
Ciências Biológicas - Integral

Raíssa Fonseca

**Organogênese Direta de Ipê-Branco
(*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.)Sand.)**

Rio Claro

2012

A decorative graphic at the bottom of the page consists of a light blue background with a white geometric pattern of overlapping lines forming a grid of irregular polygons, resembling a stylized globe or a network.

Raíssa Fonseca

Organogênese direta de ipê-branco
(Tabebuia roseo-alba (Ridl.)Sand.)

Orientador: Massanori Takaki

Co-orientador: Letícia Caravita Abbade

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Rio Claro

2012

581.1 Fonseca, Raíssa
F676o Organogênese direta de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba*
(Ridl.) Sand.) / Raíssa Fonseca. - Rio Claro : [s.n.], 2012
43 f. : il., figs., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Massanori Takaki

Co-Orientador: Leticia Caravita Abbade

1. Fisiologia vegetal. 2. Cultura de tecidos. 3.
Desinfestação. 4. Hormônios vegetais. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1. Desinfestação.....	9
2.2. Indução de brotos <i>in vitro</i>.....	13
2.2.1. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) na indução de brotações <i>in vitro</i> em meio MS.....	13
2.2.2. Efeito da Cinetina na indução de brotações <i>in vitro</i> em meio MS.....	13
2.2.3. Efeito da BAP (6-Benzilaminopurina) na indução de brotações <i>in vitro</i> em Meio WPM.....	14
2.2.4. Efeito da Cinetina na indução de brotações <i>in vitro</i> em Meio WPM.....	14
2.3. Enraizamento <i>in vitro</i>.....	15
2.3.1. Efeito do AIB (ácido indolbutírico) na indução de enraizamento <i>in vitro</i> em meio MS.....	15
2.3.2. Efeito do ANA (ácido naftaleno acético) na indução de enraizamento <i>in vitro</i> em meio MS.....	15
2.3.3. Efeito do ANA (ácido naftaleno acético) no enraizamento <i>in vitro</i> em meio WPM.....	16
2.3.4. Efeito do AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento <i>in vitro</i> em meio WPM.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.1. Desinfestação.....	17
3.2. Indução de brotos <i>in vitro</i>.....	19
3.2.1. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) na indução de brotações <i>in vitro</i> em meio MS e WPM nos explantes caulinares.....	19
3.2.2. Efeito da Cinetina na indução de brotações <i>in vitro</i> em meio MS e WPM nos explantes caulinares.....	26
3.3. Enraizamento <i>in vitro</i>.....	30
3.3.1. Efeito do AIB (ácido indol-butírico) na indução de enraizamento <i>in vitro</i> em meio MS e WPM nos explantes caulinares.....	30
3.3.2. Efeito do ANA (ácido naftaleno acético) na indução de enraizamento <i>in vitro</i> em meio MS e WPM nos explantes caulinares.....	32
4. CONCLUSÃO.....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

O ipê-branco é uma espécie de difícil propagação por sementes devido à sua curta longevidade. A cultura de tecidos tem possibilitado a melhor propagação de diversas espécies, tendo como base o crescimento de células, tecidos e órgãos em condições assépticas, possibilitando a rápida multiplicação da planta selecionada, obtendo mudas livres de patógenos. A primeira etapa da cultura de tecidos está baseada na desinfestação das sementes para obter as mudas *in vitro*, possibilitando as posteriores etapas do processo. Foram testadas diversas concentrações de álcool etílico e hipoclorito de sódio em busca da desinfestação mais efetiva. O melhor processo para a desinfestação das sementes do ipê branco está nos tratamentos de germinação em apenas ágar com a retirada das alas da semente após a sua lavagem, com passagem por 30 segundos em álcool etílico e 5 minutos em hipoclorito de sódio, com posterior transferência da plântula para meio MS suplementado com 0,7% de ágar e 3% de sacarose.

Sobre as plantas germinadas *in vitro* foram aplicados tratamentos com hormônios vegetais em busca das melhores concentrações para a obtenção de novas mudas. Os explantes caulinares tratados com BAP a $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ apresentaram 93,3% de brotações bem desenvolvidas, enquanto em meio WPM a melhor concentração para brotação com BAP é a de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, não promovendo no entanto um tratamento tão efetivo como em meio MS.

Para cinetina, todos os tratamentos exibiram formação de calo e/ou ausência de brotações em meio MS, e baixa porcentagem de brotação em meio WPM.

Os tratamentos realizados com AIB e ANA não tiveram rizogênese efetiva em meio MS, apresentando formação de raízes pouco desenvolvidas em apenas poucos explantes no tratamento de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA em meio WPM.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sandwith.), da família Bignoniaceae, é uma espécie arbórea nativa do Brasil com grande valor na construção civil e naval, medicinal e madeireiro (LORENZI, 2000; CARVALHO, 1994). Também é utilizado no paisagismo devido ao seu exuberante florescimento e na restauração de terrenos secos e pedregosos, devido à sua fácil adaptação (LORENZI, 2000). Dentre as espécies nativas do Brasil mais cultivadas, *T. roseo-alba* é a única que produz flores brancas (MAEDA & MATTHES, 1984).

É encontrada em altitudes de 20 a 1.600 metros, em regiões com precipitação média anual de 1.000mm a 2.100mm, com verão chuvoso e período de 3 a 5 meses de déficit hídrico. Tolerar temperaturas médias anuais de 14°C a 21°C, sendo a temperatura do mês mais frio de 10°C a 20°C e do mês mais quente de 18°C a 26°C, em diversos tipos climáticos das florestas estacionais semidecíduais, ocorrendo nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e norte de São Paulo, podendo ocorrer em alguns estados do nordeste. A madeira é pesada e macia, possui superfície lustrosa, e tem ótima durabilidade. Costuma florescer entre os meses de agosto e novembro com a planta despida de sua folhagem e seus frutos aparecem entre setembro e dezembro (POTT & POTT, 1994).

Seu fruto é do tipo silíqua, amadurece entre outubro e dezembro, e apresenta grande quantidade de sementes (LORENZI, 2000). Suas sementes são achatadas, possuem formato levemente abaulado, oblongo, são aladas, unitegmentadas e apresentam uma membrana revestindo o embrião. Externamente, distingue-se o corpo, que se encontra na posição central e as alas, que são uma expansão, principalmente lateral, do tegumento. O embrião é reto, representado, em sua maior parte, pelos cotilédones e está revestido por uma membrana delgada. O eixo hipocótilo-radicular é cilíndrico e pequeno, disposto mediana e verticalmente entre os dois cotilédones (COSTA, 1995).

Diversos trabalhos envolvendo o armazenamento de suas sementes foram realizados, visando a manutenção da qualidade fisiológica das mesmas, sendo que a mais eficiente forma de armazenamento foi descrita por Borba Filho (2009), por meio do acondicionamento das mesmas em lata e manutenção em geladeira, tendo como as primeiras alterações fisiológicas no vigor das sementes, a diminuição da velocidade de germinação.

As espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente no caso de explantes provenientes de plantas adultas, pois comumente apresentam infestação interna ou externa por microrganismos. O mesmo ocorre com sementes, sendo um dos grandes problemas no período de germinação em testes realizados

em incubadoras ou germinadores (FERREIRA, 1989), assim como no meio de cultura, a grande contaminação fungica das sementes, principalmente pelo fato de darem condições ideais para o desenvolvimento e a disseminação de alguns dos fungos, causando apodrecimento das sementes e a morte dos explantes, ou ainda promoverem a formação de plântulas anormais, tanto no caso da presença de fungos como a de bactérias (CORDER & BORGES, 1999). Para que a plântula formada a partir da germinação *in vitro* possa ser fonte de explante confiável, há necessidade de utilização de produtos que visam a diminuição ou a eliminação destes patógenos, desenvolvendo métodos de desinfestação eficazes.

A ISTA (1976) recomenda o tratamento de desinfestação para sementes baseado em 10 minutos imersas em hipoclorito de sódio (NaOCl) na concentração de 1% quando para o estudo de análises de sementes. Em outros trabalhos já relacionados à micropropagação *in vitro*, observa-se que a assepsia superficial apresenta grande variabilidade quanto as respostas quando expostas a diferentes agentes químicos, a concentrações da solução e ao tempo de exposição. Portanto, mostra-se importante o estudo sobre o efeito de diferentes agentes químicos em diferentes concentrações e tempos de imersão, que apresente uma assepsia eficiente em relação aos microrganismos infectantes tanto nas sementes como nos explantes retiradas de plantas *in vivo*.

A contaminação tanto de explantes como de sementes pode ser resultante das próprias matrizes ou do manuseio em laboratório. A interação entre plantas e microrganismos pode ser benéfica, estimulando o crescimento vegetal, competindo com patógenos ou induzindo a presença e ação de outros microrganismos que auxiliam o desenvolvimento das plantas (ARRUDA, 2000; PREECE & SUTTER, 1991).

A concentração dos agentes utilizados no processo de desinfestação e o tempo de exposição das sementes a estes compostos podem variar de acordo com a espécie, sendo necessária, então, a sua adequação de acordo sensibilidade do tecido da semente ou ainda do explante a ser desinfetado (MONTARROYOS, 2000).

O controle fúngico pode ser feito com o uso de benomyl (metil -1 butilcarbomoil - 2 - benzimidazol - carbamato, C₁₄H₁₈N₄O₃) que é um fungicida foliar sistêmico e não apresenta problemas de fitotoxicidade, desde que as recomendações de uso sejam respeitadas. Este também é comumente aplicado ao solo, ao redor das plantas, absorvido pelas raízes, suprimindo o crescimento do micélio, inibindo a mitose através do bloqueio da formação de b-tubulina e microtúbulos, responsáveis pela separação dos cromossomos (HAMMERSACHLAG & SISLER, 1973; HOWARD & AIST, 1980; DAVIDSE, 1986; ISAAC, 1992).

