, 2004.

PILATTI, F.K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, n. 47, p. 82 – 98, 2011.

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

RENAU-MORATA, B; ARRILLAGA, I.; SEGURA, J. *In vitro* storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions. **Plant Cell Report**, n. 25, p. 636–642, 2006.

SÁ, A.J.; LÉDO, A.S.; LÉDO, C.A.S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANTOS, M.C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SARASAN, V. Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes worldwide. **Kew bulletin**, v. 65, p. 549–554, 2010.

SARKAR, D.; NAIK, P.S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. **Euphytica**, v. 102, p. 275-280, 1998. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/h552l35010nu14mp/fulltext.pdf>>. Acesso em: 01 Dez 2013.

SHUKLA, M.R. et al. *In vitro* conservation of American elm (*Ulmus americana*): potential role of auxin metabolism in sustained plant proliferation. **Canadian Journal Forest Research**, v. 42, p. 686 – 697, 2012.

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

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

WATT, M.P. et al. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 161–164, 2000.

## 8 CAPITULO VI

### ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICIÊNCIA, EM ANÁLISES MOLECULARES, DO ISOLAMENTO DNA GENÔMICO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. POR DIFERENTES PROTOCOLOS

#### 8.1 Resumo

Com a significativa diminuição da biodiversidade dos biomas que formam parte do Sul do Brasil, assim como a degradação das formações florestais remanescentes, tornam-se necessários estudos relacionados com a estrutura genética e a distribuição das espécies integrantes desses biomas. Para realizar estudos de diversidade genética usando técnicas de marcadores moleculares, faz-se necessário contar com métodos eficientes de extração de DNA genômico. O objetivo do presente trabalho foi determinar um protocolo eficiente para a extração de DNA genômico de folhas jovens de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., utilizando protocolos de extração pelo método CATB. Foram coletadas folhas jovens de oito indivíduos produzidos em casa de vegetação e testados três protocolos de extração, todos com modificações. As amostras foram quantificadas com espectrofotômetro e sendo sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose (1%). Testando-se ainda, a capacidade de restrição da enzima *Hind* III. As leituras feitas no espectrofotômetro indicam que os protocolos utilizados apresentam efeitos significativos sobre a pureza das amostras de DNA extraídos. Os protocolos de extração de DNA, a partir de folhas de *Luehea divaricata*, foram eficientes em obter DNA em concentração e nível de pureza aceitáveis, porém, ainda com a presença de proteínas e polissacarídeos. A enzima de restrição *Hind* III é mais eficiente na digestão de DNA extraídos com um dos protocolos testados.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, variabilidade genética, endonucleases

# COMPARATIVE ANALYSIS OF MOLECULAR ANALYSIS EFFICIENCY OF GENOMIC DNA OF *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. ISOLATED BY DIFFERENT PROTOCOLS

## 8.2 Abstract

Along with the significant decline in biodiversity of biomes that form part of southern Brazil, as well as the degradation of the remaining forest formations, studies related to the genetic structure and distribution of species from these biomes become necessary. To carry out studies of genetic diversity using molecular marker techniques, it is necessary to have efficient methods of genomic DNA extraction. The objective of this study was to determine an efficient protocol for extraction of genomic DNA from young leaves of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. using extraction protocols by the CTAB method. Young leaves from eight individuals produced in a greenhouse and tested the three extraction protocols. The extracted DNA was quantified by spectrophotometer and its integrity checked by electrophoresis (1%) agarose gel. Additionally, the ability of restriction of the Hind III enzyme. Was tested spectrophotometer analysis indicate that the protocols used have significant effects on the pureness of the extracted DNA. The protocols for DNA extraction from *Luehea divaricata* leaves were efficient in acquiring acceptable levels of DNA concentration and pureness, yet still with the presence of proteins and polysaccharides. The restriction enzyme Hind III is more efficient in digesting the DNA extracted with the protocols tested.

**Keywords:** molecular markers, genetic variability, endonucleases

### 8.3 Introdução

Marcadores moleculares, uma das ferramentas da biologia molecular, associados às informações de sequenciamento e mapeamento de genomas geram, na atualidade, informações importantes sobre fatores relacionados com a interação do genótipo e ambiente de várias espécies vegetais de interesse econômico e ambiental (BORÉM, 2009). Dessa maneira, o uso dessas ferramentas biotecnológicas podem ser incorporados em programas de melhoramento de plantas, participando do gerenciamento da variabilidade genética de populações, monitoramento de programas de cruzamentos controlados (GRATTAPAGLIA, 2007) e apoiando programas de conservação de recursos genéticos (FALEIRO, 2007).

Considerando-se que a significativa perda de cobertura florestal no Sul do Brasil, assim como a degradação das formações florestais remanescentes, tem gerado uma grande preocupação com a conseqüente perda da biodiversidade dos biomas que formam parte da região e, igualmente, com o desenvolvimento de estratégias de conservação de germoplasma e uso sustentável das espécies nativas (ROESCH et al., 2009), é importante realizar estudos relacionados à estrutura genética e à distribuição das espécies integrantes dessas populações, de maneira a direcionar programas e projetos que possam contribuir com a geração de informações, que irão auxiliar na tomada de decisões.

