

## Scientific Electronic Archives

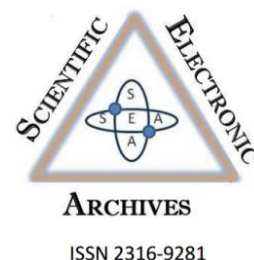
Issue ID: Sci. Elec. Arch. 9:3 (2016)

July 2016

Article link:

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=215&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Desinfestação, germinação e micropropagação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride

## Disinfection, germination and micropropagation *in vitro* of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride

D. Fabris<sup>1</sup>, T. Gerber<sup>2</sup>, L. M. Sartoretto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC

<sup>2</sup> Faculdade Concórdia - FACC.

Author for correspondence: [laudete@facc.com.br](mailto:laudete@facc.com.br)

**Resumo.** O presente trabalho objetivou o estabelecimento de protocolos de desinfestação, germinação e micropropagação *in vitro* de grábia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride). Para a desinfestação e quebra de dormência das sementes, foram testados três tratamentos, e inoculadas em tubo de ensaio contendo meio de cultivo. Já para variável germinação, foram testados quatro meios nutritivos, MS, MS ½, WPM, WPM ½. E, para indução da organogênese, o meio de cultura utilizado foi o WPM, suplementado com BAP, nas concentrações de 0,0; 0,4; 0,8 ml/L combinados com ANA na concentração de 0,05 ml/L. Os explantes utilizados neste estudo foram hipocótilos e cotilédones obtidos de plântulas de grábia germinadas *in vitro*, 30 dias após a inoculação em meio de cultivo. A indução da organogênese foi realizada em meio de cultivo WPM. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância. O tratamento III mostrou-se mais eficiente tanto para assepsia, como para quebra de dormência de sementes, proporcionando 92% de germinação e 2% de contaminação. Já para a germinação *in vitro*, os meios WPM e WPM ½ foram os mais efetivos, favorecendo 100% de germinação. Para as variáveis formações de calos e brotos em explantes de hipocótilos, não houve diferença significativa entre as concentrações de BAP testadas. Porém, observou-se em explantes de cotilédones que as melhores respostas ocorreram nas concentrações de 0,8ml e 0,4ml BAP e 0,05ml de ANA.

**Palavras-chaves:** germinação; quebra de dormência; organogênese.

**Abstract.** The present study aimed to establish the protocols for disinfections, germination and *in vitro* micropropagation of grábia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride). To disinfections and break seed dormancy, were tested three treatments, and inoculated into test tubes containing growing medium. As for variable germination were tested four medium of nutritious, MS, MS½, WPM, WPM ½. And, to introduce organogenesis, the growing medium used was WPM, supplemented with BAP, at concentrations of 0,0; 0,4; 0,8 ml/L, combined with ANA in the concentration of 0,05 ml/L. The explants used in this study were hypocotyls and cotyledons obtained from grapia seedling germinated *in vitro*, 30 days after inoculation in growing medium. The organogenesis induction was performed in WPM growing culture. The evaluated parameters in this study were the disinfection and break dormancy, germination and organogenesis induction. The data were subjected to variance analysis and the by Tukey test, at 95% of probability. Treatment III showed to be more efficient for both aseptic and to break seed dormancy, providing 92% of germination and 2% of contamination. As for the *in vitro* germination, the WPM and WPM½ growing cultures were the most effective, favoring 100% of germination. For various formations of calluses and sprouts on hypocotyls explants, there was no significant difference between the tested BAP concentrations. However, it was observed in cotyledon explants that the best results occurred at concentrations of 0,8 ml and 0,4 ml of BAP and 0,05 ml of ANA.

**Keywords:** Germination; Break dormancy; Organogenesis

### Introdução

*Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride conhecida como grábia, pertence à família Caesalpiniaceae é uma espécie florestal brasileira com ampla

distribuição, de grande importância e interesse madeireiro, encontrando-se, atualmente em processo de extinção (NICOLOSO et al, 2008). Sua madeira conhecida como madeira de Lei, é dura e

pesada, possuindo múltiplas aplicações como, na fabricação de tonéis e pipas, construção civil externa e interna, marcenaria e construção naval (Backes & Irgang, 2004).

*Apuleia leiocarpa* está cada vez mais escassa devido à devastação das florestas na sua área de ocorrência natural e à exploração de sua madeira de forma extrativista, sem haver reposição através de reflorestamento (Nicoloso et al., 1999). Além desses fatores, Backes e Irgang (2004) citam a dificuldade de propagação natural da espécie, a alta infestação de brocas nas sementes, em determinadas épocas, e o ávido consumo dessas por roedores e periquitos. Carvalho (1994) relatou que as sementes apresentam dormência física e comportamento recalcitrante o que dificulta a sua propagação natural. Dessa forma, a importância de utilizar a propagação *in vitro* para produção de mudas dessa espécie deve-se ao fato de que esta técnica permite a propagação massal de árvores elites ou economicamente importantes, sendo uma alternativa para a produção de mudas de *Apuleia leiocarpa*.