Na micropropagação, o benomyl pode apresentar efeitos de regulador de crescimento (BECKER, apud YANG, 1976), devido a mudanças em seu ingrediente ativo quando adicionados ao meio antes do processo de autoclavagem do meio de cultura, sendo que Thomas (1973) sugere semelhança estrutural deste composto com as citocininas.

Neste caso, pode-se também utilizar-se da aplicação do benomyl em outras concentrações para imersão dos explantes associado ao processo de desinfestação comum com álcool e/ou hipoclorito, seguido da lavagem dos mesmos antes do processo de inoculação, visando o tratamento e controle da contaminação fungica. No entanto, alguns trabalhos mostram que o fungicida tem efeito inibitório da sobrevivência, multiplicação e crescimento de explantes (WATT et al., 1995; WU, 1996).

Além do benomyl, pode ser utilizado também Lysoform® no controle da contaminação fungica como demonstrado por Zorato et al. (2001) em sementes de soja, obtendo com sucesso a descontaminação das sementes.

Um dos objetivos da micropropagação é a maximizar a multiplicação de gemas através da manipulação de substâncias de crescimento no meio de cultura, regulando o crescimento e a morfogênese *in vitro*, regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. Assim a produção relativa de fitohormônios é variável entre espécies, além de variar de acordo com a parte da planta da qual foi retirado o explante, mesmo sendo da mesma planta. Tendo em vista estes fatores, as concentrações de reguladores a serem adicionados ao meio devem variar em função das diferenças naturais nos níveis dessas substâncias (BHOJWANI et al., 1984; LEE & KO, 1984; MARINO, 1984; GEORGE, 1996).

Alguns tecidos vegetais são autônomos na síntese de fitohormônios, enquanto outros dependem da aplicação de reguladores junto ao meio nutritivo, sendo que o balanço entre os reguladores adicionados no meio e os produzidos de forma endógena regulam o crescimento e a morfogênese de células e tecidos *in vitro*.

Dentre os reguladores vegetais que desempenham importante função na composição do meio de cultivo estão os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, etileno e as giberelinas) (CID, 2001). As citocininas estimulam a divisão celular, induzindo a formação de brotos adventícios e inibindo a formação de raízes, responsável então pela eliminação da dominância apical, sobretudo quando associada a uma auxina, promovendo o desenvolvimento das gemas axilares (CARVALHO, 1999).

Muita atenção para sua obtenção tem sido dada com a manipulação de substâncias de crescimento no meio de cultura (BROJWANI et al., 1984; LEE & KO, 1984). O crescimento

e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE, 1996).

A organogênese *in vitro* ocorre com a formação de gemas adventícias, que se originam em locais diferentes daqueles que ocorrem no curso normal de desenvolvimento da planta, podendo ser indireta ou direta, dependendo da formação ou não de calos, respectivamente. Para que a regeneração *in vitro* ocorra com sucesso, depende-se de diversos fatores, onde os fitohormônios se destacam como os principais controladores. Um aspecto importante na multiplicação *in vitro* está relacionado com o tipo de citocinina e sua concentração, sendo este determinante no sucesso da multiplicação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A indução de brotos em explantes pode ser realizada por meio da aplicação de citocininas exógenas, promovendo o crescimento inicial das gemas axilares pela quebra da dominância apical, ocorrendo um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (TAIZ & ZEIGER, 2004). As citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN) são muito utilizadas na cultura de tecidos, sendo que seu potencial de indução dos brotos nos explantes é diferenciado (HU & WANG, 1983).

Utiliza-se citocininas em concentrações que estão entre 0,1 e 5,0 mg L⁻¹ para a multiplicação, e dentre as comercialmente disponíveis a benzilaminopurina (BAP), geralmente gera melhores resultados em diversas espécies (CHAVES et al., 2005), parecendo ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Posteriormente, o enraizamento das brotações é fundamental para a obtenção de plantas aclimatizadas e em condições de serem transferidas para campo. No processo de rizogênese, as auxinas ANA (Ácido Naftalenacético) e AIB (Ácido Indolbutírico) as mais utilizadas, principalmente em plantas lenhosas (ASSIS & TEIXEIRA, 1998)

A rizogênese é um processo complexo que envolve fatores intrínsecos (fisiológicos e bioquímicos) e extrínsecos inerentes ao meio de cultivo e condições climáticas impostas pela câmara de crescimento. O desenvolvimento *in vitro* deve seguir uma sequência de eventos coordenados, sendo que qualquer influente nestes, pode resultar em desarranjo na resposta morfogênica (MEIRA, 1999).

A rizogênese pode ser dividida em três fases: a indução, a iniciação e a alongação, cada uma com duração de uma a três semanas. As duas fases iniciais necessitam da auxina para o desenvolvimento de raízes, enquanto na última, sua presença torna-se inibitória para o processo, prejudicando o enraizamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990;

GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). As auxinas atuam na expansão, no alongamento e na divisão celular, atuando antes do primeiro evento de formação do primórdio radicular - desdiferenciação e formação do lócus meristemático - , sendo que a função da auxina no enraizamento seja então a indução radicular (BLAKESLEY et al., 1991). O ácido indolbutírico (AIB) tem sido a auxina mais utilizada para a indução de raízes adventícias em explantes, devido a sua maior fotoestabilidade (HOFFMANN et al., 1996).

Considerando a importância do ipê-branco, a baixa germinabilidade e curta longevidade de suas sementes e a ausência de relatos na literatura sobre a micropropagação, o presente estudo teve como objetivos estabelecer protocolos de desinfestação das sementes e organogênese direta, induzindo brotações e enraizamento *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fotomorfogênese da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no *Campus* de Rio Claro, SP. A origem do material vegetal foi proveniente de sementes germinadas *in vitro*, coletadas de árvores de ipê-branco localizadas no campus.

2.1. DESINFESTAÇÃO

A grande taxa de contaminação fungica durante o de estabelecimento primário tanto para sementes germinadas *in vitro* como para os explantes caulinares retirados de árvores adultas cultivadas na Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro, fez necessário o desenvolvimento de um protocolo de desinfestação.

O processo de desinfestação das sementes consistiu de quatro etapas, sendo elas:

- 1- Lavagem ou não das sementes em água de torneira corrente durante 40 minutos com e sem detergente
- 2- Imersão das sementes em álcool etílico nas concentrações 0, 50 e 70% por 0,5, 1 e 5 minutos
- 3- Imersão das sementes em hipoclorito de sódio ou Lysoform® nas concentrações 0, 30, 40 e 50% por 5, 7 e 10 minutos
- 4- Lavagem das sementes três vezes em água destilada e autoclavada

Os métodos de desinfestação podem ser melhor visualizados na Tabela 1, que associa todos os tratamentos realizados durante os períodos de testes, sendo que as sementes foram

submetidas a todos os tratamentos e os explantes apenas aos relacionados à concentração de álcool 70%.

Os tratamentos de desinfestação das sementes realizados com Lysoform®, foram realizados somente associados com a presença de álcool 70%, variando os tempos de exposição, podendo ser melhor visualizados na Tabela 2.

Realizado o processo de desinfestação, as sementes foram mantidas em placas de Petri com papel filtro até o momento da inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 25 repetições por tratamento, sendo cada unidade constituída de uma semente por tubo de ensaio preenchido por 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 50% da concentração de sais, acrescido de 3% de sacarose e 0,7% de ágar. O meio foi esterilizado em autoclave vertical à temperatura de 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos, sendo pH do meio ajustado para $5,8 \pm 1$.

Foram realizados também duas repetições do tratamento álcool etílico 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 50% por 5 minutos adicionados a tentativa de inoculação de sementes em ágar 0,7% sem a adição de sais e sacarose, com a retirada das alas da semente, acompanhados até a germinação e estabelecimento das plântulas com até 3cm de altura, com posterior passagem das plântulas para tubos de ensaio preenchido por 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose e 0,7% de ágar. Os meios foram esterilizados em autoclave vertical em ambos os casos, à temperatura de 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos, sendo pH do meio ajustado para $5,8 \pm 1$. Também foi realizada a germinação das sementes com a concentração de ágar diminuída para 0,6%, facilitando a embebição de água pela semente, mantendo o restante do processo.

O processo de desinfestação dos explantes de árvores adultas consistiu de quatro etapas, sendo elas:

- 1- Lavagem dos explantes em água de torneira corrente durante 40 minutos com detergente
- 2- Imersão dos explantes em álcool etílico na concentração 70% por 0,5, 1 e 5 minutos
- 3- Imersão dos explantes em hipoclorito de sódio nas concentrações 0, 30, 40 e 50% por 5, 7 e 10 minutos
- 4- Lavagem tripla em água destilada e autoclavada

Sobre o tratamento de álcool etílico 70% por 5 minutos associado à hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, foi aplicado também o fungicida benomyl na concentração de 12 g

L^{-1} nos explantes por 0,5, 1, 2 e 5 minutos, seguido da lavagem por água autoclavada, visando o controle de contaminação fungica.

Realizado o processo de desinfestação, os explantes foram mantidos em placas de Petri com papel filtro até o momento da inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 25 repetições por tratamento, sendo cada unidade constituída de um explante por tubo de ensaio preenchido por 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 3% de sacarose e 0,7% de ágar, com pH $5,8 \pm 1$.

