

ESTABELECIDAMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.¹

IN VITRO ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

Andressa Vasconcelos Flôres² Lia Rejane Silveira Reiniger³ Aline Ritter Curti⁴
Ana Catarina Monteiro Carvalho Mori da Cunha⁵ Diego Pascoal Golle⁶ Josiana Scherer Bassan⁷

RESUMO

O açoita-cavalo, *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., pertencente à família Malvaceae, é uma espécie florestal que sofreu grande ação antrópica nas últimas décadas. Esse fato contribuiu muito para a redução das populações naturais e, conseqüentemente, de sua variabilidade genética, o que justifica a realização de estudos relacionados à propagação da espécie. Como forma de propagação vegetativa, a micropropagação torna-se uma opção para a regeneração de plantas que apresentam dificuldade de reprodução natural, além de ser uma estratégia para a conservação das espécies. O trabalho teve como objetivos determinar o tipo de explante e o meio de cultivo mais eficientes para o estabelecimento *in vitro*, além de verificar a influência de diferentes concentrações da citocinina BAP na multiplicação de segmentos nodais de açoita-cavalo. As sementes utilizadas foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO-Florestas em Santa Maria, RS e as plântulas obtidas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Na seleção de explantes e meio de cultivo, foram testados segmentos apicais caulinares e segmentos nodais cultivados nos meios nutritivos MS e WPM. Diferentes concentrações de BAP (0, 5, 10 e 15 mg L⁻¹) foram avaliadas na multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo. No estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo podem-se empregar tanto segmentos apicais caulinares como segmentos nodais e ambos os meios de cultivo. Visando a maximizar o cultivo de açoita-cavalo, deve-se utilizar o meio de cultivo WPM, pelo custo reduzido. Na multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo não deve ser adicionada a citocinina BAP, pois na ausência desse regulador se observa melhor resposta dos explantes para a maioria das características avaliadas, além de reduzir os custos no cultivo *in vitro* da espécie.

Palavras-chave: açoita-cavalo; cultura de tecidos; meios de cultivo; regulador de crescimento.

ABSTRACT

Luehea divaricata Mart. & Zucc. of the Malvaceae family, is a forest tree species that has suffered great anthropic disturbance during the last decades. This fact has contributed to the reduction of natural populations and, consequently, of its genetic variability. This justifies studies related to the propagation of the species. As a means of vegetative propagation, micropropagation is an alternative for the regeneration of plants with difficult natural regeneration and a strategy for species conservation. The objectives of this study were to

1. Parte da dissertação da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.
2. Engenheira Florestal, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Departamento de Ciência Florestal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa (MG). andressafloressm@yahoo.com.br
3. Engenheira Agrônoma, Dr^a., Professora Adjunta do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). liarejanesilveirareiniger@yahoo.com.br
4. Engenheira Florestal, Mestranda do programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Departamento de Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). alinerittercurti@yahoo.com.br
5. Engenheira Florestal, Dr^a., Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, CEP 36180-000, Rio Pomba (MG). catarina_mori@yahoo.com.br
6. Biólogo, Dr., Bolsista Prodóc pelo Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). diegolle@yahoo.com.br
7. Bióloga, M.Sc., Professora do Instituto Federal Farroupilha, Campus Júlio de Castilhos, CEP 98130-000, Júlio de Castilhos (RS). josianabassan@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 28/07/2009 e aceito em 12/04/2010.

determine the most efficient type of explant and growth medium for *in vitro* establishment and verify the influence of different concentrations of BAP cytokinin in the multiplication of nodal segments of *Luehea divaricata*. The seeds used were collected and stored by the Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO/Florestas (Agriculture and Cattle Research State Foundation – FEPAGRO/Forests), in Santa Maria, RS, Brazil, and the seedlings obtained *in vitro* were used as sources of the explants. In the selection of the explants and growth medium, the shoot apical and nodal segments grown in the MS and WPM nutritive media were tested. Different concentrations of BAP (0, 5, 10 and 15 mg L⁻¹) were evaluated in the *in vitro* multiplication of the species. In the *in vitro* establishment of *Luehea divaricata*, both shoot apical and nodal segments can be used and also both growth media. To maximize the growth of the species, the WPM growth medium should be used due to its reduced cost. In the *in vitro* multiplication of the species, cytokinin BAP should not be added because, besides reducing the costs in the *in vitro* cultivation of *Luehea divaricata*, the best response for the majority of the characteristics evaluated was observed in the absence of this regulator.