A técnica de propagação de plantas *in vitro*, constitui-se na cultura de células, tecidos e órgãos, em meio nutritivo e conduzida em condições assépticas (Xavier et al., 2007). Durante os últimos anos houve um expressivo aumento no uso da micropropagação, pois explantes provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro* são excelentes propágulos para o desenvolvimento dessa técnica, especialmente por apresentarem tecidos juvenis com pronta capacidade de crescimento e resposta morfogênica à aplicação de fitorreguladores (Grattapaglia & Machado, 1998). Contudo, um sistema de micropropagação depende do controle de grande número de variáveis, dentre eles a composição do meio de cultura e a fonte de explantes a serem utilizados.

Segundo Cid (2010), a cultura de tecidos hoje no Brasil, é uma realidade não apenas em muitos laboratórios acadêmicos, mas também em empresas privadas, bem articuladas comercialmente e relacionadas com culturas de importância econômica, tais como: cana-de-açúcar, flores, eucaliptos e pinheiros. Com isso, observa-se a carência de pesquisas voltadas para espécies florestais nativas, as quais foram intensamente exploradas, estando hoje ameaçadas de extinção, tendo em vista o direcionamento dos estudos para espécies florestais exóticas.

Desta forma, entende-se que a utilização da micropropagação vem auxiliar na produção clonal *in vitro* da *Apuleia leiocarpa*, garantindo o desenvolvimento de novos indivíduos, em grande escala, em menor espaço de tempo, em qualquer época do ano, com características superiores, livres de doenças e ataque de inimigos naturais durante seu desenvolvimento.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o melhor método de desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Apuleia leiocarpa*, testar diferentes composições de meio de cultivo para germinação e, estabelecer um sistema de regeneração *in vitro*, identificando a melhor fonte de explantes.

## Métodos

As sementes de *Apuleia leiocarpa* utilizadas nesse estudo foram adquiridas da Empresa M.P. Administradora Florestal Ltda., localizada na cidade de Ijuí/RS. As sementes foram coletadas em maio de 2012 na cidade de Porto Alegre-RS.

### Experimento I - germinação de sementes de *Apuleia leiocarpa*

Para a assepsia e quebra de dormência foram testados três tratamentos com cinco repetições e cada repetição contendo 10 tubos com uma semente em cada tubo. Para o tratamento I, as sementes foram submersas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, por 20 minutos sob agitação constante, em agitador magnético e, imediatamente, às sementes foram lavadas em água destilada por 5 minutos com agitação constante. No tratamento II, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada e uma gota de detergente durante 5 minutos, seguido por enxágue com água destilada autoclavada para remoção do detergente e imersão em álcool etílico 70% por um minuto. Após, foram colocadas em hipoclorito de sódio na concentração de 2,5% durante 5 minutos, como forma de desinfestação mais específica. Todas as etapas foram realizadas mediante agitação com o agitador magnético. Em seguida, foram submetidas a três enxágues com água destilada autoclavada. E no tratamento III, foi realizada a junção dos dois tratamentos anteriores.

O meio de cultura utilizado para a inoculação das sementes foi o Wood Plant Medium (WPM) (Lloyd e McCown, 1981) sendo descrito como: MCCOWM MISTURA BASAL PARA CULTURA, o qual foi adquirido da empresa Sigma - Aldrich Brasil Ltda de São Paulo, como mistura pronta sendo recomendado a utilização de 2,3 g/L. Para a preparação do meio foi utilizado água destilada e autoclavada, 6 g/L de ágar, 30 g/L de sacarose, becker, bastão de vidro, bailarinas, agitador magnético e microondas. Primeiramente, efetuou-se a diluição da mistura em água destilada/autoclavada em agitador magnético. Logo após, foi acrescentado o ágar e colocado em forno microondas para auxiliar na diluição.

Depois de preparado o meio, este foi distribuído nos tubos de ensaio, sendo estes fechados com papel-alumínio e colocados para autoclavar durante 20 minutos. Com os meios de cultivos prontos, as sementes foram desinfestadas e inoculadas nos tubos de ensaio. Este procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar, com auxílio

de lamparina a qual foi utilizada para fazer a flambagem dos tubos e esterilização dos instrumentos utilizados.

Logo após a inoculação das sementes, os tubos foram novamente fechados com papel alumínio e filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC). Em seguida, estes, foram colocados em estantes devidamente identificadas e mantidos em sala de cultivo durante 21 dias com temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 h.

#### *Experimento II - assepsia e quebra de dormência das sementes de A. leiocarpa*

Para o teste de germinação o experimento foi composto por quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição compostas por 10 tubos de ensaio com uma semente em cada. Os meios de cultivos utilizados foram formulações prontas de Murashige e Skoog, (1962), (MS) MS  $\frac{1}{2}$ , WPM, WPM  $\frac{1}{2}$ , adquiridas da Empresa Sigma – Aldrich.

Para o tratamento I foi realizada a inoculação das sementes em meio de cultura MS, o tratamento II, foi realizada a inoculação das sementes em meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$ , o tratamento III a inoculação das sementes foi em meio de cultura WPM e no tratamento IV as sementes foram inoculadas em meio de cultura WPM  $\frac{1}{2}$ .