Estudos com marcadores moleculares em *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), espécie nativa do Brasil, presente nos biomas Mata Atlântica (CARVALHO, 2008) e Pampa (ROESCH et al., 2009) no Rio Grande do Sul, cuja população tem sido amplamente explorada, principalmente, pelas boas características da sua madeira (FARIAS, 2006), têm sido realizados em outras regiões do país, tanto que informações relacionadas com iniciadores microsatélites, desenvolvidos para a espécie (RUAS et al., 2009) e estudos da estrutura genética (CONSON et al., 2013), podem ser verificados na literatura.

No entanto, a otimização de protocolos de isolamento de DNA, com a utilização do CTAB como agente desnaturante, embora demande maior tempo, continua sendo de grande relevância, uma vez que podem acelerar ou, até mesmo, viabilizar estudos relacionados a essa linha de pesquisa. Adicionalmente, a avaliação e seleção de metodologias de isolamento de DNA mais eficientes para um

dados taxonômicos podem reduzir custos, tempo, além de permitir a obtenção de resultados satisfatórios.

Uma das considerações mais importantes em qualquer procedimento de isolamento de DNA de plantas trata da coleta e conservação das amostras, particularmente importante para espécies que produzem grandes quantidades de metabólitos secundários, que, em geral, interferem no sucesso do procedimento (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998). A obtenção de DNA genômico de qualidade, e em quantidade adequada, é de fundamental importância para o sucesso do marcador molecular que se deseja utilizar (WALDSCHMIDT, 1999).

Para tanto, é importante considerar os principais componentes celulares que podem interferir no processo, e aplicar procedimentos que garantam a qualidade do DNA isolado. Para isso o protocolo de isolamento empregado deve atender alguns quesitos, tais como: as paredes celulares devem ser rompidas com o objetivo de liberar os constituintes celulares - etapa realizada, geralmente, pelo congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido seguido de quebra mecânica; as membranas celulares devem ser rompidas para liberação do DNA - realizada, geralmente, pela ação de um detergente como Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) ou Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Paralelamente, é importante, evitar a ação de DNAses, regulando o pH dos tampões por volta de 8,0 e, também, os ácidos nucleicos devem ser separados das proteínas, para tanto, realiza-se de uma a várias extrações com fenol e/ou clorofórmio. Igualmente importante é o controle da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA irreversivelmente, tornando-o inacessível às enzimas de restrição, ação também desencadeada pela presença de polissacarídeos nos ácidos nucleicos (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Nesse sentido, as soluções obtidas são avaliadas em relação a dois quesitos: quantidade e qualidade do DNA genômico. Enquanto a quantidade é resultante da leitura em espectrofotômetro UV, a 260 nm, ou por meio da comparação, em gel de agarose, com padrões de peso molecular conhecido, e expressa em unidades de concentração (geralmente  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ); a qualidade das soluções pode ser estimada por meio de duas razões, obtidas pelas leituras nos respectivos comprimentos de onda: 260/280 e 260/230. A primeira relação indica a qualidade da solução de DNA genômico obtido, em função da contaminação com proteínas e fenóis, em que valores entre 1,8 e 2,0 indicam um DNA puro, enquanto razões menores que 1,8 indicam contaminação por proteínas e maiores que 2, contaminação por fenóis

(ROMANO, 1998; ARIF et al., 2010); ao passo que a segunda, informa a qualidade da solução de DNA genômico obtido, em função de contaminação com polissacarídeos ou reagentes empregados no processo de isolamento, em que a faixa ideal se encontra entre 2,0 e 2,20, se a razão é sensivelmente menor do que o esperado, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem a 230nm, como os polissacarídeos, e/ou resíduos de tampões ou soluções que foram usadas no próprio processo de extração de DNA (PAGE; MINOCHA, 2004; ARIF et al., 2010).

Protocolos de isolamento de DNA bem sucedidos, baseados no método CTAB foram desenvolvidos para várias espécies florestais nativas do Brasil, como, por exemplo, de *Araucaria angustifolia* (MAZZA; BITTENCOURT, 2000; STEFENON et al., 2004), *Butia capitata* (Mart.) Becc. (NUNES et al., 2008), *Eugenia dysenterica* (SILVA, 2010), *Tabebuia roseo alba* (ALZATE-MARIN et al., 2009), e, também, para *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (RUAS et al., 2009; CONSON et al., 2013), espécie foco do presente artigo, entre outras.

Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar e selecionar protocolos eficientes de isolamento de soluções de DNA genômico de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. para uso em análises moleculares.

## 8.4 Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Marcadores Moleculares do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram testados três diferentes protocolos de isolamento de DNA genômico a partir de folhas jovens de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo). Um *bulk* de folhas jovens de oito indivíduos de açoita-cavalo foram coletadas em mudas de 150 dias produzidas em casa de vegetação, a partir de um lote de sementes coletado em diferentes árvores localizadas no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural, - IRDER -, no Noroeste do Rio Grande do Sul.