Keywords: forest species; tissue culture; growth media; growth regulator.

INTRODUÇÃO

O açoita-cavalo, *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., pertencente à família Malvaceae, ocorre, naturalmente, no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai, no Uruguai e no Brasil, nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Distrito Federal e Rio Grande do Sul. A espécie é muito utilizada na fabricação de móveis vergados, enquanto que, do ponto de vista ambiental, é uma das árvores de uso mais relevante para o reflorestamento em função da adaptação a encostas íngremes, margens de rios e áreas em que o solo está permanentemente encharcado (CARVALHO, 1994).

O açoita-cavalo é uma espécie florestal que sofreu grande ação antrópica nas últimas décadas. Esse fato contribuiu muito para a redução das populações naturais, e conseqüentemente, de sua variabilidade genética, o que justifica a realização de estudos relacionados à propagação da espécie.

Essa espécie apresenta germinação lenta e irregular, variando entre 20 e 75%. Há poucas informações sobre a viabilidade das sementes, sendo que após 60 dias da colheita é observada uma redução de 50% na germinação comparada àquela apresentada imediatamente após a coleta (CARVALHO, 1994). Isso prejudica a frequência de ocorrência de açoita-cavalo em florestas naturais.

A propagação vegetativa *in vitro* ou clonagem *in vitro*, também denominada micropropagação, é a técnica de cultura de tecidos de maior impacto e tem mostrado enorme importância prática e potencial nas áreas agrícola, florestal e hortícola (GRATTAPAGLIA e MACHADO,

1998; BORGATTO e HAYASHI, 2002). A técnica viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos tomando por base células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta (SOUZA e JUNGHANS, 2006), que são cultivados em meio nutritivo, sob condições ambientais controladas, por períodos indefinidos, até a formação da nova planta para posterior aclimatização.

Explante é o órgão ou parte do tecido da planta, que será utilizado para iniciar um cultivo *in vitro* (PUGA et al, 1991). Diversas partes da planta podem ser utilizadas para iniciar a propagação *in vitro*, sendo que a escolha do explante apropriado constitui o primeiro passo para o estabelecimento dos cultivos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Nesse sentido, o uso de segmentos apicais caulinares e segmentos nodais é bastante comum nos processos de propagação *in vitro*, pela facilidade de obtenção, pelo número inicial de explantes isolados da planta-mãe, pela viabilidade *in vitro* e pelo crescimento rápido. De forma geral, as gemas apicais têm demonstrado maior capacidade de crescimento em relação às gemas axilares, que estão sob efeito da dominância apical. Esse evento é comum em plantas herbáceas ornamentais e olerícolas, o contrário, em geral, vale para plantas arbóreas (TERMIGNONI, 2005).

Um fator a ser levado em consideração na propagação *in vitro* é a idade dos explantes, sendo que, para espécies lenhosas, são indicados materiais mais jovens, pois uma série de alterações na capacidade morfogênica dos tecidos pode ocorrer com a passagem do estado juvenil para o adulto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os meios de cultivo possuem grande quantidade de macro e micronutrientes em diferentes proporções, responsáveis pelo crescimento da planta como um todo, carboidratos como fonte de carbono (sacarose, glucose, maltose), vitaminas (tiamina, piridoxina e ácido ascórbico), além de outros nutrientes como inositol e sorbitol (DAMIÃO FILHO, 1995; HU e FERREIRA, 1998). Segundo Caldas et al. (1998), além dos meios fornecerem substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Embora não exista uma formulação padrão, o meio Murashige e Skoog - MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), desenvolvido para a cultura de células de *Nicotiana tabacum*, apresenta resultados satisfatórios para diversas espécies em sua formulação original ou em diluições e modificações. Entretanto, em espécies lenhosas, o meio MS não tem se mostrado satisfatório em alguns casos, observando-se que composições mais diluídas em macronutrientes proporcionaram melhor desempenho. Formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas como, por exemplo, o meio 'Woody Plant Medium' – WPM (LLOYD e McCOWN, 1981), têm sido descritas e utilizadas como opção ao meio MS (MELO et al., 1999).