A análise dos dados foi realizada através da contagem de sementes germinadas em estado de plântula, não sendo levada em consideração a contaminação das mesmas, aos 30 dias após a inoculação.

#### *Experimento III – organogênese*

Para a indução da organogênese *in vitro*, foram utilizados como explantes segmentos de cotilédones e hipocótilos isolados de plântulas de *Apuleia leiocarpa* germinadas *in vitro*, com 30 dias de idade. O experimento contou com três tratamentos e 10 repetições, sendo que cada placa da Petri correspondeu a uma repetição e, em cada placa foram inoculados oito explantes (quatro segmentos de cotilédones e quatro de hipocótilos). Ambos os tratamentos continham 0,05 ml de ácido  $\mu$ -naftalenoacético (ANA) e concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) de 0,0, 0,4 e 0,8 ml, sendo nomeadas como TI, TII e TIII.

O meio nutritivo utilizado foi o WPM (mistura pronta) acrescentado de 30g/l de sacarose, 6 g/l de ágar e o pH ajustado para 5,8. Depois de preparados, os meios foram levados para a autoclave durante 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Posteriormente, os meios foram levados para a capela de fluxo laminar e distribuídos em placas de Petri, deixando-os por alguns minutos até esfriar. Com o meio frio efetuou-se o isolamento e inoculação dos explantes.

Após a inoculação dos explantes em meios nutritivos, as placas foram vedadas com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC) e os tratamentos

identificados. As culturas foram incubadas e mantidas em salas de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$ °C, umidade relativa do ar em torno de 70% e fotoperíodo de 16 horas.

A avaliação foi realizada pela contagem do número de explantes com brotações, 50 dias após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado nos três experimentos foi o inteiramente casualizado e a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (pt) (Silva & Azevedo, 2009).

## **Resultados e discussão**

### *Assepsia e quebra de dormência das sementes de Apuleia leiocarpa*

A análise dos resultados mostrou que o tratamento II diferiu significativamente dos tratamentos I e III (Figura 1). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos I e III, verificou-se uma tendência de aumento na porcentagem de germinação das sementes submetidas ao tratamento III, no qual 92% das sementes germinaram seguidas do tratamento I com 90% e do tratamento II com 58% de germinação (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Nicoloso et al. (1997), em estudo sobre o efeito de métodos de escarificação na superação da dormência de sementes e de substratos na germinação e no desenvolvimento da *A. leiocarpa*, no qual a maior porcentagem de germinação foi obtida pela imersão das sementes no H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 20 minutos.

Para sementes de flamboyante (*Delonix regia*), Missio et al. (2011), obtiveram porcentagens de germinação menores que as obtidas no presente estudo. Os autores testaram diferentes concentrações e tempo de imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo que nos tratamentos em que as sementes foram imersas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% durante 180 minutos, 120 minutos e 90 minutos, a porcentagem de germinação obtida foi de 53% para ambos os tratamentos. Lemos Filho et al. (1997), trabalhando com sementes de fedegoso (*Senna macranthera*), espécie pertencente à mesma família da *Apuleia leiocarpa*, não verificaram diferença significativa entre a escarificação mecânica com lixa abrasiva e a escarificação química com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 12 minutos. Neste estudo, os autores obtiveram 63% e 74,7% de sementes germinadas, respectivamente, ambos mostraram um aumento estatisticamente significativo em relação ao controle, com 41,5% de sementes germinadas.

Conforme Nicoloso et al. (1997), “[...] o uso da escarificação química com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado mostra-se eficiente para a superação da dormência e seguro para a germinação das sementes de grápia e de outras espécies”. A passagem das

sementes de grápia em água fervente pode ser um tratamento eficiente para a quebra de dormência, mas por mais rápida que seja esta passagem, ela causa danos a germinação das mesmas (Nicoloso et al., 1997).

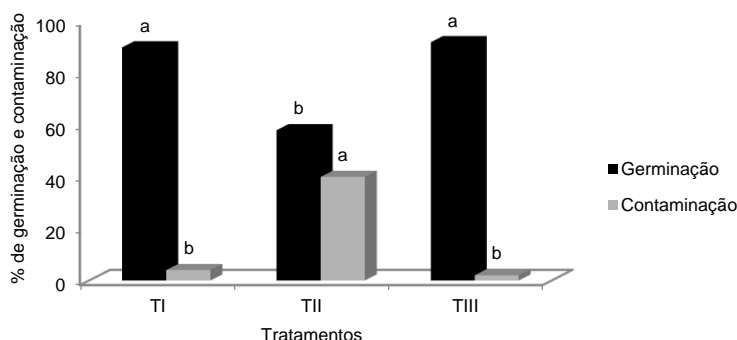
Para assepsia das sementes, os resultados obtidos mostraram que o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> também é um excelente agente descontaminante, sendo que os dois tratamentos submetidos a este, resultaram em quase 100% de descontaminação, ou seja, o T1 teve 4% de sementes contaminadas e o TIII apenas 2%, enquanto que o TII onde as sementes não foram submetidas ao H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a contaminação foi de 40% (Figura 1).