Os explantes também foram incubados em câmara de crescimento do tipo B.O.D. com 16 horas de fotoperíodo e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e acompanhados periodicamente para constatar a contaminação e o crescimento das plântulas *in vitro*, visando a posterior repicagem para o teste dos reguladores vegetais e elaboração de um protocolo adequado para a micropropagação do ipê-branco.

Tabela 1 – Tratamentos realizados com o objetivo de desinfestação, através do tempo de embebição no álcool etílico (A) e no hipoclorito de sódio (H) marcado em minutos sobre as sementes e explantes, com a realização da lavagem das sementes.

Tratamento	Álcool (%)	Tempo (A)	Hipoclorito (%)	Tempo (H)	Tratamento	Álcool (%)	Tempo (A)	Hipoclorito (%)	Tempo (H)
1	0	0	0	0	28	50	5	50	7
2	50	0,5	0	0	29	50	0,5	50	10
3	50	1	0	0	30	50	1	50	10
4	50	5	0	0	31	50	5	50	10
5	50	0,5	30	5	32	70	0,5	0	0
6	50	1	30	5	33	70	1	0	0
7	50	5	30	5	34	70	5	0	0
8	50	0,5	30	7	35	70	0,5	30	5
9	50	1	30	7	36	70	1	30	5
10	50	5	30	7	37	70	5	30	5
11	50	0,5	30	10	38	70	0,5	30	7
12	50	1	30	10	39	70	1	30	7
13	50	5	30	10	40	70	5	30	7
14	50	0,5	40	5	41	70	0,5	30	10
15	50	1	40	5	42	70	1	30	10
16	50	5	40	5	43	70	5	30	10
17	50	0,5	40	7	44	70	0,5	40	5
18	50	1	40	7	45	70	1	40	5
19	50	5	40	7	46	70	5	40	5
20	50	0,5	40	10	47	70	0,5	40	7
21	50	1	40	10	48	70	1	40	7
22	50	5	40	10	49	70	5	40	7
23	50	0,5	50	5	50	70	0,5	40	10
24	50	1	50	5	51	70	1	40	10
25	50	5	50	5	52	70	5	40	10
26	50	0,5	50	7	53	70	0,5	50	5
27	50	1	50	7	54	70	1	50	5

Tratamento	Álcool (%)	Tempo (A)	Hipoclorito (%)	Tempo (H)
55	70	5	50	5
56	70	0,5	50	7
57	70	1	50	7
58	70	5	50	7
59	70	0,5	50	10
60	70	1	50	10
61	70	5	50	10
62	0	0	30	5
63	0	0	30	7
64	0	0	30	10
65	0	0	40	5
66	0	0	40	7
67	0	0	40	10
68	0	0	50	5
69	0	0	50	7
70	0	0	50	10

Tabela 2– A tabela mostra os tratamentos realizados com o objetivo de desinfestação, através do tempo de embebição no álcool etílico e no hipoclorito de sódio marcado em minutos sobre as sementes e explantes de ipê-branco, *sem* a realização da lavagem das sementes.

Tratamento	Álcool (%)	Tempo (A)	Hipoclorito (%)	Tempo (H)	Tratamento	Álcool (%)	Tempo (A)	Hipoclorito (%)	Tempo (H)
71	0	0	0	0	104	70	5	0	0
72	50	0,5	0	0	105	70	0,5	30	5
73	50	1	0	0	106	70	1	30	5
74	50	5	0	0	107	70	5	30	5
75	50	0,5	30	5	108	70	0,5	30	7
76	50	1	30	5	109	70	1	30	7
77	50	5	30	5	110	70	5	30	7
78	50	0,5	30	7	111	70	0,5	30	10
79	50	1	30	7	112	70	1	30	10
80	50	5	30	7	113	70	5	30	10
81	50	0,5	30	10	114	70	0,5	40	5
82	50	1	30	10	115	70	1	40	5
83	50	5	30	10	116	70	5	40	5
84	50	0,5	40	5	117	70	0,5	40	7
85	50	1	40	5	118	70	1	40	7
86	50	5	40	5	119	70	5	40	7
87	50	0,5	40	7	120	70	0,5	40	10
88	50	1	40	7	121	70	1	40	10
89	50	5	40	7	122	70	5	40	10
90	50	0,5	40	10	123	70	0,5	50	5
91	50	1	40	10	124	70	1	50	5
92	50	5	40	10	125	70	5	50	5
93	50	0,5	50	5	126	70	0,5	50	7
94	50	1	50	5	127	70	1	50	7
95	50	5	50	5	128	70	5	50	7
96	50	0,5	50	7	129	70	0,5	50	10
97	50	1	50	7	130	70	1	50	10
98	50	5	50	7	131	70	5	50	10
99	50	0,5	50	10	132	0	0	30	5
100	50	1	50	10	133	0	0	30	7
101	50	5	50	10	134	0	0	30	10
102	70	0,5	0	0	135	0	0	40	5
103	70	1	0	0	136	0	0	40	7

Tratamento	Álcool (%)	Tempo (A)	Hipoclorito (%)	Tempo (H)
137	0	0	40	10
138	0	0	50	5
139	0	0	50	7
140	0	0	50	10

Tabela 3 - Tratamentos de desinfestação das sementes realizados com Lysoform®.

Tratamento	Lavagem	Álcool (%)	Tempo (A)	Lysoform(%)	Tempo (H)
141	Sim	70	0,5	30	5
142	Sim	70	0,5	30	7
143	Sim	70	0,5	30	10
144	Sim	70	0,5	40	5
145	Sim	70	0,5	40	7
146	Sim	70	0,5	40	10
147	Sim	70	0,5	50	5
148	Sim	70	0,5	50	7
149	Sim	70	0,5	50	10

2.2. INDUÇÃO DE BROTO *IN VITRO*

2.2.1. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) na indução de brotações *in vitro* em meio MS

Segmentos caulinares obtidos de sementes germinadas *in vitro* com 50 dias contendo até duas gemas laterais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescidos de 3% de sacarose, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹). O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121°C, sob 1 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Foram avaliados o número médio de brotações, número médio de folhas, o comprimento da maior brotação e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.2.2. Efeito da Cinetina na indução de brotações *in vitro* em meio MS

Segmentos caulinares obtidos de sementes germinadas *in vitro* com 50 dias contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG,

1962), suplementado com diferentes concentrações de Cinetina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 e 5,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2°C. Serão avaliados o número de brotações, folhas e gemas por explante, o comprimento da maior brotação, e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 25 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.2.3. Efeito da BAP (6-Benzilaminopurina) na indução de brotações *in vitro* em Meio WPM

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD E MCCOWN, 1980), suplementado com diferentes concentrações de BAP (6-Benzilaminopurina) (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 e mg L⁻¹), e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento. Foram irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2°C. Serão avaliados o número de brotações, folhas e gemas por explante, o comprimento da maior brotação, e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 25 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.2.4. Efeito da Cinetina na indução de brotações *in vitro* em Meio WPM

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD E MCCOWN, 1980), suplementado com diferentes concentrações de Cinetina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 e mg L⁻¹), e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2°C. Foram avaliados o número de brotações, folhas e gemas por explante, o comprimento da maior brotação, e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 25 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.3. ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

2.3.1. Efeito do AIB (ácido indolbutírico) na indução de enraizamento *in vitro* em meio MS

Segmentos caulinares obtidos de sementes germinadas *in vitro* com 50 dias contendo até duas gemas laterais foram inoculados em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescidos de 3% de sacarose, suplementado com diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹). O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121°C, sob 1 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Foram avaliados o número médio das raízes, o comprimento da maior raiz e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.3.2. Efeito do ANA (ácido naftaleno acético) na indução de enraizamento *in vitro* em meio MS

Segmentos caulinares obtidos de sementes germinadas *in vitro* com 50 dias contendo até duas gemas laterais foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescidos de 3% de sacarose, suplementado com diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹). O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121°C, sob 1 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Foram avaliados o número médio das raízes, o comprimento da maior raiz e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.3.3. Efeito do ANA (ácido naftaleno acético) no enraizamento *in vitro* em meio WPM

Segmentos caulinares obtidos de sementes germinadas *in vitro* com 50 dias contendo até duas gemas laterais foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), acrescidos de 3% de sacarose, suplementado com diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹). O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121°C, sob 1 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Foram avaliados o número médio das raízes, o comprimento da maior raiz e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

2.3.4. Efeito do AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento *in vitro* em meio WPM

Segmentos caulinares obtidos de sementes germinadas *in vitro* com 50 dias contendo até duas gemas laterais foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), acrescidos de 3% de sacarose, suplementado com diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹). O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121°C, sob 1 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Foram avaliados o número médio das raízes, o comprimento da maior raiz e a presença de calos na base dos explantes, aos 50 dias de cultivo.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desinfestação

Sobre os tratamentos realizados, todos foram observados durante o período inicial de desenvolvimento, visando a contagem de tubos de ensaio contaminados por fungo ou bactéria, de morte das sementes ou explantes, ou ainda de plântulas germinadas com sucesso.

Poucos tratamentos tiveram resultados satisfatórios quanto ao processo de desinfestação, tendo como resultado à grande maioria dos tratamentos, um alto número de tubos contaminados por fungos ou bactérias.