Dentre os pontos mais importantes na multiplicação *in vitro* destacam-se aqueles referentes às concentrações de citocininas e aos meios de cultivo a serem utilizados (CHAVES et al., 2005). As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e na morfogênese em cultura de tecidos, estimulando a divisão celular bem como a indução e a proliferação de brotações adventícias (FLORES et al., 1998). A adição de reguladores de crescimento na cultura de tecidos tem o objetivo principal de suprir as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz. Das citocininas comercialmente disponíveis, 6-benzilaminopurina (BAP) vem sendo mais empregada e, em geral, apresenta os melhores resultados (BORGATTO e HAYASHI, 2002). As concentrações dessa citocinina podem variar de acordo com a espécie, sendo que Torres et al. (2001) recomendam a utilização de concentrações entre 0,03 a 30 mg L⁻¹.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram determinar o tipo de explante e o meio de cultivo mais responsivos para o estabelecimento *in*

in vitro de açoita-cavalo, além de verificar a influência da citocinina BAP na multiplicação de segmentos nodais visando a contribuir para trabalhos futuros envolvendo a micropropagação dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes utilizados nos ensaios, realizados em 2006, foram oriundos da germinação de sementes de *Luehea divaricata* coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO-Florestas, em Santa Maria, RS, em 2004 (primeiro experimento) e 2005 (segundo experimento) respectivamente.

Para a obtenção dos explantes, as sementes foram desinfestadas superficialmente pela imersão em etanol a 70% por 30 segundos e, após, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos. Na sequência, sofreram tríplice enxágue em água destilada e autoclavada e foram, imediatamente, inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio ágar-água a 7% (p/v) em câmara de fluxo laminar. Após, foram transferidas para sala de cultivo (25 ± 2°C, 16 horas de luz e 20 μmol m⁻² s⁻¹) onde permaneceram por 45 dias, quando, então, os explantes foram excisados e novamente inoculados sob condições assépticas.

Seleção de explante e de meio de cultivo para a propagação *in vitro*

Neste ensaio, empregou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (2x2), em que os níveis do fator "A" corresponderam aos meios de cultivo – MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981) – e os níveis do fator "B", aos tipos de explantes (segmentos apicais caulinares e segmentos nodais). Os tratamentos apresentaram cinco repetições, sendo cada uma composta por um frasco de vidro contendo um explante. Os meios de cultura foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e o pH, ajustado para 5,7. Posteriormente, alíquotas de 30 mL do meio de cultivo foram transferidas para frascos de vidro com capacidade para 150 mL, os quais foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão.

Após a inoculação dos explantes nos meios de cultura, os frascos foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹ obtida partindo de

lâmpadas fluorescentes brancas frias, do tipo luz do dia, e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

As avaliações foram efetuadas aos 60 dias de cultivo, observando-se: sobrevivência, estabelecimento *in vitro*, número de nós e enraizamento, todas expressas em porcentagem. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde dos explantes e o estabelecimento, determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares e/ou radiculares.

Os dados obtidos foram, inicialmente, submetidos aos testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett, sendo, após, realizadas análises de variância. As médias foram comparadas pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico 'Statistica' versão 7.0 (STATSOFT, 2006).

Influência da citocinina BAP no desenvolvimento *in vitro*

Neste ensaio, foram testadas quatro concentrações de BAP: 0, 5, 10 e 15 mg L⁻¹ associadas ao meio de cultivo WPM, no qual foram adicionados 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e o pH, ajustado para 5,7. Posteriormente, alíquotas de 30 mL do meio de cultivo foram transferidas para frascos de vidro com capacidade para 150 mL, os quais foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. A unidade experimental foi composta por quatro frascos de vidro, contendo um explante cada. Foram utilizados como explantes

segmentos nodais com, aproximadamente, 1 cm de comprimento.