As folhas coletadas receberam, inicialmente, uma assepsia realizada com algodão hidrófilo embebido em etanol a 70% (v/v), visando retirar a poeira existente sobre o material vegetal, e foram, a seguir, acondicionadas em sacos plásticos com sistema de fechamento hermético, contendo sílica gel granulada azul (diâmetro de 4-8mm), e, então, lacrados após retirar-se o excesso de ar existente em seu interior. Em seguida, o material foi armazenado em caixas de isopor contendo gelo e foi transportado até o Laboratório (por, aproximadamente, 1h), quando foram realizados os procedimentos de isolamento de DNA. Para tanto, foram utilizados os protocolos descritos a seguir:

**Protocolo 1:** método de Ferreira e Grattapaglia (1998), com algumas modificações (FGM). Aproximadamente 150mg de tecido foliar fresco, pesado em balança de precisão, foi colocado em gral e macerado em nitrogênio líquido, com o auxílio de um pistilo. O macerado foi colocado dentro de um microtubo de centrífuga de 2mL e adicionados 700µL de tampão CTAB (NaCl a 1,4M; Tris HCl pH 8,0 a 100 mM; EDTA a 20 mM; CTAB a 2%; β-Mercaptoetanol a 0,2%, PVP a 1%) preaquecido a 65 °C. Na sequência, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C, durante 60 min, agitando-se a cada 10 min. Após, foram adicionados 600µL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) (24:1) e os microtubos foram agitados, manualmente, por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 12000 xg. Em novos microtubos, de 1,5 mL, previamente identificados, foi transferida a fase aquosa (sobrenadante) resultante da centrifugação,

aproximadamente 500µL e, imediatamente, adicionados 400µL de isopropanol gelado (a -20°C) misturando-se, suavemente, por inversão dos tubos, várias vezes. Nessa etapa, as amostras foram armazenadas em freezer, à temperatura de -20°C, permanecendo *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 xg, sendo descartado o sobrenadante. Prosseguiu-se com uma dupla lavagem do precipitado (*pellet*) com 1mL de etanol a 70%, por 5 min, e uma vez com etanol absoluto, por 3 min, sendo as amostras colocadas para secar em câmara de fluxo laminar. O DNA extraído foi ressuspenso em 100µL de TE (Tris-HCl a 1M, EDTA a 500 mM) pH 8,0 com RNase (10µg mL<sup>-1</sup>), sendo incubados a 37 °C por 60 min. Finalmente, as amostras foram divididas em alíquotas e armazenadas em freezer, a -20 °C.

**Protocolo 2:** método de Doyle e Doyle (1987) com algumas modificações (DDM). Aproximadamente 150mg de tecido foliar fresco, pesado em balança de precisão, foram macerados com nitrogênio líquido até se obter um pó fino, que foi colocado em um microtubo de 2mL com a ajuda de uma espátula de metal. Posteriormente, foram adicionados 700µL de solução de extração CTAB a 2% em cada tubo, os quais foram agitados para a homogeneização das amostras. Logo, os tubos foram incubados em banho-maria a 60 °C por 1h, homogeneizando-se as amostras, por inversão dos tubos, a cada 15 min. Na sequência, foram adicionados 600µL de CIA (24:1), em cada amostra, agitando-as levemente, por inversão, até a formação de uma emulsão, que foi centrifugada a 12000 xg por 5 min. Após a centrifugação, foi transferida o maior volume possível da fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo (aproximadamente 500µL) e foi repetida a extração com 600µL de CIA (24:1), sendo os tubos agitados, por inversão suave, e a seguir, colocados para centrifugar a 12000 xg por 5 min, após o que transferiu-se a fase aquosa superior para um novo microtubo. Na sequência, foram adicionados 400µL de isopropanol gelado (a -20 °C) e as amostras, incubadas em freezer a -20°C para a precipitação do DNA, por, aproximadamente, 30 min, para uma completa precipitação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 7000 xg por 5 min; para formação do *pellet*. Após, descartado o sobrenadante foi feita lavagem em etanol a 70% por 5 min, seguida de uma lavagem em 1mL de etanol absoluto por 3 min, deixando-se escorrer o tubo invertido até evaporar todo o etanol (aproximadamente

30 min.). O precipitado foi ressuscitado em 100 $\mu$ L de tampão TE e adicionado RNase (10 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), sendo incubado em banho-maria por 30 min a 37 °C. Finalmente, as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