Os tratamentos feitos com álcool 50% apresentaram 100% de contaminação seguido da morte das sementes, assim como os realizados com hipoclorito 30 e 40% nos tempos 5 e 7 minutos e os controles, tanto no caso do álcool como do hipoclorito. Estas sementes contaminadas não apresentaram potencial para crescerem sob o estado de contaminação, não apresentando nenhum sinal de germinação, o que está de acordo com Corder e Borges Junior (1999) e Couto et al. (2004) e não condiz com os acontecimentos nas sementes de *Parapiptadenia rígida*, nos testes realizados por Nascimento et al. (2007), que foram capazes de germinar mesmo na presença de fungos e bactérias, não tendo este como fator limitante em seu processo de germinação. Os tratamentos não expostos ao álcool independentemente de sua concentração ou ao hipoclorito, como em grande maioria dos trabalhos, apresentaram a mesma taxa de contaminação à exemplo do ocorrido com Nascimento et al. (2007).

Os tratamentos de álcool 70% e hipoclorito 40% no tempo de 10 minutos, agrupados com os tratamentos de álcool 70% por 5 minutos e hipoclorito 50%, e álcool 70% e hipoclorito 50% por 10 minutos, tanto nas sementes que passaram pela lavagem com detergente apresentaram graus variados de contaminação e morte dos explantes, perfazendo uma média de 84% de contaminação e 76% de morte das sementes nos tubos nos quais não houve contaminação, sendo que nenhum dos tratamentos foi significativamente adequado para a obtenção de plântulas em grande número. Os tratamentos realizados com passagem pela lavagem com detergente foram agrupados, pois não apresentaram diferença significativa entre si.

De acordo com Romberger & Tabor (1971), a mudança da concentração do ágar para 0,6%, deveria aumentar a difusão de nutrientes até o explante, facilitando o processo de germinação das sementes, obtendo um maior número de plântulas. No entanto, associado ao tratamento da imersão das sementes em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito 50% por 5

minutos, houve maior contaminação (20%) nos tubos do que na concentração de 0,7%, impedindo nestes casos a germinação das sementes.

Os tratamentos realizados com Lysoform® e com Benomyl foram muito agressivos às sementes, sendo que apesar de evitarem a contaminação por fungo em todas as concentrações, não foi observada a germinação das sementes em nenhum dos casos, levando-as a morte. Zorato et al. (2001) conseguiu com Lysoform® eliminar todos os infestantes através de uma concentração mais baixa, tendo como melhor tratamento Lysoform® 10% por 10 minutos, com pH controlado à 6,50, o que demonstra que as concentrações de Lysoform® utilizadas (30, 40 e 50%) foram muito altas, apesar de o tempo estar compatível com o utilizado pelo autor.

Os melhores tratamentos visando a obtenção de plântulas via sementes foram os realizados com álcool 70% nos tempos de 30 segundos e 1 minuto com hipoclorito 50% durante 5 minutos, e no álcool 70% por 30 segundos com hipoclorito 50% por 7 minutos, com respectivamente 4% de contaminação, 8% de contaminação aliado à 16% de morte das sementes e 12% de contaminação no último.

Como em grande parte dos tratamentos o processo de desinfestação foi ineficiente, com grande porcentagem de contaminação das sementes, como ocorrido com Fick (2007), fez-se o teste de germinação *in vitro* com a retirada das alas da semente e sua adição somente no ágar tendo grande sucesso quanto à desinfestação, obtendo 0% de contaminação. Durante a passagem das plântulas pré estabelecidas para um meio acrescido de nutrientes, não houve nenhuma contaminação, obtendo através deste processo um grande número de plântulas saudias (Figura 1), livres de agentes contaminantes.

Quanto aos tratamentos aplicados aos explantes obtidos *ex vitro*, nenhum dos tratamentos foi satisfatório, apresentando uma altíssima taxa de contaminação quando não aplicado o fungicida. Já nos casos onde o fungicida fora aplicado, houve morte dos explantes, não podendo haver aproveitamento dos dados para a elaboração de um protocolo. Possivelmente a contaminação predominante nos explantes tenha-se dado pela lavagem feita em todos os tratamentos, sendo que como exposto por Sato et al. (2001), este fator pode aumentar a taxa de contaminantes, em vez de auxiliar no processo de desinfestação, como no caso do *Celtis sp.*, onde não aparece a contaminação por fungos nos casos onde não há lavagem, e há aumento da contaminação conforme o aumento do tempo de lavagem.



Figura 1 – Planta de ipê-branco com 50 dias de cultivo, livre de contaminantes.

3.2. INDUÇÃO DE BROTOS *IN VITRO*

3.2.1. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) na indução de brotações *in vitro* em meio MS e WPM nos explantes caulinares

É possível observar que a maior porcentagem de brotos foi obtida na concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ com 93,3%, sendo que a curva de regressão é crescente até atingir o pico de atividade na concentração citada, com decréscimo posterior ao ponto máximo (Figura 2). É possível atribuir esta forma da curva ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de brotações até uma concentração específica, que varia de espécie para espécie, sendo que à partir desta concentração ótima ocorre efeito tóxico, caracterizando a falta de alongamento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A maior porcentagem de brotos para o meio WPM foi obtida na mesma concentração ocorrida para o meio MS porém em menor proporção, sendo a mais apropriada para obter o maior porcentagem de brotações a concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ no meio WPM, com 73,3% de explantes brotados, sendo a curva de regressão apresenta o mesmo padrão (Figura 3).

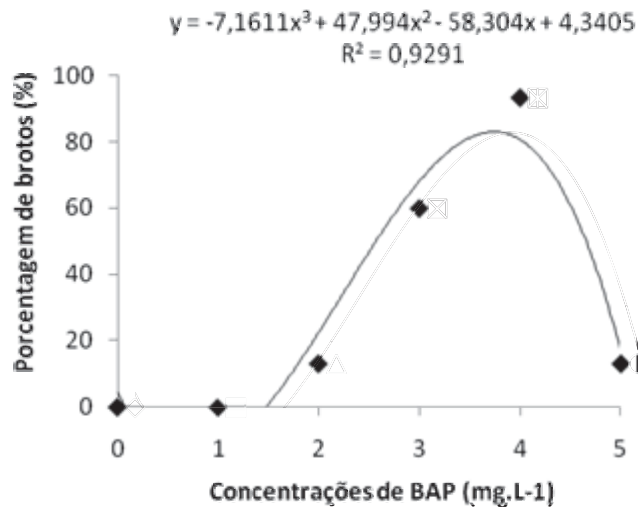


Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de BAP na formação de brotos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.

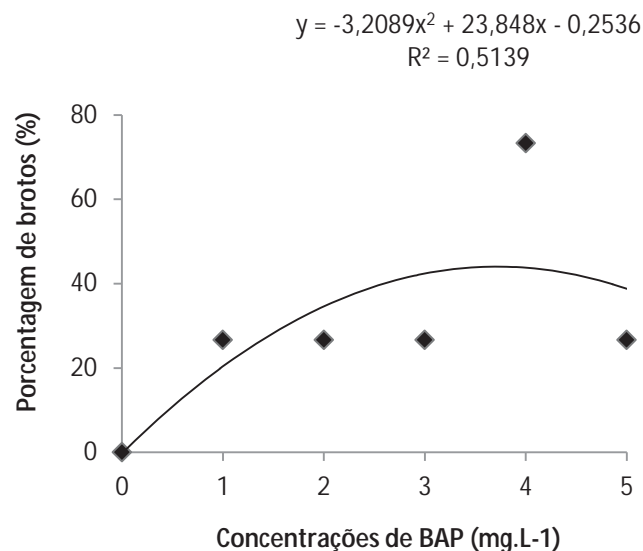


Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações de BAP na formação de brotos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

Para o número de folhas por explante, houve maior formação na concentração de 3,0 mg L⁻¹ com um número médio de 10,66 folhas por explante (Figura 4), como verificado por Nachtigal et al. (1995) em kiwi var. deliciosa, onde o maior número de folhas ocorre nas concentrações intermediárias, e obteve em seus resultados o maior número de folhas e de gemas nas concentrações respectivamente de 1,8 e 1,7 mg L⁻¹, obtendo nas concentrações entre 1,5 e 2 mg L⁻¹ de BAP as concentrações ótimas para a micropropagação desta planta.

Em meio WPM, houve formação de maior número de folhas por explante na concentração de 5,0 mg L⁻¹ com um número médio de 11,27 folhas por explante (Figura 5), sendo que os explantes que se desenvolveram nesta concentração cresceram mais, como pode ser observado posteriormente quanto a seu comprimento (Figura 7), apesar de poucas repetições terem se desenvolvido.

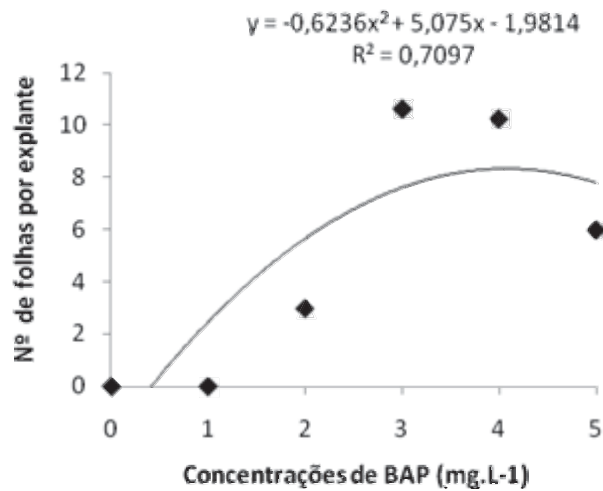


Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de folhas de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.