As variáveis foram avaliadas aos 35 dias de cultivo, observando-se: sobrevivência (%), estabelecimento *in vitro* (%), número de nós, número de folhas, enraizamento (%) e número total de brotações. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde dos explantes e o estabelecimento, determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares e/ou radiculares.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett, e, quando necessário, foram transformados (raiz quadrada $(x+0,5)$). Foram realizadas análises de variância e de regressão polinomial. Utilizou-se o programa estatístico 'Statistica' versão 7.0 (STATSOFT, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de explante e de meio de cultivo para a propagação *in vitro*

Não houve interação entre os fatores ou efeitos significativos dos fatores principais para a maioria das variáveis analisadas, exceto para número de nós e enraizamento, em que foi observada a influência do meio de cultivo (Tabela 1). O meio WPM proporcionou desempenho superior em relação ao MS (4,94 x 3,40, respectivamente, para número de nós; e 66,80 x 30,00%, respectivamente, para enraizamento) (Tabela 2). A concentração de sais relativamente menor do meio WPM comparada à do MS deve ser a razão da maior formação de raízes em açoita-cavalo.

TABELA 1: Análise de variância para sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de nós e enraizamento (%) em segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.). Santa Maria, RS, 2007.

TABLE 1: Variance analysis for survival (%), establishment (%), number of nodes and rooting (%) in shoot apical and nodal segments of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. Santa Maria, RS, 2007.

Causa da variação	GL	Quadrado Médio			
		Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Nº de nós	Enraizamento (%)
Meio de cultivo	1	125,00	781,25	9,59*	5313,80*
Tipo de explante	1	125,00	1531,25	1,28	1248,20
Meio de cultivo	1	0,00	414,05	0,12	88,20
*Tipo de explantes	16	109,38	464,53	1,56	487,38
Média geral		95,00	80,45	3,92	56,00
CV(%)		11,01	26,79	31,91	39,21

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 2: Médias de número de nós e enraizamento (%) de explantes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), em diferentes meios de cultivo. Santa Maria, RS, 2007.

TABLE 2: Average number of nodes and rooting (%) of explants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., in different culture media. Santa Maria, RS, 2007.

Meio de cultivo	Variáveis	
	Número de nós	Enraizamento (%)
WPM	4,94a	66,80a
MS	3,40b	30,00b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de probabilidade.

De maneira semelhante, em *Vaccinium ashei* Reade cv. Flórida, Erig e Schuch (2005) observaram que o meio WPM favoreceu o estabelecimento *in vitro*, porém foram adicionados 24,6 μ M de Isopenteniladenina (2-iP), uma citocinina. No presente trabalho, ao contrário, foi obtido um elevado enraizamento (66,80%) na ausência de reguladores de crescimento. Esse fato também foi relatado em *Annona glabra* (DECCETTI, 2000), em que foi verificado um alto percentual de rizogênese e um maior número de raízes em meio desprovido de reguladores de crescimento, e em brotações de *Ficus carica* L. (BRUM, 2001), em que não foi necessário utilizar fitoreguladores para promover a formação de raízes. No entanto, para outras espécies, altas taxas de enraizamento somente são alcançadas na presença de fitoreguladores, em consequência de características intrínsecas, o que, provavelmente, se deve ao balanço hormonal endógeno presente no tecido vegetal (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Exemplo disso, foi registrado em *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud., em que foi obtido 73% de enraizamento com o uso de meio WPM suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de ácido 3-Indolbutírico (AIB) na presença de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (MANTOVANI et al., 2001).

As médias observadas de sobrevivência (95%) e de estabelecimento *in vitro* (80,45%) foram elevadas (Tabela 1). Esses resultados demonstram que o estabelecimento *in vitro* em açoita-cavalo pode ser efetuado, com sucesso, em ambos os meios testados, independente do tipo de explante empregado. Contudo, há que se considerar que nem todos os explantes sobreviventes se estabeleceram, o que está de acordo com o relatado por Erig e

Schuch (2003), em *Malus domestica* Borkh. cvs. Galaxy, Maxygalá e Mastergala, uma vez que a sobrevivência nem sempre indica a retomada do crescimento e do desenvolvimento. Por outro lado, em *Olea europaea* L. cv. Arbequina, Donini et al. (2008) verificaram que os explantes cultivados em meio WPM apresentaram maiores médias de sobrevivência, estabelecimento e número de brotações. Isso reforça a tese, amplamente aceita, que o meio de cultivo a ser selecionado dependerá da espécie.