Estes resultados concordam com a afirmação de Lencina et al. (2010), os quais ressaltam que a utilização de NaOCl é desnecessária para a assepsia de sementes de *Apuleia leiocarpa*, e que a aplicação de ácido sulfúrico, além de quebrar a dormência, contribui para a desinfestação das sementes.

Rosa et al. (2012) concluíram “[...] que a escarificação mecânica, efetuada com lixa, é um método eficiente para superação da dormência em sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), resultando em uma maior porcentagem de germinação”.

A Figura 1 mostra a ocorrência de contaminação no cultivo *in vitro* das sementes de *Apuleia leiocarpa*. A maior porcentagem de contaminação e, conseqüentemente uma redução média de 33% do seu potencial de germinação ocorreu nas sementes submetidas ao tratamento II. Supõe-se que a ocorrência de microorganismos (fungos e bactérias) na cultura *in vitro*, pode ter contribuído para a redução da germinação das sementes de *Apuleia leiocarpa*.

Kalil Filho et al. (2000), relataram que a utilização de hipoclorito de sódio associado ao tempo de desinfestação na presença e ausência de luz foi considerada eficiente na descontaminação e germinação de mogno (*Swietenia macrophylla*), obtendo 100% da capacidade de germinação, mesmo quando as sementes apresentavam 11,8% de contaminação por fungos e bactérias. Em tratamentos pré-germinativos em sementes de caixeta (*Dydimopanax morototoni*), a escarificação química com HCl e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%, durante 5 e 10 minutos, não produziu efeito desejado, sendo ineficaz, para a germinação (Franco; Ferreira, 2002).



**Figura 1:** Porcentagem de germinação e contaminação de sementes de *Apuleia leiocarpa*, submetidas a diferentes métodos de assepsia e quebra de dormência.

Franco e Ferreira (2002), concluíram que lavagens com água destilada e mistura álcool mais água por 45 minutos foram os tratamentos mais eficazes e que promoveram o processo de germinação de *Dydimopanax morototoni*, em 60% e 66% respectivamente. Por outro lado, os mesmos autores relataram que sementes de caixeta não germinaram em meio MS, quando foram submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação, sugerindo que a mesma tenha ocorrido devido à grande incidência de fungos saprófitos e sua proliferação nos cultivos *in vitro*.

Diferentes tratamentos têm sido utilizados em espécies florestais visando minimizar os problemas de contaminação e maximizar a germinação das

sementes. Em estudo de propagação *in vitro* de farinha-seca (*Albizia niopoides*) realizado por Rossi e Sartoretto (2013), as mesmas verificaram que houve um aumento no número de sementes germinadas e diminuição da porcentagem de contaminação das sementes, com o aumento do tempo de imersão das sementes em hipoclorito de sódio, mas os resultados não diferiram estatisticamente entre si.

Em trabalho sobre desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam)), as sementes desinfestadas com 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio durante 30 e 15 minutos, respectivamente, apresentaram maior

porcentagem de germinação e forneceram as menores porcentagens de contaminação fúngica e/ou bacteriana (Nascimento et al., 2007).

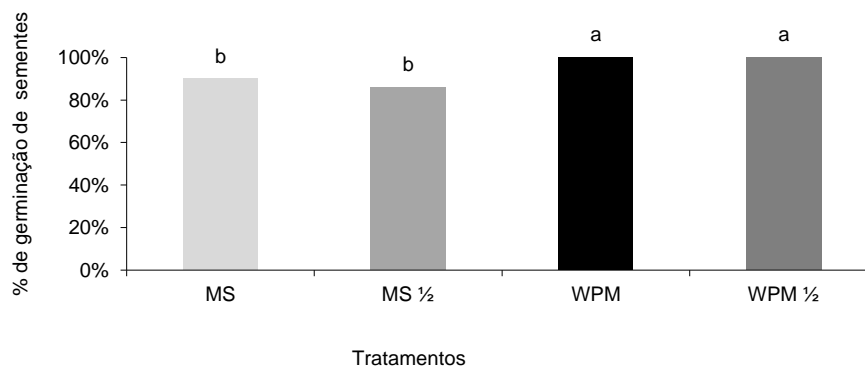
#### Germinação de sementes de *Apuleia leiocarpa*

No experimento II, a análise estatística mostrou diferença significativa somente entre os meios MS e WPM, sendo que, no meio de cultura WPM e WPM ½ 100% das sementes germinaram. Já no meio de cultura MS obteve-se 90% de sementes germinadas e no MS ½ 86%, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 2). Resultados similares foram encontrados por Fick (2007) em seu estudo com louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud), o qual analisou que o meio WPM proporcionou maior crescimento e enraizamento dos propágulos do que o MS ½, em todas as variáveis analisadas.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o meio de cultura WPM apresenta uma proporção e composição salina diferenciada em relação ao meio MS e maior disponibilidade da

vitamina Tiamina – HCl, a qual apresenta resultados benéficos para a multiplicação em concentrações superiores à do meio MS.

