

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UFVJM**

LUCIANA COELHO DE MOURA

**MICROPROPAGAÇÃO DE SUCUPIRA-PRETA (*Bowdichia
virgilioides* Kunth.)**

DIAMANTINA - MG

2012

LUCIANA COELHO DE MOURA

**MICROPROPAGAÇÃO DE SUCUPIRA-PRETA (*Bowdichia
virgilioides* Kunth.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, nível de mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miranda Titon

DIAMANTINA

2012

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Viviane Pedrosa
CRB6-2641

M929m 2012 Moura, Luciana Coelho de
Micropropagação de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.)–
Diamantina: UFVJM, 2012.
51f.

Orientadora: Profa. Dra. Miranda Titon

Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências
Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Cultura de tecidos 2. Propagação de plantas 3. Espécie nativa I. Título.

CDD 634.04

**MICROPROPAGAÇÃO SUCUPIRA-PRETA (*Bowdichia virgilioides*
Kunth.)**

Luciana Coelho de Moura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, nível de Mestrado, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

APROVA DA EM ___/___/___

Prof^a. Bruna Anair Souto Dias - UFLA

Prof. José Sebastião Cunha Fernandes - UFVJM

Prof. Reynaldo Campos Santana - UFVJM

Prof^a. Miranda Titon - UFVJM

DIAMANTINA

2012

*“O real sentido da vida é plantar árvores, debaixo de cujas sombras talvez
você nunca se sentará.”*

Nelson Henderson

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e força para vencer mais essa etapa de minha vida.

Aos meus pais Cláudia e Jovani, eternos apoiadores das minhas decisões, por não terem medido esforços para a minha formação.

À minha avó Corália e às minhas irmãs Patrícia e Cristiane pelo sempre valioso apoio.

Ao Vinícius, pelo amor, amizade e companheirismo.

Aos amigos do CTPM, em especial Marcela e Cris, e aos amigos distantes, Fefê e Geânia pela verdadeira amizade e por se manterem presentes em minha vida.

Aos companheiros do mestrado, pela convivência, em especial o “Clube da Luluzinha”, que mesmo em tão pouco tempo se tornaram verdadeiras amigas, e ao Bruno, por estar sempre disponível.

À professora Miranda, pela orientação durante tantos anos e pela harmoniosa convivência.

Aos professores, pelos conhecimentos adquiridos e pela agradável convivência.

À equipe do laboratório, Natane, Tamires, Vinícius, Auwdréia e Breno, e ao pessoal do viveiro, Fábio, Evaldo e Xavier pelo importante auxílio na condução da pesquisa.

Aos professores Reynaldo e Cunha e aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

À UFVJM pela oportunidade de fazer parte da sua história e contribuir de alguma forma para a sua melhoria.

Ao PROCAD/CAPES, FAPEMIG, IEF, SECTES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 1	16
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATAÇÃO DE SUCUPIRA-PRETA (<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth.)	16
1. Introdução	16
2. Material e Métodos	18
2.1. Material Vegetal	18
2.2. Experimento 1 (sementes não escarificadas)	18
2.3. Experimento 2 (sementes escarificadas)	20
2.4. Transplântio e Aclimação	20
3. Resultados	21
3.1. Experimento 1 (sementes não escarificadas)	21
3.2. Experimento 2 (sementes escarificadas)	23
4. Discussão	25
5. Conclusões	27
6. Referências Bibliográficas	28
CAPÍTULO 2	31
MICROPROPAGAÇÃO DE SUCUPIRA-PRETA (<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth.)	31
1. Introdução	32
2. Material e Métodos	33
2.1. Material Vegetal	33
2.2. Estabelecimento das culturas assépticas	33
2.3. Multiplicação de gemas axilares	34
2.4. Alongamento de gemas axilares	35
2.5. Enraizamento de brotações	35
2.6. Aclimação de plantas propagadas <i>in vitro</i>	36
3. Resultados	37
3.1. Multiplicação de gemas axilares	37

3.2. Alongamento de gemas axilares	39
3.3. Enraizamento de brotações	40
3.4. Aclimação de plantas propagadas <i>in vitro</i>	42
4. Discussão	44
5. Conclusões	47
6. Referências Bibliográficas	48
<u>3. CONCLUSÕES GERAIS</u>	<u>51</u>
ANEXOS	52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Composição dos meios de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd e McCown, 1981) usados na germinação *in vitro* de sucupira-preta 18