**Protocolo 3:** método de Saghai-Marroof et al. (1984), com algumas modificações (SMM). Foram pesados, aproximadamente, 150mg de tecido foliar fresco, colocados em cadinho e foi adicionado nitrogênio líquido sobre a amostra, sendo, em seguida, macerado o tecido com o pistilo até se obter um pó fino. Com a ajuda de uma espátula, o tecido macerado foi transferido para microtubos de 2mL e adicionados 700 $\mu$ L de tampão de extração CTAB a 2%, com  $\beta$ -mercaptoethanol, na concentração 2 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> e PVP a 1%, preaquecido a 65 °C. As amostras foram homogeneizadas invertendo-se, delicadamente, o tubo, várias vezes, para que todo o tecido entrasse em contato com a solução, seguida de uma incubação em banho-maria por 60 min, a 65 °C, homogeneizando-se o conteúdo dos tubos, por inversão, a cada 10 min. Após, os tubos foram retirados do banho-maria e adicionados 600 $\mu$ L do solvente orgânico CIA (24:1), procedendo-se a inversão dos tubos, várias vezes, para total homogeneização e posterior centrifugação a 8000 xg por 10 min. Logo, foi retirada, cuidadosamente, a fase aquosa (sobrenadante) e transferida para um novo tubo de 2mL, quando foram adicionados 700 $\mu$ L de isopropanol gelado (a -20 °C) e homogeneizados, delicadamente, invertendo-se o tubo algumas vezes. As amostras foram mantidas a -20 °C por, aproximadamente, 1h, quando foram retiradas do freezer e colocadas a centrifugar a 10000 xg por 10 min., sendo descartado o sobrenadante. Na sequência, o precipitado foi seco por 15 min, e ressuscitado em água ultra-pura autoclavada (600 $\mu$ L) com 10 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> da enzima RNase (4 $\mu$ L) e incubado por 1h a 37 °C, adicionando-se, seguidamente, 2 $\mu$ L de Proteinase K, na concentração final de 10mg mL<sup>-1</sup>. Essa mistura foi, novamente, incubada por 30 min a 37 °C. Após, foram adicionados 600 $\mu$ L de CIA (24:1), invertidos os tubos, várias vezes, para uma total homogeneização, centrifugando-se, na sequência, a 8000 xg por 10 min. Foi retirado, cuidadosamente, o sobrenadante e transferido para um novo tubo, de 1,5mL, sendo precipitado o DNA, adicionando-se 20 $\mu$ L de NaCl a 5M (para 400 $\mu$ L). Em seguida, foram adicionados 800 $\mu$ L de etanol absoluto (ou 2X o volume extraído), e misturado, delicadamente, por inversão até precipitar o DNA. As amostras foram centrifugadas a 8000 xg por 10 min, sendo descartado, novamente, o sobrenadante. Depois, o precipitado foi lavado com 400 $\mu$ L de solução a 0,2M de

Acetato de Sódio (NaOAc) em etanol a 76% e incubado à temperatura ambiente por 20 min, cuidando-se para não ressuspender o precipitado nessa solução. Seguiu-se uma lavagem com 200µL de solução a 10mM de Acetato de Amônio (NH<sub>4</sub>OAc) em etanol a 76%. Finalmente, foi ressuspendido o precipitado em 100µL de TE, agitado, suavemente, e deixado durante a noite, à temperatura ambiente. Finalmente, foi armazenado em freezer a -20°C.

Após, amostras das soluções de DNA obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, migrando as amostras a 80V por 40 min. Adicionaram-se 3µL de tampão de migração (glicerol a 30% e azul de bromofenol a 0,25%), 2µL do corante GelRed<sup>®</sup> 5X e 3µL de DNA isolado. Para o preparo do gel e na corrida eletroforética, foi utilizado o tampão TBE 1X [100mL tampão TBE 10X (Phoneutria<sup>®</sup>) e 900mL água ultra pura autoclavada]. Para verificar a integridade e qualidade das bandas, utilizaram-se os critérios descritos por Ferreira; Grattapaglia (1998) e Romano; Brasileiro (1999).

Para quantificar o DNA, usou-se um espectrofotômetro (NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis). Este aparelho quantifica o DNA presente na solução de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

Em que:

**C** = concentração de DNA em ng µL<sup>-1</sup>,

**Abs** = absorvância (neste caso a 260nm, que corresponde ao pico de absorção de radiação ultravioleta pelo DNA),

**e** = coeficiente de extinção (para o DNA de cadeia dupla corresponde a 50 ng cm µL<sup>-1</sup>) e

**b** = altura da coluna criada no espectrofotômetro (que, neste caso, corresponde a 1cm).

Assim, quando o espectrofotômetro (NanoDrop<sup>®</sup>) mede a absorvância a 260nm obtêm-se um valor, que, multiplicado por 50 (constante **e**), indicará a concentração de DNA na amostra, em ng µL<sup>-1</sup>.

Foi testada, também, a capacidade de restrição da enzima *Hind* III (Invitrogen<sup>®</sup>) nas soluções de DNA obtidas. Para tanto, utilizou-se um *mix* composto de 2 $\mu$ L da solução de DNA isolado de cada amostra vegetal, 2 $\mu$ L da enzima de restrição *Hind* III (0,5U  $\mu$ L<sup>-1</sup>) e 2 $\mu$ L de tampão *React* 2 10x (TRIS-HCl, pH 8,0, a 500 mM; MgCl<sub>2</sub> a 100 mM; NaCl a 500 mM), completado com água ultra pura autoclavada, até um volume final de 20 $\mu$ L. A digestão foi realizada conforme as recomendações do fabricante da enzima, colocando-se as amostras em banho-maria a 37 °C por 60 min, sendo inativada, posteriormente, também em banho-maria a 65 °C por 20 min.

Após a digestão das amostras pela enzima *Hind* III, as digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Sigma<sup>®</sup>) a 1%, que foi realizada a 90V por 90 min. Para cada amostra, foram adicionados 3 $\mu$ L de tampão de migração (glicerol a 30% e azul de bromofenol a 0,25%), 2 $\mu$ L do corante GelRed<sup>®</sup> 5X e 3 $\mu$ L de solução de DNA digerida. Para o preparo do gel e na migração eletroforética, utilizando o tampão TBE 1X. Como controle positivo foi utilizado o DNA do fago Lambda de 50 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>. Após a eletroforese, os géis foram visualizados em luz UV e fotodocumentados.