Em estudo sobre germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith), os maiores percentuais de germinação *in vitro*, ocorreram nos meios de cultura com redução nas concentrações salinas. O meio de cultura MS/2 foi o que promoveu o maior percentual de germinação, já o meio de cultura MS foi o menos eficaz (Fermínio Junior; Scherwinski-Pereira, 2012). Os mesmos autores relatam que a germinação nas distintas concentrações dos sais de MS (MS, MS/2, MS/4) mostraram diferenças, enquanto que a utilização dos sais de WPM mostraram semelhanças nas concentrações integrais (100%) e reduzidas à metade (WPM/2). Resultados similares foram encontrados neste estudo, onde no meio WPM e WPM ½, proporcionaram uma germinação de 100% das sementes de *Apuleia leiocarpa*.



**Figura 2:** Porcentagem média de sementes de *Apuleia leiocarpa* germinadas em diferentes meios de cultivo *in vitro*.

Em teste de germinação *in vitro* com sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), Zanotti et al. (2012), concluíram que o meio de cultura MS, na concentração total de sais, de um modo geral, possibilitaram maiores porcentagem de germinação. Já para a espécie *Mimosa scabrella*, Rosa et al. (2012), relataram que a germinação *in vitro* desta espécie é otimizada pelo cultivo em meio de cultura MS reduzido ¼ da concentração de sais.

#### Organogênese

O processo de organogênese em plantas resulta da interação entre competência celular, determinação e diferenciação celular, sendo todas influenciadas e dirigidas por substâncias promotoras do crescimento (Christianson & Warnick, 1985 apud Sartoretto et al., 1999). As células competentes adquirem determinação após um determinado sinal e entram em processo de diferenciação. Os promotores de crescimento (auxina/citocinina)

controlam este processo, sendo que as auxinas restaurariam a competência das células a entrarem em divisão e, as citocininas, permitiriam a entrada efetiva das células no ciclo de divisão (Zhang et al., 1996 apud Sartoretto et al., 1999).

A formação de calogênese (calo) foi observada tanto em explantes derivados de hipocótilos quanto de cotilédones (Figura 3A, B, C, D e E), nos tratamentos I, II e III. No Tratamento I, a formação de calos, primórdios de brotos e raízes foi observada somente em explantes derivados de hipocótilos (Figura 3 B e C; Figura 4), em explantes de cotilédones houve uma reduzida formação de calos. Já a organogênese (formação de calos e de brotos) pode ser observado nas Figuras 3 D e E, tratamento III e II, respectivamente. Este resultado sugere que o uso de 0,4ml/L e 0,8ml/L de BAP + 0,05ml/L de ANA, mostraram-se efetivos na indução da organogênese, tanto diretos como indireta, em explantes juvenis de *Apuleia leiocarpa*.

Candido e Testa (2009), trabalhando com hipocótilos de cedro (*Cedrela fissillis* Vell.) encontraram maior porcentagem de formação de gemas na concentração de 7,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA. No mesmo estudo testando formação de raízes, as mesmas concluíram que a maior porcentagem de formação ocorreu nas concentrações de 0,5 a 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA.