Tanto os segmentos apicais caulinares quanto os segmentos nodais de açoita-cavalo demonstraram competência para o estabelecimento das culturas *in vitro*. Na regeneração de plantas de *Maytenus ilicifolia* Mart., também não foram observadas diferenças significativas entre segmentos apicais e nodais (FLORES et al., 1998). Já os segmentos nodais apresentaram eficiência no estabelecimento de diversas espécies lenhosas, tais como *Vaccinium ashei* Reade (ERIG e SCHUCH, 2005), *Coffea arabica* (RIBEIRO et al., 2002), porta-enxertos do gênero *Prunus* (SILVEIRA et al., 2001), *Malus domestica* Borkh. (ERIG et al., 2004), *Cordia trichotoma* (MANTOVANI et al., 2001). Segmentos apicais caulinares, por outro lado, destacaram-se no estabelecimento de *Catharanthus roseus* L. (REIS et al., 2004) e *Pilocarpus microphyllus* Stapf (SABÁ et al., 2002).

Os resultados obtidos demonstram que o estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo pode ser efetuado, com sucesso, em ambos os meios testados empregando-se tanto segmentos apicais caulinares quanto segmentos nodais. Contudo, devem ser considerados os custos de cada meio de cultivo; o meio WPM tem um custo mais baixo quando comparado ao MS, pois sua composição de sais é, relativamente, reduzida. Considerando o exposto, para maximizar o cultivo *in vitro* de açoita-cavalo recomenda-se cultivar segmentos apicais caulinares e/ou segmentos nodais em meio WPM, que, além de ter menor custo, proporcionou altas médias de enraizamento (66,80 %) para a espécie.

Influência da citocinina BAP no desenvolvimento *in vitro* de açoita-cavalo

As diferentes concentrações de BAP influenciaram as características avaliadas, exceto a sobrevivência e o estabelecimento *in vitro*, que apresentaram, ambas, a média geral 80,85%. O estabelecimento é uma fase em que os explantes

ainda estão se adaptando ao cultivo *in vitro* e podem não responder à adição de fitorreguladores de crescimento. Moura et al. (2008) também não observaram efeito significativo das concentrações de BAP na micropropagação de *Piper nigrum*.

Para o número de nós e o número de folhas, houve ajuste de modelo quadrático para as concentrações de BAP (Figuras 1 e 2). As concentrações mais elevadas geraram menores números de nós e de folhas nos explantes de açoitacavalo, indicando efeito inibitório do fitorregulador. Comportamento semelhante ao observado neste estudo foi obtido por Moura et al. (2008) com *Piper nigrum*. Por outro lado, Villa et al. (2005), trabalhando com *Rubus* sp cv. Ébano observou estímulo na produção de folhas à medida que a concentração de BAP aumentou.

Para o número total de brotações, o ajuste da regressão foi um polinômio de 3º grau para as concentrações de BAP (Figura 3) e a ausência do fitorregulador proporcionou a obtenção de um maior número de brotações por explante (1,6). Apesar de ter sido ajustada uma equação cúbica, observa-se que a ausência da citocinina implica em maior produção de brotações, o que é um bom indicativo para a micropropagação de açoitacavalo, tendo em vista a redução dos custos finais de produção de mudas micropropagadas da espécie.

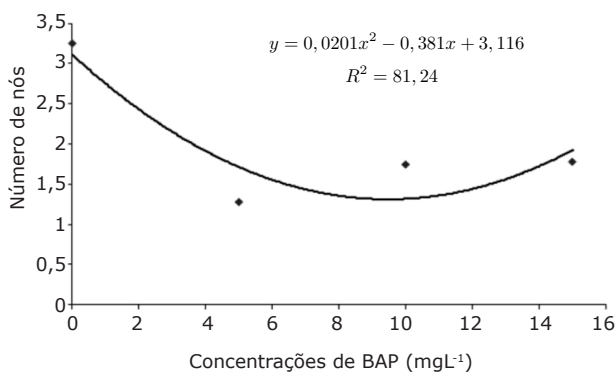


FIGURA 1: Número de nós produzidos em culturas *in vitro* de açoitacavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), em função das diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultivo WPM. Santa Maria, RS, 2007.