Os três protocolos de isolamento de DNA modificados, anteriormente descritos, consistiram os tratamentos do presente experimento, que foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. As repetições foram os isolados de DNA genômico a partir de folhas jovens dos oito indivíduos de *Luehea divaricata*. As variáveis-resposta avaliadas foram: concentração de DNA genômico, leitura a 260 nm, leitura a 280 nm, razão 260/280 nm e razão 260/230 nm. A leitura a 260 nm, corresponde ao pico de absorvância de ácidos nucléicos, e as leituras de absorvância no comprimento de onda de 230 e 280 nm, correspondem ao pico de absorção de polissacarídeos e proteínas, respectivamente. A razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> mede a pureza do DNA, sendo que valores entre 1,8 e 2,0 são considerados bons. Já, a razão A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>, é considerada como a medida secundária da pureza do DNA, e os valores considerados satisfatórios encontram-se na faixa 2,0 – 2,2 (ROMANO, 1998; PAGE; MINOCHA, 2004; ARIF et al., 2010).

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função  $\sqrt{x+1}$ , sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de

variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizada, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o índice de variação (IV), calculado por  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

## 8.5 Resultados e discussão

A concentração de DNA genômico obtido a partir do emprego de cada um dos tratamentos não registrou diferenças significativas ( $p= 0,0930$ ), obtendo-se uma concentração geral média de  $156,13\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  de DNA. Igualmente, os valores médios de leitura na faixa de 260nm ( $p= 0,0928$ ) e 280nm ( $p= 0,2979$ ) não apresentaram diferenças significativas, obtendo-se médias gerais de 3,12 e 1,88 nas respectivas faixas de absorvância. Inobstante, considerando-se a concentração de DNA isolado por meio do emprego de cada um dos protocolos modificados, as soluções podem ser utilizadas na aplicação da maioria das técnicas de marcadores moleculares, uma vez que, por exemplo, marcadores microssatélites, RAPD e RFLP requerem quantidades de DNA *template* inferiores a 50ng (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CAIXETA et al., 2009).

Considerando-se a razão A260/A280, o método de Doyle e Doyle (1987) modificado (DDM) permitiu a obtenção de soluções de DNA genômico com alta contaminação por proteínas (0,97), enquanto os outros dois métodos, Saghai-Marroof et al. (1984) modificado (SMM) e Ferreira e Grattapaglia (1998) modificado (FGM), não diferiram entre si, apresentando razões entre 1,79 e 1,94, e, portanto, proporcionando soluções de DNA mais puras. Entretanto, o protocolo FGM resultou em uma solução de DNA de melhor qualidade que o SMM e, portanto, adequada para a realização de análises moleculares posteriores. Entretanto, as soluções obtidas, em dois (DDM e SMM) dos três protocolos de isolamento de DNA genômico testados, embora apresentem conteúdo suficiente de DNA, podem comprometer o sucesso de eventuais Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), pela contaminação com proteínas e polissacarídeos. A qualidade do DNA é de fundamental importância para obter resultados claros e reprodutíveis dos produtos de amplificação pela PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Igualmente, um protocolo eficiente de isolamento de DNA genômico, deve incluir uma alta recuperação do ácido nucleico, boa remoção das impurezas e outros compostos inibidores (TERRY, 2002), podendo perder as amostras por causa da contaminação por esses compostos, por atuarem como inibidores diretos da enzima *Taq* polimerase, e também podem evitar a ação de enzimas de restrição (FANG et al., 1992). Nesse sentido, uma análise detalhada e criteriosa da qualidade do DNA a ser

utilizado nos procedimentos de PCR e/ou digestão com endonucleases, poderá determinar o sucesso dos procedimentos, uma vez que o uso de enzimas é indispensável em algumas técnicas de marcadores moleculares, como a RFLP.

No que diz respeito à razão A260/A230, observaram-se os mesmos resultados relatados anteriormente para a razão A260/A280, com a média de absorvância de DDM (0,44), enquanto as razões obtidas nos protocolos SMM e FGM, apresentaram médias de 0,92 e 0,97, respectivamente. Todos os protocolos testados produziram soluções de DNA com valores muito inferiores àqueles característicos de uma solução de DNA genômico altamente pura, ou seja, desprovida de agentes contaminantes. Esta razão é considerada uma medida secundária de avaliação da pureza do ácido nucleico, e pode apresentar valores, inclusive, mais elevados que a própria razão A260/A2680, quando a pureza do ácido nucleico é alta. Considerando-se as faixas de valores obtidos no presente trabalho, independentemente do protocolo testado, há um elevado nível de contaminação, com, polissacarídeos e/ou resíduos de tampões ou soluções que foram usados no próprio processo de extração de DNA.

No isolamento de DNA genômico a partir de folhas jovens de *Cucumis melo* e *Cucumis sativus*, o conteúdo de polissacarídeos foi observado diminuir quando o DNA foi precipitado em concentrações de NaCl superiores a 2,5M (FANG et al., 1992). No presente estudo isso não foi comprovado, uma vez que, no protocolo SMM, em que foi usado NaCl a 5M, as soluções de DNA obtidas apresentaram sua qualidade comprometida por esses compostos, conforme demonstrou a razão A260/A230.