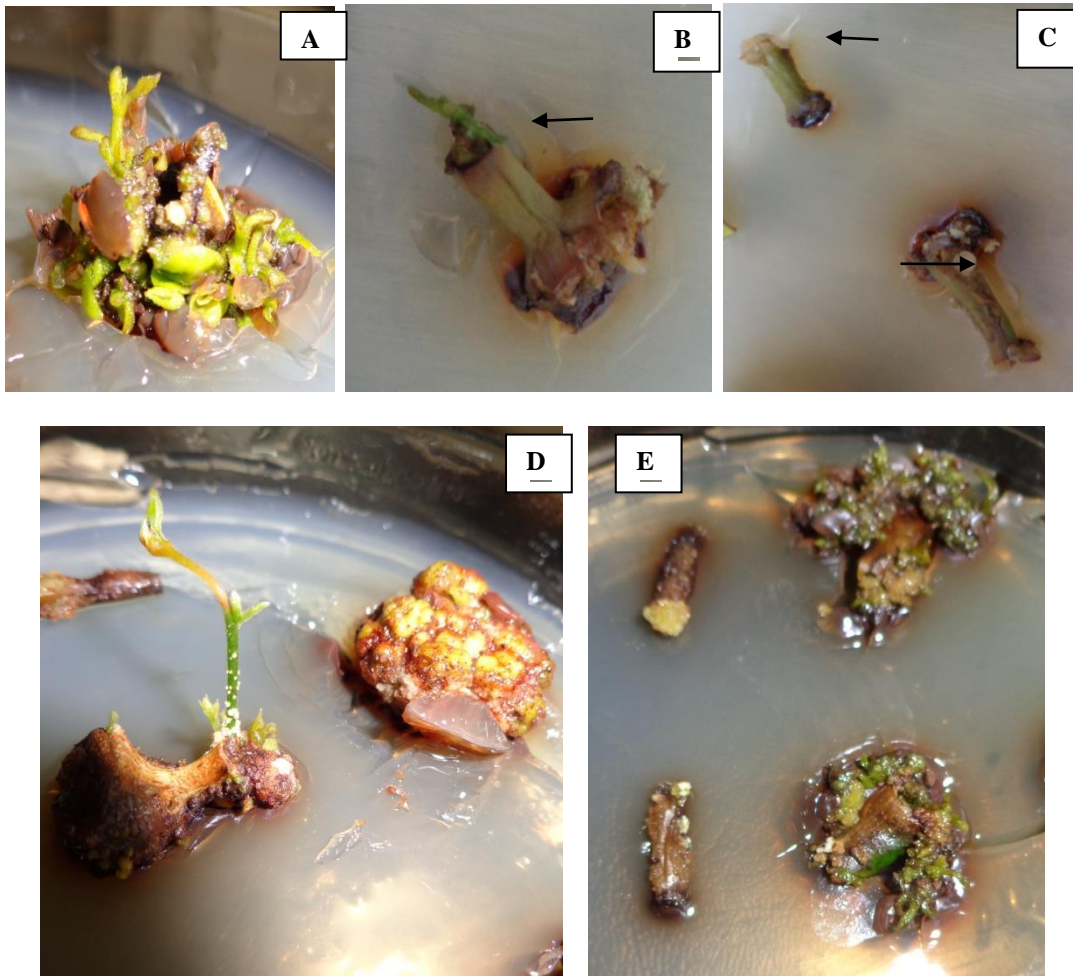
De acordo com o observado na Figura 5, em explantes derivados de hipocótilos, não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de BAP testadas para a formação de calos, sendo que a média geral dos tratamentos foi de 37%, nestes explantes, não se observou a formação brotos.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o uso em excesso de BAP pode ser tóxico e caracteriza-se principalmente, por apresentar falta de alongamento das brotações, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento do caule e hiperhidricidade, dificultando o enraizamento. Como pode ser observado nas Figuras 4A e B, as concentrações de 0,4ml/L e 0,8ml/L de BAP, favoreceram o

desenvolvimento de calos com primórdios de brotos, bem como a formação de um broto, mostrando que a colocação dos autores não se aplicou no estudo com *Apuleia leiocarpa*.

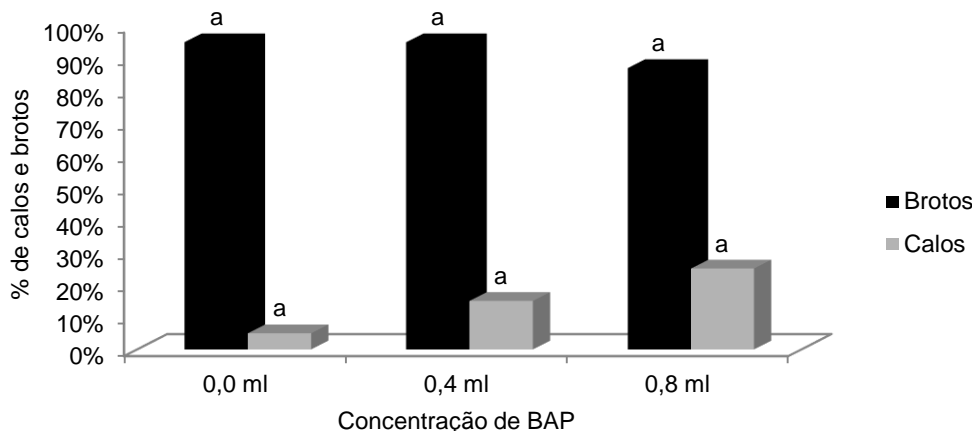
Conforme Xavier, Otoni & Penchel (2007), quando as gemas se formam diretamente sobre os explantes, a organogênese é denominada direta [...]. Se a formação da gema é precedida pela formação de calo, a organogênese é denominada indireta, dando origem a gemas, que crescem e se desenvolvem, formando novas partes aéreas.

Stein et al. (2007) em trabalho realizado com segmentos caulinares de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn), observaram um efeito inibitório quanto ao tamanho de brotação à medida que foi aumentada a concentração de BAP e em ausência de ANA. Entretanto, quando as diferentes concentrações de BAP foram combinadas com 0,5 $\mu\text{M}$  de ANA, houve uma tendência a aumento no número de brotações, até a concentração de 2,5 $\mu\text{M}$  BAP. No entanto, aumentando-se a concentração de ANA para 2,5 $\mu\text{M}$ , novamente ocorreu uma tendência à redução no tamanho médio de brotações, à medida que foi aumentada a concentração de BAP.





**Figura 3:** Obtenção de brotos e primórdios de brotos e raízes em explantes de *Apuleia leiocarpa*, cultivados *in vitro*, nas diferentes concentrações de BAP. (A) Brotos em cotilédones de *Apuleia leiocarpa*, tratamento I (50 dias); (B) Hipocótilo com primórdios de brotos, tratamento I (30 dias); (C) Hipocótilo com primórdios de raízes, tratamento I (30 dias); (D) Broto e primórdio de brotos de *Apuleia leiocarpa* obtidos no tratamento III (50 dias); (E) Calos e primórdios de brotos de *Apuleia leiocarpa* obtidos no tratamento II (50 dias).