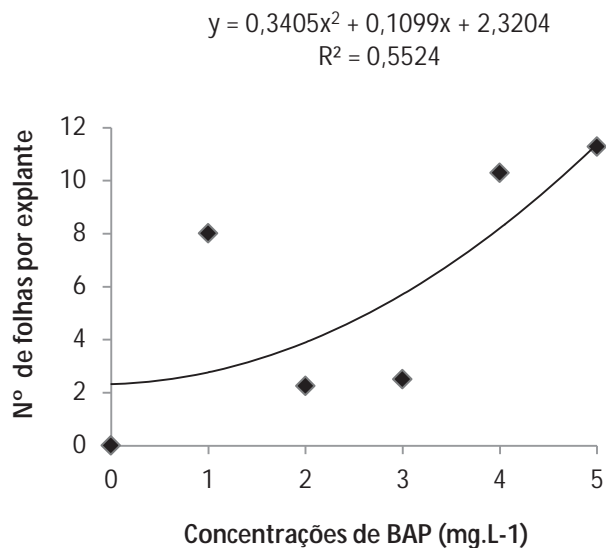


Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de folhas de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

Quanto ao comprimento dos explantes, a concentração de 3,0 mg L⁻¹ foi a mais eficiente, gerando explantes com tamanho médio de 182 mm (Figura 6) Grattapaglia & Machado (1998), que atribui os seguintes sintomas de toxicidade ao aumento da concentração de citocininas à partir da concentração ótima de uso: excessivo estufamento e falta de alongamento das brotações, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e vitrificação generalizada das culturas. Os resultados adquiridos pela indução de brotamento de explantes de ipê-branco corroboram estes fatores, tal como o ocorrido com Cordeiro et al. (2004) com o paricá e Chee & Poll (1989) com uva.

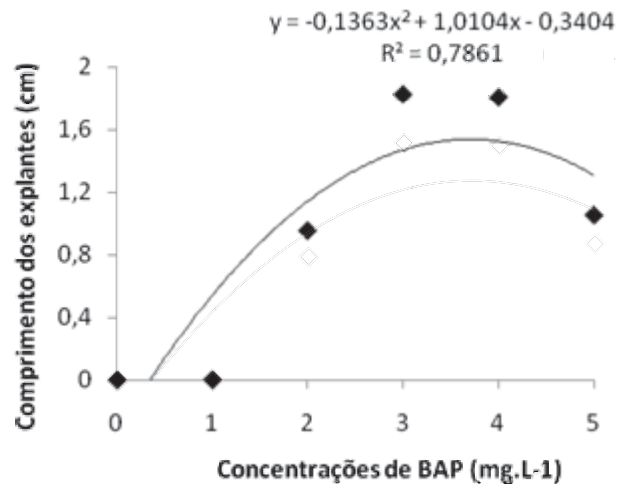


Figura 6 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no comprimento dos explantes (mm) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.

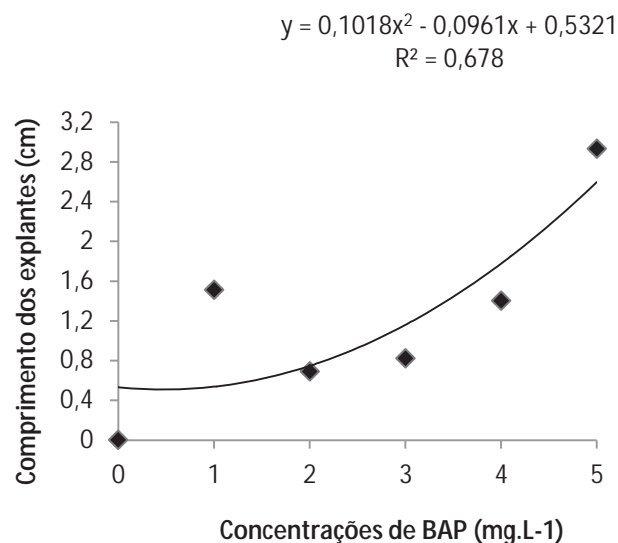


Figura 7 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no comprimento dos explantes (mm) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

Calos se formaram somente na concentração de 4,0 mg L⁻¹, atingindo 26,6% dos explantes, dado atribuído ao desbalanceamento nos níveis de fitohormônios contidos nos explantes expostos a esta concentração (Figura 8), o que está de acordo com o ocorrido com Cordeiro et al. (2004) na exposição dos explantes de paricá às maiores concentrações de BAP trabalhadas, no entanto, o autor parece ter obtido um aumento linear conforme o aumento da concentração de hormônio.

As concentrações de 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹ promoveram a formação de calo na região basal do explante adicionado ao meio com BAP em meio WPM, sendo que a concentração de 4 mg L⁻¹ foi a mais significativa quanto a este aspecto, atingindo 54% da base dos explantes que se desenvolveram (Figura 9).

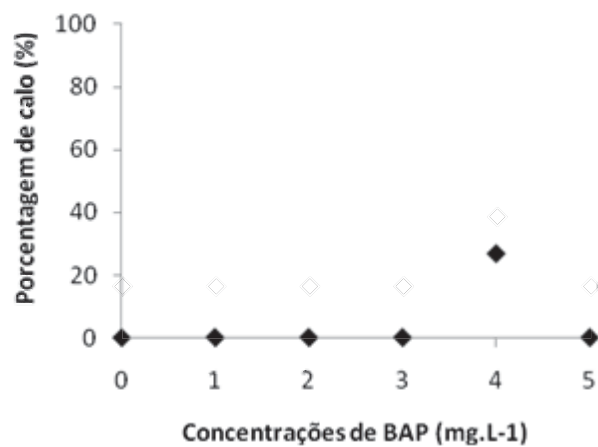


Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de BAP na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.

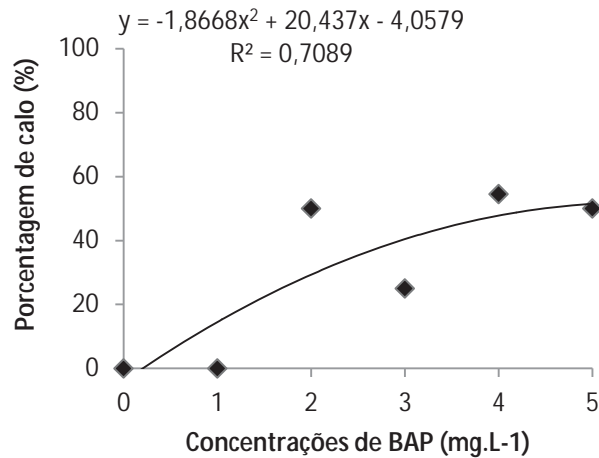


Figura 9 - Efeito de diferentes concentrações de BAP na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

O maior número de brotos ocorreu na concentração de 5,0 mg L⁻¹ com aproximadamente 3 brotos por explante adicionados ao meio, apresentando neste fator um aumento linear contínuo, sendo que quanto maior a concentração de BAP, maior o número de brotações produzidas (Figura 10), assim com o ocorrido para pitangueiras com Souza et al. (2008) que mostra um aumento progressivo com o aumento da adição do hormônio em questão, sendo que ainda, o autor avalia a adição de três hormônios diferentes (BAP, 2iP e Zeatina) quanto à sua ação na micropropagação desta planta, tendo o BAP como produtor dos resultados mais satisfatórios para a multiplicação *in vitro* da pitangueira.

A concentração de 3,0 mg L⁻¹ em meio WPM foi a que desenvolveu maior número de brotos por explante, com aproximadamente 2,5 brotos, apresentando um aumento da quantidade de brotos por explante até esta concentração, decaindo posteriormente à melhor concentração para este fator (Figura 11).

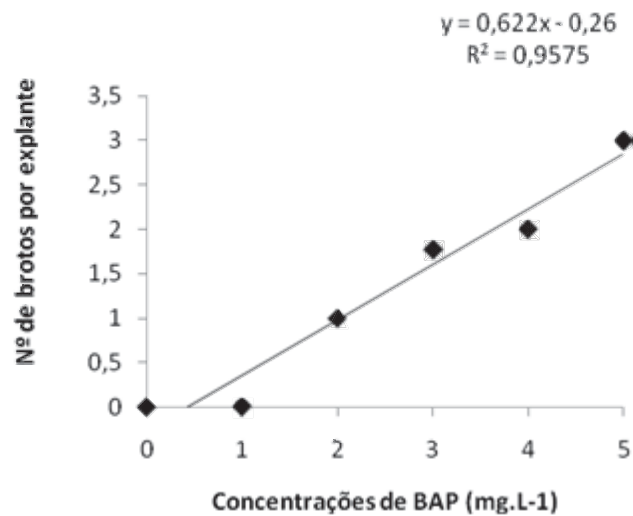


Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotos formados por explante de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.

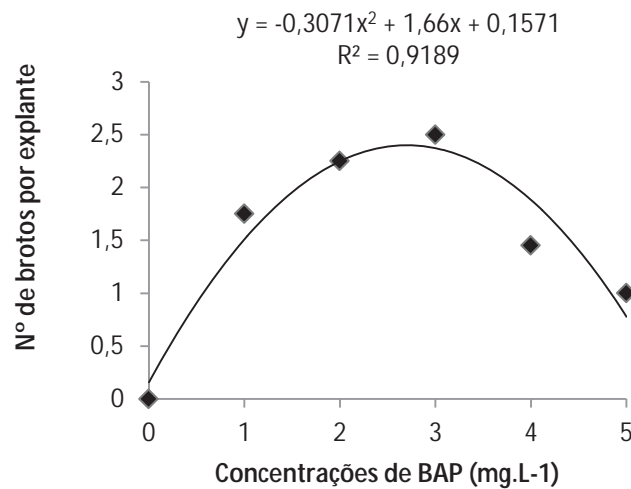


Figura 11 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotos formados por explante de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

Assim, é possível observar que o BAP é um eficiente indutor de brotações, sendo aconselhável seu uso entre as concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ para a micropropagação *in vitro* em meio MS, sendo o melhor tratamento possível entre os dois meios de cultura o de 4,0 mg L⁻¹ em MS, sendo que possivelmente também pode-se desenvolver em WPM, sendo a melhor concentração neste caso a de 4,0 mg L⁻¹.