A análise do gel de agarose após eletroforese (Figura 1), considerando-se a integridade e o aspecto do DNA isolado por meio do emprego dos diferentes protocolos testados, permite inferir, igualmente, que a qualidade das soluções de DNA obtidas não é satisfatória. Da mesma maneira, pode-se observar que a concentração de DNA, isolado por meio do protocolo DDM, é menor, em relação às soluções produzidas pelos outros dois métodos e, também, comparando-se com os padrões (DNA do fago Lambda a 25; 50; 75 e 100ng) (Figura 1). Esse resultado ratifica àqueles anteriormente apresentados relativos à quantificação realizada por meio de espectrofotometria.

A modificação realizada no protocolo DDM, que consistiu da exclusão do tampão de extração CTAB a 10%, pode ter influenciado, afetando a qualidade da

solução de DNA produzida. Já com o protocolo FGM pode ser observada maior quantidade de DNA, embora a solução apresente características de contaminação por polissacarídeos, pela forma relativamente cônica apresentada na banda que corre em direção ao polo positivo e pela retenção de DNA em alguns poços do gel. Contribui, também, para a redução na qualidade do DNA, a presença de RNA associado, manifestada pela presença de banda com menor massa molecular no gel (Figura 1). Essas mesmas características apontadas, porém com maior intensidade, também foram observadas nas soluções obtidas com o protocolo SMM (Figura 1).



Figura 1. Quantificação por eletroforese em gel de agarose (a 1%) de amostras das soluções de DNA isoladas de folhas jovens de oito indivíduos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., a partir dos protocolos de Doyle e Doyle (1987) modificado (DDM), Ferreira e Grattapaglia (1998) modificado (FGM) e Saghai-Marroof et al. (1984) modificado (SMM). 25; 50; 75 e 100 referem-se à quantidade de DNA do fago Lambda, em ng, utilizada para a estimação da concentração de DNA em cada solução avaliada. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Os três métodos de isolamento produziram soluções de DNA de relativa qualidade para emprego em revelação de polimorfismos por meio da digestão por

endonucleases de restrição. Os resultados obtidos com a digestão pela endonuclease de restrição *Hind* III pode ser observado na Figura 2. Nesta figura verifica-se que somente algumas das soluções produzidas foram digeridas pela enzima (Figura 2), o que indica que a qualidade das soluções de DNA dos oito indivíduos isoladas pelos três métodos é diferenciada.

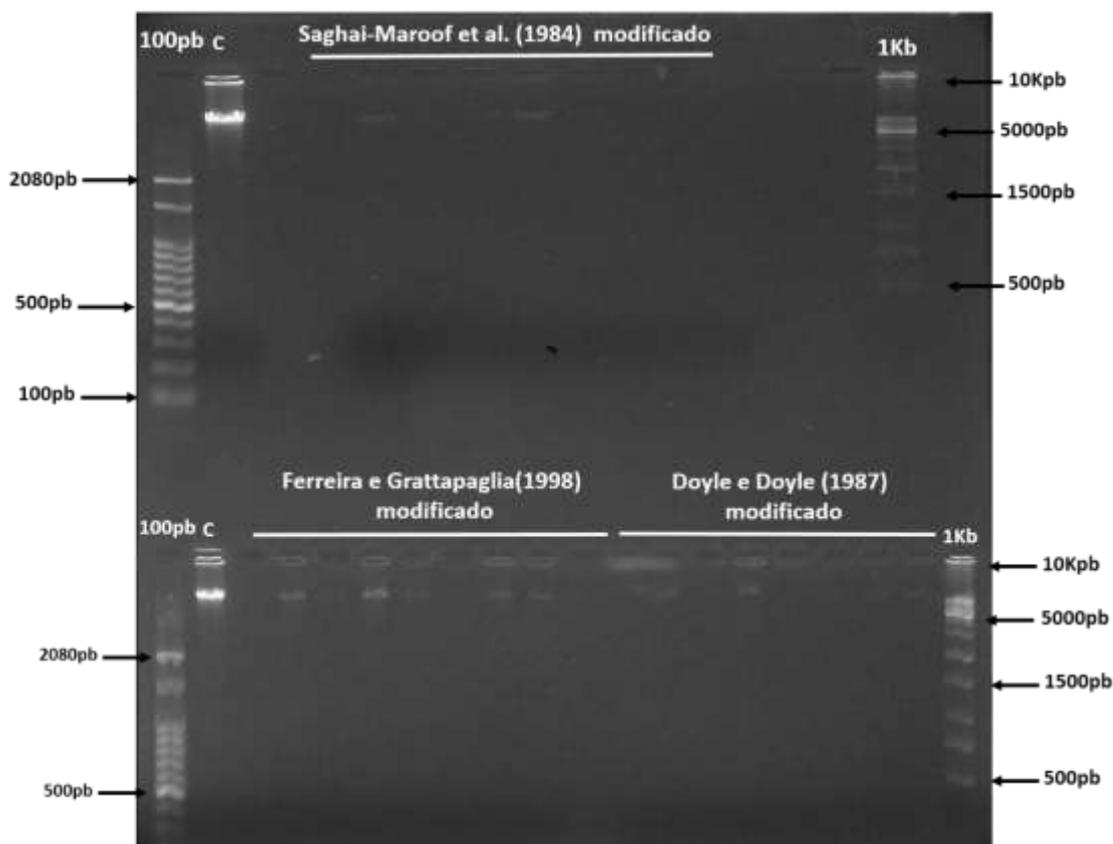


Figura 2. Perfil da digestão com a enzima de restrição *Hind* III, após eletroforese em gel de agarose a 1%, das soluções de DNA genômico isoladas a partir de folhas jovens de oito indivíduos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., por meio do emprego dos protocolos de Doyle e Doyle (1987) modificado (DDM), Ferreira e Grattapaglia (1998) modificado (FGM) e Saghai-Marroof et al. (1984) modificado (SMM). 1 kb e 100 pb= marcador de peso molecular. C= controle positivo (DNA do fago Lambda 50 ng). UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