**Figura 4:** Porcentagem média de calos e brotos obtidos em explantes derivados de hipocótilos de *Apuleia leiocarpa in vitro*, submetidos a diferentes concentrações de BAP.

Para os explantes derivados de cotilédones, os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 0,4 ml e 0,8 ml de BAP, sendo que diferenças significativas foram observadas entre os três tratamentos (Figura 5). Grattapaglia e Machado (1998) ressaltam que a adição de citocininas no meio nutritivo é favorável, ou até mesmo necessária, sendo que o BAP de modo geral, é o que apresenta os melhores resultados. Segundo LEMOS (2010), a adição exógena de reguladores de crescimento ao meio de cultura desencadeia um desbalanço hormonal endógeno dos tecidos dos explantes. Desta forma, a presença constante ou excessiva de citocininas e de auxinas no meio de indução ou de multiplicação de brotos pode desequilibrar exageradamente o balanço hormonal endógeno dos explantes, além de inibir as respostas desejadas. Como pode ser observado na Figura 5, o tratamento contendo 0,4 ml de BAP foi o que se mostrou mais efetivo na formação de calos e brotos. Esse resultado demonstra que concentrações entre 0,2 ml a 0,6 ml de BAP podem induzir melhores resultados, sendo que concentrações inferiores ou superiores a esses valores não seriam indicados para a multiplicação da espécie *Apuleia leiocarpa*.

Alves et al. (2004), ao estudarem a capacidade organogênica de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, ressaltaram, que os melhores resultados de formação de calos nos três genótipos testados foram observados nos tratamentos com a combinação dos reguladores de crescimento TDZ (0,5 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), obtendo-se 100% de calejamento em explantes foliares.

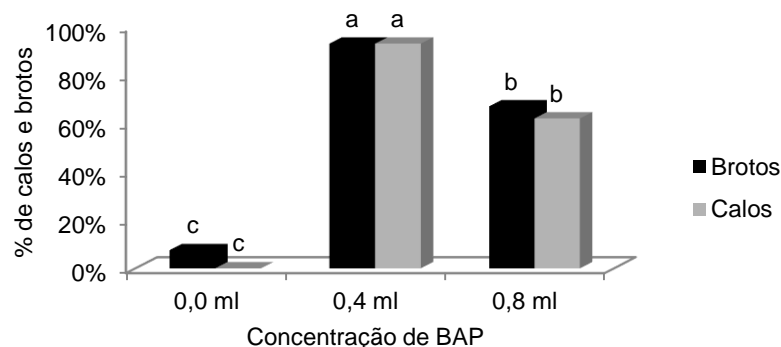
Para indução da organogênese em hipocótilos de *Cedrela fissillis*, Candido e Testa (2009) encontraram melhor resposta na formação de gemas quando os explantes foram inoculados em meio contendo 2,5 µM de BAP e 1,0 µM de ANA. Já para formação de raízes as mesmas autoras obtiveram melhores resultados com concentrações maiores, 7,5 µM de BAP e 1,0 µM de ANA. Ao estudarem diferentes concentrações de citocininas, para a indução de proliferação de brotos em segmento nodal de pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Martius), Arello & Pinto (1993), obtiveram resultados satisfatórios utilizando concentrações de 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP associado com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Já Martinotto (2004), encontrou como a combinação mais eficiente para a indução de brotações em segmentos nodais de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC) as concentrações de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Cordeiro et al. (2004) testando diferentes concentrações de BAP com a finalidade de obter brotações de segmentos nodais de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), concluíram que o tratamento com 3 mg.L<sup>-1</sup> BAP foi o que apresentou maior número de proliferação dos brotos, com 2,14 brotos por explante.

No que concerne à variabilidade genética, pode-se dizer que, observando o comportamento *in vitro* de cotilédones e hipocótilos de *Apuleia leiocarpa* submetidos a um mesmo tratamento, observou-se desde a ausência de formação de calos em explantes, até calos em diferentes estágios de desenvolvimento. Este tipo de resposta observada em cultivos *in vitro* (cultura de tecidos vegetais), é denominado como genótipo especificidade ou genótipo dependência. Porque

diferentes resultados podem ser observados no desenvolvimento de plantas pertencentes ao mesmo gênero, à mesma espécie e diferentes

cultivares ou, simplesmente, genótipos diferentes (Amirato, 1986 apud Golle, 2010, p. 82).



**Figura 5:** Porcentagem média de calos e brotos obtidos em explantes derivados de cotilédones de *Apuleia leiocarpa in vitro*, submetidos a diferentes concentrações de BAP.