3.2.2. Efeito da Cinetina na indução de brotações *in vitro* em meio MS e WPM nos explantes caulinares

A maior porcentagem de calos foram observadas na concentração de 3 mg L⁻¹ de cinetina (Figura 12). Notou-se o aparecimento de calo na base dos explantes caulinares em indivíduos de todos os tratamentos onde aplicou-se cinetina (Figura 13), em todas as concentrações. No tratamento controle, os explantes não se desenvolveram ou exibiram calo em sua base.

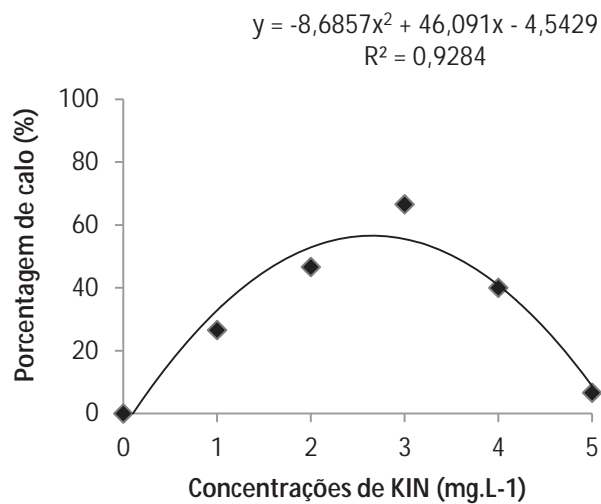


Figura 12 - Efeito de diferentes concentrações de KIN na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.



Figura 13 – Explante caulinar de ipê-branco tratado com cinetina.

O mesmo ocorre com Almeida (1996) ao tratar seus explantes foliares de urucueiro com cinetina, sendo que ao final do tratamento, todos os indivíduos apresentaram calo em sua base, sendo portanto ineficientes para a indução de brotações.

O tratamento do porta enxerto de videiras com cinetina também teve variações insignificantes em algumas variáveis quando comparadas com o grupo controle, não apresentando grandes desenvolvimentos de gemas axilares (DZAZIO et al, 2002), assim como Gray & Benton (1991) também observaram que a presença de cinetina no meio de cultivo de videira, apresentaram o mesmo efeito de quando ausentes.

As maiores porcentagens de brotos foram obtidas nas concentrações de 2 mg L⁻¹ e de 5 mg L⁻¹ de cinetina (Figura 14), que ainda assim apresentam uma baixa quantidade de brotos, não ultrapassando porcentagens superiores a 13,3% de brotos. É possível observar que os tratamentos realizados com BAP foram mais efetivos neste aspecto quando comparamos os resultados obtidos nos tratamentos observados.

É possível observar que nos explantes em que houve brotação, também houve desenvolvimento de calo na base dos explantes, como pode ser observado posteriormente (Figura 14).

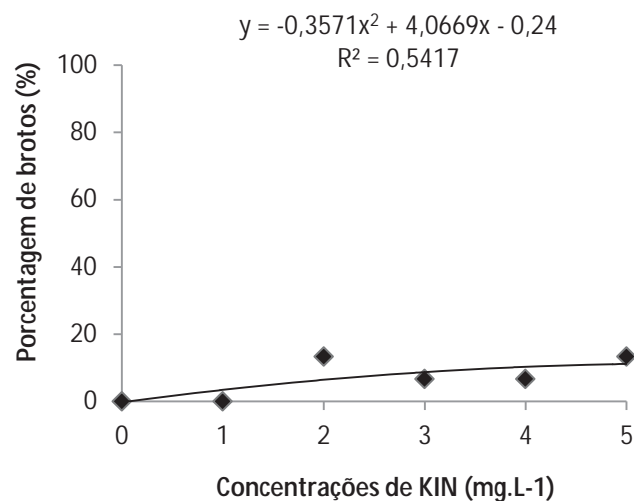


Figura 14 - Efeito de diferentes concentrações de KIN na formação de brotos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

O maior número de folhas por explante relativo aos explantes brotados ocorreu na concentração de 5,0 mg L⁻¹ com um número médio de 7,5 folhas por explante (Figura 15), de maneira oposta ao que ocorre para BAP em meio MS, que promove o maior número de folhas em concentrações intermediárias de hormônio vegetal.

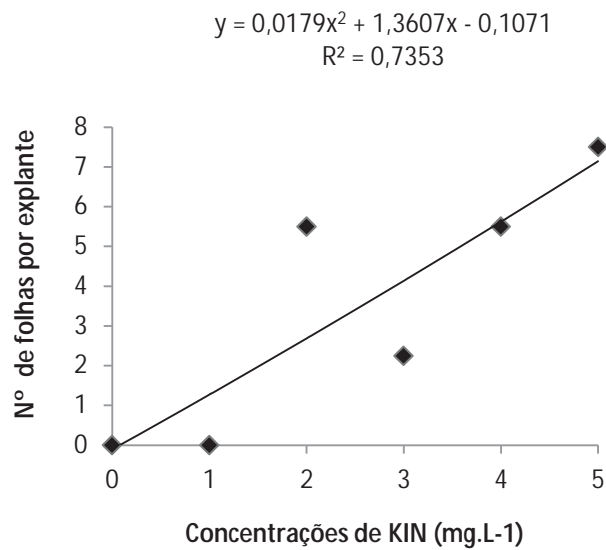


Figura 15 - Efeito de diferentes concentrações de KIN no número de folhas de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

A concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ em meio WPM foi a que mais promoveu o alongamento dos explantes, gerando explantes com tamanho médio de 132 mm (Figura 16).

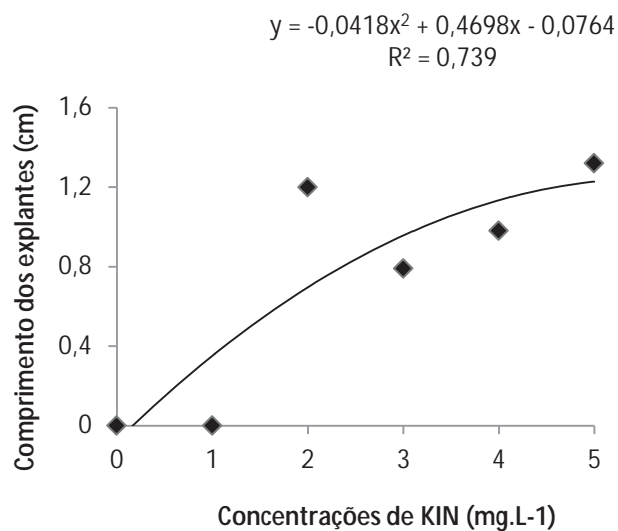


Figura 16 - Efeito de diferentes concentrações de KIN no comprimento dos explantes (mm) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

A maior porcentagem de calos foram observadas nas concentrações de 2 mg L^{-1} e de 5 mg L^{-1} de cinetina (Figura 17), mas ainda em proporção bem menor quando comparados com o tratamento que desenvolveu maior produção de calo na base dos explantes em meio

MS. No tratamento controle e na concentração de 1 mg L⁻¹, os explantes não exibiram calo em sua base.

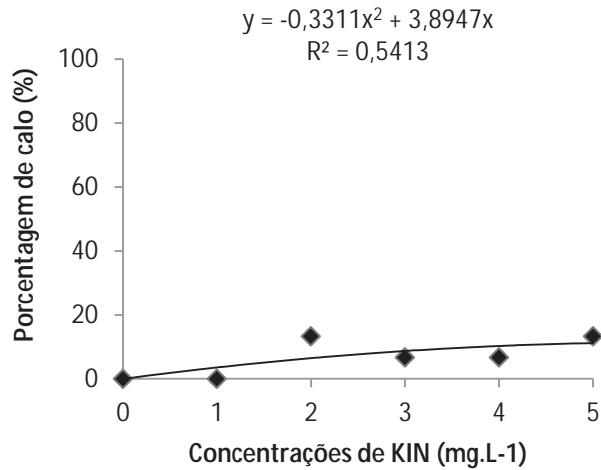


Figura 17 - Efeito de diferentes concentrações de KIN na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

O maior número de brotos ocorreu na concentração de 4,0 mg L⁻¹ com aproximadamente 4,66 brotos por explante adicionados ao meio, apresentando neste fator um aumento linear contínuo, como o ocorrido com BAP em meio MS para o ipê-branco, como expresso anteriormente, mantendo a tendência de crescimento proporcional contínuo em relação à concentração de hormônio e número de brotações produzidas (Figura 18).

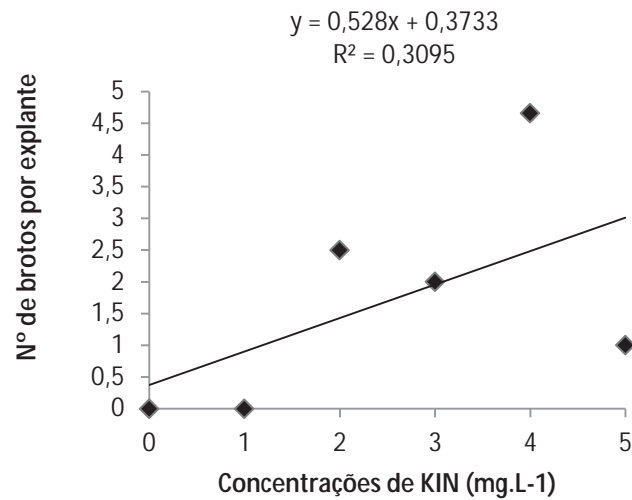


Figura 18 - Efeito de diferentes concentrações de KIN no número de brotos formados por explante de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

É possível observar que a cinetina não é um eficiente indutor de brotações, promovendo baixas porcentagens de brotação principalmente entre as concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ para a micropropagação *in vitro* em meio WPM, não sendo efetiva para tal aspecto em meio MS.