As variações entre as amostras foram decorrentes, provavelmente, pela presença de contaminantes, como polissacarídeos, que podem inibir a ação das enzimas de restrição, uma vez que, para o sucesso da digestão de DNA por meio de enzimas, são requeridas grandes quantidades e alta qualidade do ácido nucleico

(BORSE et al., 2011). Igualmente, a presença de polissacarídeos nas amostras de DNA pode afetar o processo da PCR, já que estes compostos, em concentrações elevadas podem inibir, também, a ação da enzima *Taq* DNA polimerase (FANG et al., 1992).

A expectativa, no presente estudo, foi de que, com o emprego do protocolo SMM, que inclui proteinase K, que atua na desnaturação de proteínas e ajuda na remoção de enzimas que degradam o DNA (VARMA et al., 2007), fossem obtidas soluções de DNA de qualidade relativamente melhor. Contudo, de acordo com os resultados observados na quantificação em gel de agarose e na digestão pela enzima de restrição *Hind* III, isso não foi verificado em algumas amostras, o que, talvez, seja explicado pela presença de outros agentes que atuaram como inibidores do processo. Por outro lado, em soluções de DNA extraído de folhas jovens de *Satureja khuzistanica*, a inclusão da proteinase K no processo de isolamento resultou em DNA de boa qualidade, que se refletiu no gel de agarose obtido após eletroforese (DOOSTY et al., 2012).

Por outro lado, de maneira semelhante ao observado no presente experimento, em soluções de DNA isoladas de folhas de *Musa sp.* propagadas *in vitro*, foram obtidos valores entre 1,5 e 1,6 para a razão A260/A280 e valores relativamente mais baixos, entre 0,5 e 1,1, para a razão A260/A230, com o emprego do protocolo Doyle e Doyle (1987). Porém, as soluções revelaram-se igualmente eficientes na digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind* III (SHANKAR et al., 2011).

Novas modificações devem ser testadas nesses protocolos de isolamento de maneira a permitir a obtenção de soluções de DNA genômico de melhor qualidade, livres de contaminantes, especialmente proteínas e polissacarídeos. Em particular, os métodos que incluem o detergente CTAB, sobretudo em espécies lenhosas, devem ser realizados com especial atenção, principalmente nas etapas relacionadas à eliminação de contaminantes de DNA. Desse modo, se poderá garantir a integridade das amostras obtidas e alcançar resultados satisfatórios nas análises moleculares subsequentes.

## 8.6 Conclusões

O protocolo de isolamento de DNA genômico Ferreira e Grattapaglia (1998) modificado é eficiente em obter DNA de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. com nível de pureza satisfatórios para emprego em análises moleculares.

O protocolo de isolamento de DNA genômico Saghai-Marroof et al. (1984) modificado é eficiente em obter DNA de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. para emprego em análises moleculares que não requerem elevados níveis de pureza.

O emprego do protocolo de isolamento de DNA genômico Doyle e Doyle (1987) modificado não permite a obtenção de DNA de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. de qualidade para emprego em análises moleculares.

## 8.7 Referências bibliográficas

ALZATE-MARIN, A.L. et al. Um procedimento minipreparação DNA eficiente e rápida adequado para PCR / SSR e RAPD em espécies de árvores de florestas tropicais.

**Braz. Arco. Biol. Tecnologia**, v. 52, n. 5, p. 1217-1224, 2009.

ARIF, I.A. et al. A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: Impact of sand strinding and composition of Lysis Buffer. **International Journal of Molecular Science**. v. 11, n. 9, p. 3149–3157, 2010.

BORÉM, A. Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, 2009. 2 ed., p.95-102.

BORSE, T. et al. Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. **Journal of Plant Molecular Biology and Biotechnonology**, v. 2, p. 1-7, 2011.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, 2009. 2 ed., p.371-442.

CARVALHO, P.E.R. Açoita-Cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular Técnica 147**. Colombo, PR, Outubro, 2008.

CONSON, A.R.R. et al. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v. 141, p. 4-6, 2013.

DOOSTY, B. et al. Comparative analysis and optimization of diferente DNA extraction protocols in *Satureja khuzistanica*. **International Journal of Biology**, v. 4, p. 111-116, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FANG, G.; HAMMAR, S. GRUMET, R. A Quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques**, v. 13, n. 1, p. 52-54, 1992.

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

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, UFLA, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa, 2007, p. 175-200.

MAZZA, M.C.M.; BITTENCOURT, J.V.M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, 2000.

NUNES, A.M. et al. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 30, n. 3, p.702 - 707, 2008.