Tabela 2: Resumo da análise de variância para os dados de percentual de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) (A); percentual de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes escarificadas de sucupira-preta em função dos diferentes meios de cultura (B) 23

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Resumo da análise de variância referente ao número médio de gemas por explante de sucupira-preta no cultivo inicial e nos subcultivos 1, 2 e 3 em função do tipo de explante e das concentrações de BAP 37

Tabela 2: Número médio de gemas axilares por explante de sucupira-preta em função da interação explante x BAP, dos tipos de explante e das concentrações de BAP para o cultivo inicial e para os subcultivos 1, 2 e 3 37

Tabela 3: Resumo da análise de variância referente ao percentual de enraizamento e de calosidade aos 60 e aos 120 dias de brotações de sucupira-preta em função das concentrações de AIB 39

Tabela 4: Resumo da análise de variância (A) e médias (B) do percentual de enraizamento de brotações de sucupira-preta, aos 120 dias após a repicagem, em função das concentrações de AIB 40

Tabela 5: Resumo da análise de variância referente ao percentual de enraizamento, de calosidade, de clorose foliar e de queda de folhas aos 120 dias, de brotações de sucupira-preta, em função dos aditivos e das concentrações de ANA 40

Tabela 6: Percentual de calosidade em função dos aditivos, e percentual de clorose foliar em função da interação aditivo x ANA, de brotações de sucupira-preta aos 120 dias 41

Tabela 7: Resumo da análise de variância referente ao número de raízes e à altura aos 60 dias de pré-aclimação; e referente à altura durante a aclimação em casa de vegetação aos 30 dias de aclimação em casa de vegetação de mudas de sucupira-preta em função dos tratamentos 42

Tabela 8: Número de raízes aos 60 dias de pré-aclimação e altura aos 30 dias de aclimação em casa de vegetação função dos tratamentos de plantas de sucupira-preta, em função dos tratamentos 42

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Curva do percentual de germinação de sementes não escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos durante 30 dias. 21
- Figura 2:** Percentual de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes não escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos. As barras indicam o desvio padrão. 21
- Figura 3:** Percentual de sobrevivência (A) e crescimento em altura (B) de plantas de sucupira-preta, germinadas *in vitro* a partir de sementes não escarificadas, em função dos tratamentos, aos 30, 60, 90 e 120 dias de aclimação. 22
- Figura 4:** Curva do percentual de germinação de sementes escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos durante 30 dias. 23
- Figura 5:** Percentual de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos. As barras indicam o desvio padrão. 23
- Figura 6:** Percentual de sobrevivência (A) e crescimento em altura (B) de plantas de sucupira-preta, germinadas *in vitro* a partir de sementes escarificadas, em função dos tratamentos, aos 30, 60, 90 e 120 dias de aclimação. 24

CAPÍTULO 2

- Figura 1:** Aspecto visual da multiplicação de explantes de sucupira-preta sendo: A - segmento cotiledonar e B- segmento nodal, ambos do cultivo inicial, C - os 4 tratamentos do subcultivo 2 (segmentos cotiledonar e nodal combinados com as concentrações de 0,1 e 0,3 mg.L⁻¹ de BAP). 38
- Figura 2:** Altura média de explantes de sucupira-preta em função das concentrações de ANA e BAP aos 40 dias de alongamento. As barras indicam o desvio padrão. 38
- Figura 3:** Percentual de calosidade aos 60 dias (A) e percentual de enraizamento aos 120 dias (B) de brotações de sucupira-preta em função das concentrações de AIB. As barras indicam o desvio padrão. 39
- Figura 4:** Classificação do aspecto visual da parte aérea de mudas de sucupira-preta aos 60 dias, em função dos tratamentos. 1) aspecto ruim, 2) aspecto médio, 3) aspecto bom e 4) aspecto ótimo. 43