3.3. ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

3.3.1. Efeito do AIB (ácido indol-butírico) na indução de enraizamento *in vitro* em meio MS e WPM nos explantes caulinares

O efeito do AIB sobre o enraizamento direto dos explantes não apresentou resultados satisfatórios para o desenvolvimento das raízes, no entanto, ao final dos 50 dias, foi possível observar na base dos explantes que permaneceram vivos a presença de calo (Figura 19), um possível precursor da formação de raízes (Figura 20).



Figura 19 – Explante caulinar de ipê-branco tratado com AIB.

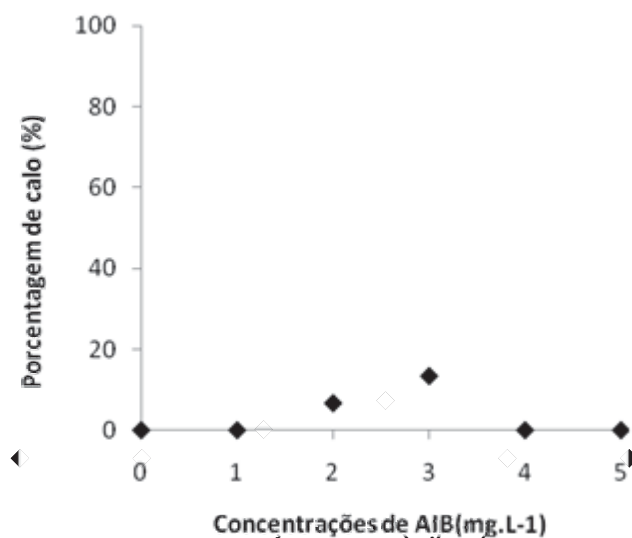


Figura 20 - Efeito de diferentes concentrações de AIB na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.

É possível que a tentativa de indução de enraizamento direto em explantes não brotados anteriormente tenha sido um fator dificultante para o desenvolvimento das raízes, no entanto, utilizando explantes diferenciados, Leite et al. (1994) e Lopes et al. (2001) também não tiveram bons resultados na formação de raízes com AIB em Pereira. cv. Bartlett e clone OH X F97 e mogno (*Swietenia macrophylla* King) respectivamente, mesmo com a transferência dos explantes para um novo meio sem regulador de crescimento, como o indicado por George (1996).

A formação de calo na base dos explantes apresenta uma possível chance de desenvolvimento de raízes. No entanto, é possível que isto não tenha ocorrido pela falta de variação na concentração do hormônio, prejudicando as fases iniciais do desenvolvimento da raiz. Isto é observado com o sucesso na indução da formação radicular com a mudança da concentração de hormônio no meio, quando aplicado a apices caulinares de mamoeiro (SCHIMILDT et al., 2009) e com mogno (LOPES et al., 2001), que conseguiu melhores resultados com ANA variando a concentração de hormônio no meio após o período inicial de indução.

Assim como no meio MS, o AIB aplicado diretamente sobre os explantes caulinares em meio WPM nas referidas concentrações não apresentou resultados satisfatórios para o desenvolvimento das raízes, apresentando ao final dos 50 dias, a presença de calo em sua base (Figura 21), podendo posteriormente sob outras induções desenvolver raízes.

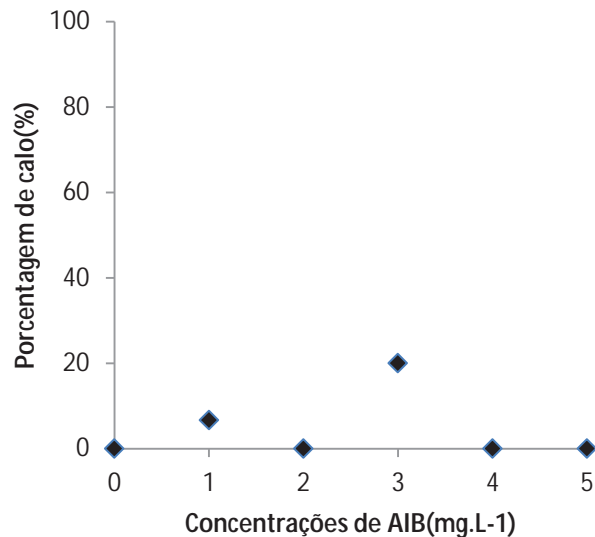


Figura 21 - Efeito de diferentes concentrações de AIB na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

Assim, é possível observar que o AIB não é um bom indutor da rizogênese para explantes caulinares de ipê-branco em nenhuma das concentrações utilizadas em ambos os meios, pois não promoveu de forma efetiva o desenvolvimento das raízes.

3.3.2. Efeito do ANA (ácido naftaleno acético) na indução de enraizamento *in vitro* em meio MS e WPM nos explantes caulinares

O efeito do ANA sobre o enraizamento direto dos explantes também não apresentou resultados satisfatórios para o desenvolvimento das raízes em meio MS, no

entanto, ao final dos 50 dias, a resposta foi semelhante ao ocorrido para o AIB, ocorrendo a presença de calo na base dos explantes (Figura 22).

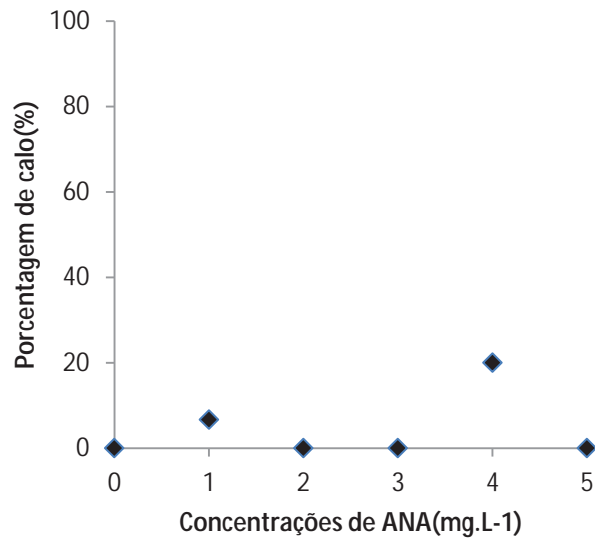


Figura 22 - Efeito de diferentes concentrações de ANA na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio MS.

As respostas às auxinas, não são universais, principalmente se tratando de plantas lenhosas, que enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas (Rohr & Hanus, 1987).

As doses de ANA utilizadas por Soares et al. (2007) para enraizamento de mangabeira também não proporcionaram a formação de raízes nas brotações cultivadas *in vitro*. Este regulador não exerceu efeito positivo na rizogênese e os níveis internos de auxinas dos explantes de mangabeira não foram suficientes para desencadear este processo morfo genético.

O nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxinas endógenas que induz à formação de raízes (Soares apud. Kulescha, 1988).

Em nenhum dos tratamentos utilizados obteve-se o enraizamento dos explantes caulinares. É possível que o explante tenha apresentado concentrações endógenas de citocininas que podem ter desfavorecido o balanço hormonal para a emergência de raízes.

O efeito do ANA sobre o enraizamento direto dos explantes em meio WPM também não apresentou resultados muito satisfatórios para o desenvolvimento das raízes, porém, ao final dos 50 dias, apresentaram índices muito altos de formação de calo na base dos explantes (Figura 23), sendo que no tratamento realizado com 2,0 mg L⁻¹ de ANA, os 20% dos explantes que não exibiram calo (Figura 24), desenvolveram inicialmente suas raízes chegando a aproximadamente 96,3 mm (Figura 25), sem atingir grandes proporções (Figura 26).

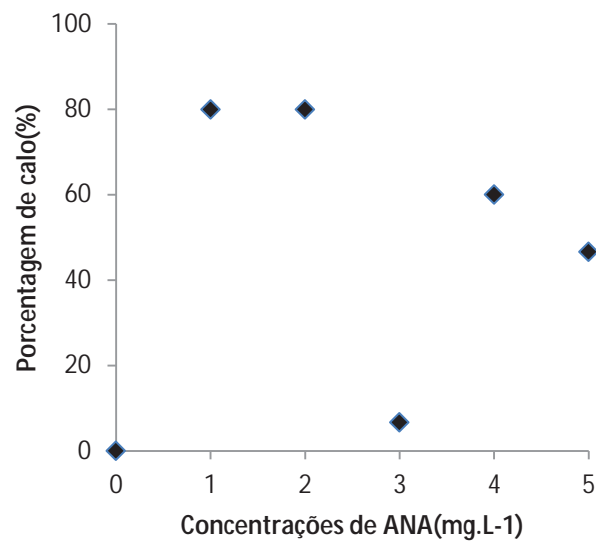


Figura 23 - Efeito de diferentes concentrações de ANA na formação de calos (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

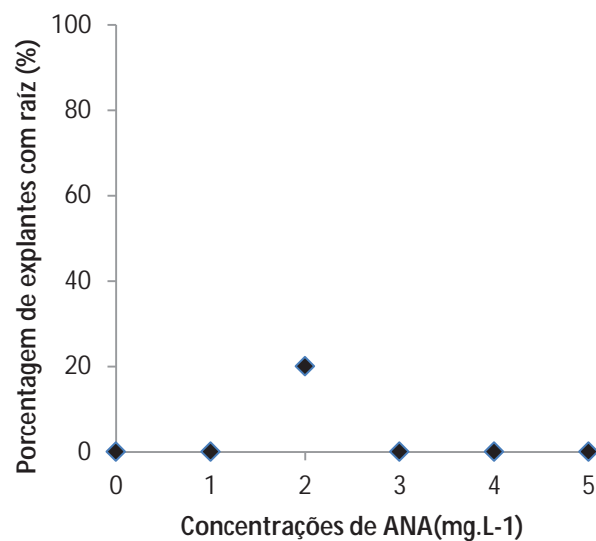


Figura 24 - Efeito de diferentes concentrações de ANA na formação de raíz (%) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.