PAGE, A.F.; MINOCHA, S.C. Analysis of gene expression in transgenic plants. In **Transgenic Plants: Methods and Protocols** (Peña, L., ed.), New York: Humana Press. p. 291–311, 2004.

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

ROESCH L. F. W. et al. The Brazilian Pampa: A fragile Biome. **Diversity**. v. 1, p. 182-198, 2009.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN. 1998. p.163-177.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas, **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.

RUAS E. A. et al. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. **Conservation Genetics Resources**, v. 1. p. 245-248, 2009.

SAGHAI-MAROOF, M.A. et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SHANKAR, K. et al. An improved DNA extraction protocol from four *in vitro* Banana cultivars. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 84-90, 2011.

SILVA, M.N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, UFV, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010.

STEFENON, V.M.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. **Biotemas**, v. 17, n. 1, p. 47 - 63, 2004.

TERRY, C. F.; HARRIS, N.; PARKES, H. C. Detection of genetically modified crops and their derivatives: Critical steps in sample preparation and extraction. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 3, p. 768-774, 2002.

VARMA, A. et al. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 386-392, 2007.

WALDSCHMIDT, A.M. **Análises genética e morfométrica de populações de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae)**. 1999. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

## 9. CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados forneceram informações de grande relevância para processos relacionados à micropropagação de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), uma vez que, além de abranger todas as etapas que integram essa técnica da cultura de tecidos, geraram resultados promissores em fases geralmente consideradas limitantes na cultura de tecidos de espécies arbóreas florestais nativas de biomas brasileiros.

Primeiramente, foi verificado que sementes de açoita-cavalo mantêm a qualidade fisiológica e sanitária após seis meses de armazenamento em sacos de papel Kraft, no interior de refrigerador com temperatura entre 8 e 10 °C. Porém, observou-se que sua associação com microrganismos, principalmente fungos, afeta diretamente a germinação. Os resultados obtidos implicam na necessidade de se efetuar uma revisão da classificação das sementes de açoita-cavalo registrada na literatura científica disponível, principalmente no que refere ao seu comportamento no armazenamento.

Também, foi observado que é viável a multiplicação *in vitro* de culturas iniciadas a partir de epicótilos isolados de plântulas germinadas *in vitro* sem a necessidade de adicionar citocininas como 6-Benzilaminopurina (BAP), 2-Isopenteniladenina (2iP), Cinetina (CIN) ou Thidiazuron (TDZ) ao meio nutritivo. Além disso, foi verificado que, quando presentes no meio nutritivo, promovem a formação de calos, o que é indesejável nessa fase. Os resultados observados na multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo apresentam implicações de natureza técnica e econômica, uma vez que prescinde do emprego de componentes, sejam fitorreguladores ou outros agentes adicionados aos meios nutritivos base, o que, além de reduzir consideravelmente o custo de produção de mudas, tornam o processo mais simples sob o ponto de vista operacional.

No enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo, o emprego do meio nutritivo WPM, em sua composição original de sais, é mais eficiente que os demais meios avaliados (MS com ou sem adição de carvão ativado e WPM com carvão ativado). Porém, ainda devem ser testados tratamentos “pulse” que incluam concentrações de AIB superiores a 9 µM, uma vez que, no presente estudo, a formação de raízes, em culturas cujos explantes iniciais foram submetidos a pré-

tratamento com essa concentração da auxina, apresentaram tendências de aumento relacionado ao aumento na concentração do fitorregulador.

O meio nutritivo WPM, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, é eficiente para produzir plantas de açaíta-cavalo com características físicas adequadas para tratamentos de aclimatização *ex vitro* empregando-se substratos comerciais.

Na conservação *in vitro* de segmentos nodais de açaíta-cavalo, empregando-se a técnica de crescimento mínimo, o regulador osmótico manitol, na concentração 30 g L<sup>-1</sup>, isolado, ou combinado com sacarose até 15 g L<sup>-1</sup>, no meio nutritivo MS cuja concentração dos sais foi reduzida á metade (½ MS), é eficiente no controle do crescimento, conservando os explantes em boas condições, até o período de 120 dias de cultivo *in vitro*. Contudo, podem ser testados outros reguladores osmóticos, assim como outras técnicas de crescimento mínimo, como, por exemplo, incluindo-se variações de temperatura no ambiente de cultivo *in vitro*. Adicionalmente, é necessário avaliar o desempenho dos explantes na retomada do crescimento, após o processo de conservação, o que não foi efetuado no presente estudo.

É viável a realização de estudos moleculares empregando DNA genômico de açaíta-cavalo, isolado por meio da utilização do método CTAB, mais especificamente, utilizando protocolos desenvolvidos por Ferreira e Grattapaglia (1998) com algumas modificações no procedimento de cada metodologia. No entanto, é sugerida a realização de estudos adicionais visando melhorar a quantidade do DNA isolado.

Finalmente, devem ser realizados estudos complementares baseados nas principais respostas obtidas no presente trabalho, sobretudo para otimizar as técnicas de enraizamento, aclimatização e conservação *in vitro* de açaíta-cavalo. Assim como devem ser aprimoradas as técnicas de isolamento de DNA genômico para garantir o sucesso nos estudos de variabilidade genética da espécie, por meio de técnicas de marcadores moleculares.