FIGURE 1: Number of nodes produced in the *in vitro* culture of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., in function of different concentrations of BAP added to the WPM culture medium. Santa Maria, RS, 2007.

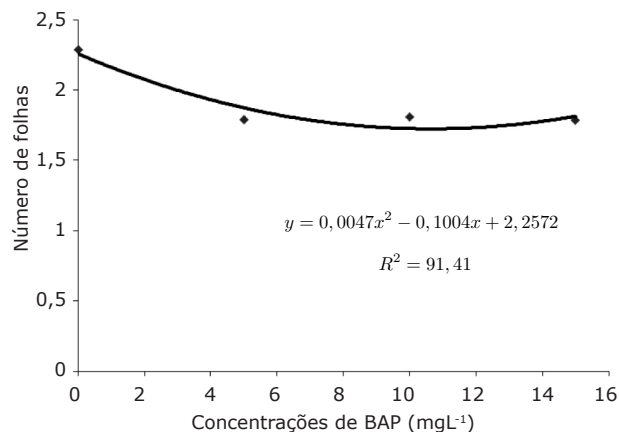


FIGURA 2: Número de folhas produzidas em culturas *in vitro* de açoitacavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), em função das diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultivo WPM. Santa Maria, RS, 2007.

FIGURE 2: Number of leaves produced in the *in vitro* culture of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., in function of different concentrations of BAP added to the WPM culture medium. Santa Maria, RS, 2007.

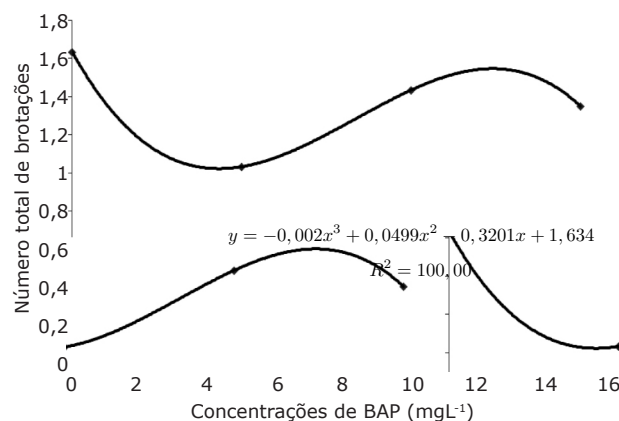


FIGURA 3: Número total de brotações produzidas em culturas *in vitro* de açoitacavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), em função das diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultivo WPM. Santa Maria, RS, 2007.

FIGURE 3: Total number of shoots produced in the *in vitro* culture of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., in function of different concentrations of BAP added to the WPM culture medium. Santa Maria, RS, 2007.

Os resultados encontrados para número total de brotações (Figura 3) podem ser atribuídos à ocorrência de possíveis desordens fisiológicas nos explantes, provavelmente provocadas pelas elevadas concentrações de BAP testadas. Segundo Sabá et al. (2002), a maximização da proliferação de brotações pode ser atingida com o emprego de dois ou mais reguladores de crescimento, sendo que, possivelmente, a indução de brotações em açoita-cavalo necessite da combinação de citocininas, auxinas e/ou giberelinas, ou ainda, de concentrações de citocinina inferiores às utilizadas no presente estudo.

Em estudos de micropropagação *in vitro* com *Cordia trichotoma*, Mantovani et al. (2001) verificaram que BAP a 0,1 mg L⁻¹ associado à giberelina (GA₃), na mesma concentração, promoveu uma maior multiplicação, produzindo 6,85 brotações por explante. Em *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Decne. & Planch., Mantovani et al. (1999) observaram que o aumento na concentração de BAP proporcionou um aumento nas respostas de indução de brotações até a concentração de 1,0 mg L⁻¹, ou seja, utilizando concentrações inferiores às utilizadas no presente trabalho.