De acordo com Golle (2010), um fator que deve ser levado em consideração no cultivo *in vitro* é a oxidação fenólica. Este autor, trabalhando com a espécie cerejeira (*Eugenia involucrata* DC), relatou que a oxidação fenólica interferiu na resposta dos explantes quando submetidas a diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento. O mesmo concluiu que a ausência de luminosidade foi, de forma geral, favorável para a prevenção da oxidação fenólica, provavelmente porque na ausência da luz a atividade da enzima fenilalanina amoniliase (PAL) foi menor, desfavorecendo o processo de oxidação nos explantes.

Neste estudo, a oxidação não influenciou de maneira significativa na formação de calos. Golle (2010) relatou em seu estudo, que as oxidações não inviabilizaram o desenvolvimento dos calos, sobretudo quando ocorreram em manchas isoladas ou de forma branda. Porém, o autor descreve que na presença de luz observou um aumento significativo das oxidações, impedindo com isso, o desenvolvimento dos calos, reiterando a observação de que, na ausência de luminosidade, a desdiferenciação celular é mais promissora.

### Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- O tratamento III foi o mais eficiente tanto para assepsia, como para quebra de dormência de sementes de *A. leiocarpa*, o qual proporcionou 92% de germinação e apenas 2% de contaminação.

- Para a germinação *in vitro* de sementes de *A. leiocarpa*, os meios WPM e WPM $\frac{1}{2}$  foram os mais efetivos, favorecendo 100% de germinação.

- Para as variáveis formações de calos e brotos em explantes derivados de hipocótilos, não houve diferença significativa entre as concentrações de BAP testadas.

- Para os explantes derivados de cotilédones, a melhor resposta obtida para as variáveis formações de calos e brotos, foi na concentração de 0,4ml BAP e 0,05ml de ANA.

### Referências

ALVES, E. C. S. de C. et al. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex maiden x *E.urophylla* s. t. blake. **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.643-653, 2004.

ARELLO, E. F; PINTO, J. E. P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* L. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 25-31, jan. 1993.

BACKES, P; IRGANG, B. **Mata Atlântica - As árvores e a paisagem**. Porto Alegre: Paisagem do Sul, 2004. 396 p.

CANDIDO, D. F; TESTA, M. M. B. **Estabelecimento de protocolos de desinfestação, germinação e regeneração *in vitro* para sementes de cedro (*Cedrela fissillies* Vell.)** Xanxerê, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia



- Florestal) – Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê, 2010.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Brasília: Embrapa- CNPF, 1994. 639 p.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J.B. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. In: CID, L. Pedro Barreto. **Cultivo in vitro de plantas.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. cap. 6, 157-234.
- CORDEIRO, I. M. C. C et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (PARICÁ). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 118-124, jan./jun. 2004.
- 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, jan.-mar, 2012.
- FICK, T. A. **Estabelecimento in vitro e propagação de *Cordia Trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (louro-pardo).** 2007. 63f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- LEMON FILHO, J. P. et al. Germinação de sementes de *Senna macranthera*, *Senna multijuga* e *Stryphnodendron polyphyllum*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.32, n.4, p.357-361. 1997.
- GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** 2010. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. Et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa, EMBRAPA - CNPH, 1998. v. 2. p. 183 – 260.
- FRANCO, E. T. H; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Dydimopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p.1-10, 2002.
- KALIL F. A. N. et al. A Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS – FOREST 2000, 6, 2000, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: [s.n.], 2000.
- MARTINOTTO, C. **Cultivo in vitro e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.).** 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- MISSIO, E. L. et al. Respostas de sementes de flamboyant submetidas a dois métodos de superação de dormência. **Revista FZVA**, Uruguaina, v. 18, n.2, p. 46-55. 2011. Disponível em:< <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/viewFile/10435/7365>>. Acesso em: 23 maio. 2013.
- NICOLOSO, F. T. et al. Exigências nutricionais da grápia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride) em solo podzólico vermelho amarelo. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 225-231, jun. 1999.
- NASCIMENTO, P. K. V. do. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.
- NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de métodos de escarificação na superação da dormência de sementes e de substratos na germinação e no desenvolvimento de grápia (*Apuleia leiocarpa*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 419-424, 1997.
- NICOLOSO, F. T. et al. Calagem e adubação NPKS: (I) Efeito no crescimento de mudas de grápia cultivadas em horizontes A e B de um Argissolo Vermelho distrófico arênico. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1596-1603, set. 2008.
- ROSA, F. C da. et al. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1021-1026, maio/jun. 2012.
- ROSSI, E; SARTORETTO, L. M. Propagação *in vitro* da farinha-seca. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 00-00, jan./mar. 2013.
- SARTORETTO, Laudete Maria; BOBROWSKI, V.L.; AUGUSTIN, E; PETERS, J.A. Influência do estado físico do meio de indução de calos e de diferentes meios de regeneração na formação de brotos de

aspargo. **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v. 2, n. 1, p. 5-11, 1999.

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

STEIN, V. C. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro (*Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 723-725, jul. 2007.

XAVIER, A. et al. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, Aluízio. **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: UFV Fundação Authur Bernardes, 2007. p. 55 – 74.

ZANOTTI, R. F. et al. Germinação e indução da calogênese *in vitro* de copaíba. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 986-991. 2012