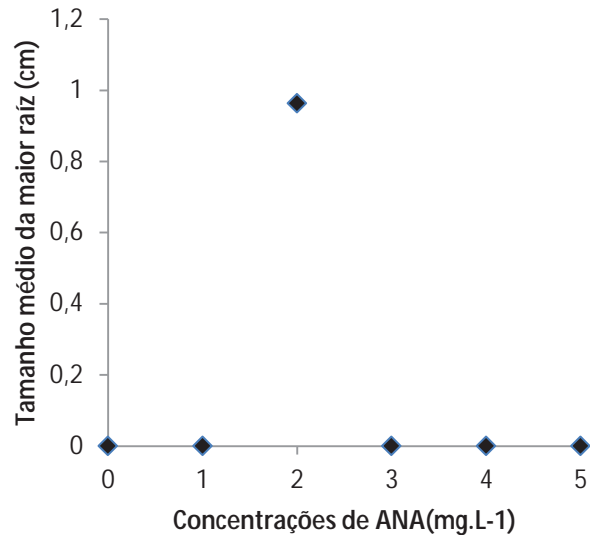


Figura 25 - Efeito de diferentes concentrações de ANA no comprimento médio da maior raíz (mm) de ipê-branco, após 50 dias em cultura *in vitro* em meio WPM.



Figura 26 – Explante caulinar de ipê-branco tratado com ANA portando desenvolvimento inicial de raíz *in vitro*.

Foi possível observar que o ANA também não é um bom indutor da rizogênese para explantes caulinares não submetidos a brotação anteriormen, sendo que somente a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA em meio WPM promoveu de forma inicial o desenvolvimento das raízes, porém com baixo alongamento e em baixas porcentagens.

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um protocolo para a desinfestação de sementes de ipê-branco foi satisfatório, tendo como melhor resultado a lavagem das sementes por 40 minutos, seguida da imersão em álcool 70% por 30 segundos e em hipoclorito 50% por 5 minutos com a retirada das alas, adicionando as sementes desinfetadas em meio MS 50% não suplementado, contendo apenas ágar 7% (0% de contaminação) aliado à posterior transferência das plântulas para o meio MS suplementado.

Quanto aos tratamentos aplicados aos explantes obtidos *ex vitro*, serão necessários novos testes visando estabelecer um protocolo adequado a desinfestação deste material.

Os explantes caulinares tratados com BAP a $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ apresentaram 93,3% de brotações bem desenvolvidas, enquanto em WPM a melhor concentração para brotação com BAP é a de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, não promovendo no entanto um tratamento tão efetivo como em MS.

Para cinetina, todos os tratamentos exibiram formação de calo e/ou ausência de brotações em meio MS, e baixa porcentagem de brotação em meio WPM.

Os tratamentos realizados com AIB e ANA não tiveram rizogênese efetiva em meio MS, apresentando formação de raízes pouco desenvolvidas em apenas poucos explantes no tratamento de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA em meio WPM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. L.; ALMEIDA, F. C. G.; NUNES, R. P.; ALMEIDA, F. A. G. . Indução de brotações em explantes de segmentos de folhas de plântulas de urucueiro em diferentes citocininas. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 26, n.1, pp. 45-49, 1996.
- ARRUDA, S. A. Produção de propágulos de batata doce *Ipomea batatas* L. obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida e bactericida. 2000. **Dissertação Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 42p, 2000.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa-CNPQ, v.1, p.183-260, 1998.
- BHOJWANI, S.S., MULLINS, K., COHEN, D. *In vitro* propagation of *Pyrus pyrifolia*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, p.247-254, 1984.
- BLAKESLEY, D.; WESTON, G.D.; HALL, J.F. The role of endogenous auxin in root initiation. **Plant Growth Regulation**, v.10, p.341-353, 1991.
- BORBA FILHO, A. B. & PEREZ, S. C. J. G. A. Armazenamento de sementes de ipê-branco e ipê-roxo em diferentes embalagens e ambientes. **Revista brasileira de sementes**, vol.31, n.1, p. 259-269, 2009.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras, recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **EMBRAPA SPI**, Brasília. 1994.
- CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA. 1999.
- CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**. vol.29, n.6, pp. 1281-1287, 2005.

CHEE, R.; POLL, R. M. Morphogenic responses to propaguls trimming spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 114, n. 2, p. 350-354, 1989.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**. Ano III, nº 19, 2001.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T. et al. Efeito do BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v.10, n.1, p.118-124, 2004.

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

COSTA, M. E. Morfoanatomia e desenvolvimento do fruto, semente e plântula de *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)**, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2003. 109p.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L. & FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 633-642, 2004.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual review of phytopathology**, London, v. 24, n. 5, p. 43-65, 1986.

DZAZIO, P.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, 2002 .

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

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

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part II – In Practice. Edingdon, Wilts : Exegetics, 1996. p. 1361.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH. 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ED.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH. p. 183-260. 1998.

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

HAMMERSACHLAG, R. S.; SISLER, H.D. Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): biochemical cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.3, p. 42-54, 1973.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. de R. e. Propagação de plantas frutíferas. **Fruticultura comercial**, Lavras: Ufla/Faepe, p. 319, 1996.

HOWARD, R. J.; AIST, J. R. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cel. **The Journal of Cell Biology**, v. 87, p. 55-64, 1980.

HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., et al. **Handbook of plant cell cultures**. New York : Macmillan, v.1, p.177-227, 1983.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Rules**, Norway, p. 117, 1976.

ISAAC, S. **Plant fungal interactions**. Chapman and Hall, London, 1992. p. 150.

LEE, H. J., KO, K. C. Effects of culture media and plant hormones on shoot tip culture of Fuji apple cultivar (*Malus domestica*). **Seoul National University Journal of Agricultural Sciences**, Seoul, v.9, n.1, p.67-77, 1984.

LEITE, D. L.; PETERS, J. A.; FORTES, G. R. L.; NAKASU, B. H. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento “in vitro” das cvs. de pereira “Bartlett”, “Hosui” e “Okusankichi” e clone do “OHxF97”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n.1, p.236-241, 1994.

LOPES, S. C. et al. Enraizamento in vitro de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Universidade Federal de Lavras. Lavras, Brasil. Ano/vol. 7, n. 1, p. 124, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa, SP, Brasil. Editora Plantarum. 2000.

MAEDA J.A.; MATTHES L.A. Conservação de Sementes de Ipê. Instituto Agronomico, Campinas, SP, Brasil. **Bragantia**. v. 43 , n.1, p. 51-61, 1984.

MARINO, G. Moltiplicazione e radicazione *in vitro* del peso cv. "William". **Revista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura Italiana**, Bologna, v.68, p.95-106, 1984.

MEIRA, Z. Developmental and structural patterns of in vitro plants. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S. (Ed.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 235-254, 1999.

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

MURASHIGE T; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.

NACHTIGAL, J. C.; ZECCA, A. C. D.; FIGUEIREDO, S. L. B.; FORTES, G. R. L. Influência da benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de kiwi (*Actinidia deliciosa*). **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 25, n. 1, p. 23-26, 1995.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 141-143, 2007.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. MAARA/ EMBRAPA/SPI/CPAP, Brasília. 1994.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse. In: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation: Technology and application*. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, The Netherlands. 1991.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, 1987.

ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**. Lancaster, v.58, p.131. 1971.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117, 2001.

SCHIMILDT, E. R. et al. Resposta rizogênica *in vitro* de ápices caulinares de mamoeiro 'Tainung 01' em diferentes tempos de permanência em meios de indução e regeneração. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 31, n.4, p.695-700, 2009.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**., Lavras, v. 31, n. 4, 2007.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da; FERRI, J.; SOARES, G. C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de

pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas. v. 13, n. 1, p. 115-118, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre-RS: Editora Artmed, 2004. 719p.

THOMAS, T. H. G. Benzimidazole fungicides on the germination of celery seeds. **Annals of Botany**, Boston, v. 65, n. 6, p. 238-239, 1973.

WATT, M. P.; GAUNTLETT, B. A.; BLAKEWAY, J. Fungal agents in cultures of *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, Africa, v. 37, n. 4, p. 607-610, 1995.

WU, W. S. Development and production of biofungicide. **Plant Pathology Bulletin**, Boston, v. 43, n. 3, p. 471-474, 1996.

YANG, H. J. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. Shoot and root development in culture media. **HortScience**, Alexandria, v. 11, n. 6, p.473-747, 1976.

ZORATO, M.F.; HOMECHIN, M.; HENNING, A.A. Efeito da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microorganismos em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.1, p. 159, 2001.

Prof. Dr. Massanori Takaki

Profa. Msc. Letícia Caravita Abbade

Raíssa Fonseca