Para o enraizamento *in vitro* foi obtido um ajuste linear decrescente para as concentrações de BAP (Figura 4), sendo observada uma inibição completa da rizogênese na presença

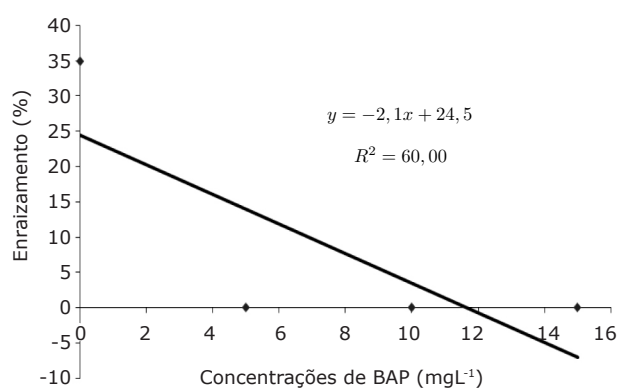


FIGURA 4: Enraizamento de culturas *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), em função das diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultivo WPM. Santa Maria, RS, 2007.

FIGURE 4: Rooting of the *in vitro* cultivation of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., in function of different concentrations of BAP added to the WPM medium growth. Santa Maria, RS, 2007.

desse fitorregulador. Isso pode ser explicado pelo fato desse regulador de crescimento promover maior crescimento da parte aérea em detrimento à formação de raízes (TORRES et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados por Flores e Nicoloso (2007), com BAP influenciando, negativamente, a formação de raízes, e com 10 μM dessa citocinina inibindo, por completo, esse processo.

CONCLUSÕES

Segmentos apicais caulinares e segmentos nodais, cultivados em meio de cultivo MS ou WPM, são eficientes no estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo.

Recomenda-se efetuar o estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo em WPM em função do menor custo desse meio de cultivo.

O meio de cultivo WPM é mais eficiente no enraizamento, independente do tipo de explante.

A multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo é eficiente em meio de cultura livre da utilização da citocinina BAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A. de; KLUGE, R.A. (org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-254.
- BRUM, G. R. **Micropropagação de figueira (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos'**. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitoquímica)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998. v. 1. p. 87-132.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Colombo: EMBRAPA – CNPF, 1994. 640 p.
- CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, nov./dez., 2005.
- DAMIÃO FILHO, C. F. **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação**. Jaboticabal: FUNEP,

1995. 25 p.
- DEC CETTI, S. F. C. **Propagação in vitro de Annona glabra L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- DONINI, L. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. “Arbequina” para início da micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1769-1772, nov./dez.2008.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxy gala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da. Multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Galaxy: meio de cultura e agentes solidificantes alternativos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 297-302, 2004.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de sementes nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T. Efeito do ANA e BAP na calogênese de organogênese de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 92-96, 2007.
- FLORES, R. et al. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 201-205, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. p. 183-260.
- HU, C. Y., FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. p. 533-568.
- LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.
- MANTOVANI, N. C. et al. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et. Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louropardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.
- MELO, N. F. de et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.
- MOURA, E. F.; MENEZES, I. C.; LEMOS, O. F. de Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta do reino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 72-76, 2008.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.1, p. 437-496, 1962.
- PUGA, N. T.; NASS, L. L.; AZEVEDO, J. L. **Glossário de biotecnologia vegetal**. São Paulo: Manole, 1991. 87 p.
- REIS, C. V. dos et al. Efeitos do tipo de explante e diferentes balanços de auxina e citocinina na regeneração *in vitro* de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Agronomia**, Seropédica, v. 38, n. 1, p. 93-97, 2004.
- RIBEIRO, L. S. et al. Fontes de nitrogênio na micropropagação de *Coffea arabica*. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 3, n. 1-2, p. 107-112, 2002.
- SABÁ, R. T. et al. Micropropagação de jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2002.
- SILVEIRA, C. A. P. et al. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 488-492, 2001.
- SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.
- STATSOFT. **Statistica for Windows** (Computer Program Manual). Tulsa: Statsoft, 2006.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182 p.
- TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/EMBRAPA Hortaliças, 2001. p. 20. (Circular técnica Embrapa Hortaliças, n.24).
- VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta ‘ébano’ em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.