RESUMO

MOURA, L. C. Micropropagação de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.) 2012. 51p. (Dissertação - Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a germinação *in vitro* de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) e adaptar um procedimento básico de micropropagação para essa mesma espécie. Para a germinação *in vitro*, sementes escarificadas e não escarificadas foram inoculadas em diferentes concentrações e formulações de meios de cultura suplementados com aditivos (PVP e carvão ativado). Posteriormente, as plantas foram transferidas para tubetes e aclimatadas em casa de vegetação. Para a micropropagação, explantes foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com concentrações de BAP, constituindo a fase de multiplicação. No alongamento, os tratamentos foram constituídos de combinações de ANA e BAP adicionadas ao meio de cultura. Para a fase o enraizamento, brotações foram inoculadas em meio contendo concentrações de AIB ou combinações dos aditivos (PVP e carvão ativado) com concentrações de ANA. Na aclimação, as plantas foram transplantadas para substrato e cobertas com saco de polietileno que foram, posteriormente, retirados, perfurados ou não-retirados, e mantidas em ambiente de laboratório, constituindo os tratamentos da pré-aclimação. A aclimação em casa de vegetação foi realizada após o período de pré-aclimação. A germinação *in vitro* de sementes escarificadas de sucupira-preta foi alcançada utilizando-se os meios de cultura MS e WPM a 50% e ocorreu independentemente do tipo de aditivo utilizado. A aclimação de plantas germinadas *in vitro* ocorreu independentemente do histórico de aditivos ou meios de cultura utilizados. Durante a micropropagação da espécie, a multiplicação foi alcançada utilizando-se segmentos cotiledonares e a concentração de 0,3 mg.L⁻¹ de BAP adicionada ao meio. A combinação de 0,3 mg.L⁻¹ de ANA com 0,03 mg.L⁻¹ de BAP promoveu o alongamento. A indução de raízes ocorre na ausência de AIB ou em resposta às concentrações de 0,5 e 2,5 mg.L⁻¹. O carvão ativado adicionado ao meio de cultura de enraizamento melhorou a qualidade das brotações. A aclimação foi alcançada utilizando-se uma cobertura plástica entorno da planta.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, propagação de plantas, espécie nativa.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *in vitro* germination of sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) and develop a basic micropropagation procedure for that species. For *in vitro* germination seeds scarified or not scarified were inoculated at different concentrations and types of culture medium supplemented with two types of additives (PVP or activated charcoal). Subsequently, plants were transferred to tubes and acclimatized in the greenhouse. For micropropagation, explants were inoculated in culture medium WPM supplemented with BAP being the multiplication phase. For elongation, the treatments were combinations of BAP with ANA that were added to the medium of culture. For rooting, shoots were inoculated in culture medium containing concentrations of AIB or combinations of additives (PVP or activated charcoal) with concentrations ANA. For the period of acclimatization, the plants were transplanted and covered with polythene bags which were subsequently removed or not, and kept in closed environment, providing treatments for pre-acclimatization, and later, in a greenhouse constituting acclimatization. The culture media MS and WPM 50% promoted *in vitro* germination of scarified seeds. The germination of the species occurred regardless of the type of additive used. The acclimatization of plants germinated *in vitro* occurred regardless of history or culture media additives used. During the micropropagation, explants obtained from cotyledon segments and the concentration of 0,3 mg L⁻¹ BAP added to culture medium promoted multiplication. The combination of 0,3 mg.L⁻¹ ANA with 0,03 mg.L⁻¹ BAP promoted elongation. The induction of roots occurred in absence of AIB or in response to concentrations of 0,5 and 2,5 mg L⁻¹. Charcoal activated added to the culture medium increased rooting quality of the shoots. The plastic cover around the plant promoted acclimatization.

Keywords: Tissue culture, plant propagation, native species.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é considerado um recurso natural renovável que, se for manejado adequadamente, pode gerar ocupação permanente para um grande número de pessoas, fornecer matéria-prima para a indústria, além de conservar a biodiversidade, garantindo a conservação da fauna e flora nativas, bem como a manutenção da qualidade da água (Santos et al., 2005).

No Brasil, muitos são os produtos explorados de forma extrativista como resinas, ceras, fibras, óleos, corantes, frutos, flores e outros materiais artesanais, madeira, caça, pesca, plantas medicinais, entre outros. Para alguns destes produtos, evidencia-se o esgotamento das reservas existentes.

Entre as espécies florestais bastante conhecidas e exploradas do cerrado brasileiro, está a sucupira- preta. *Bowdichia virgilioides* é uma espécie arbórea considerada pioneira a secundária tardia, apresenta tolerância a solos secos, de fertilidade baixa e com textura arenosa, além de germinar mesmo sob condições de pouca disponibilidade de água (Carvalho, 2002), e por isso, indicada para programas de reflorestamento e na recuperação de áreas degradadas de preservação permanente. Sua madeira, por ser de alta densidade e longa durabilidade natural, é empregada na construção civil e na fabricação de móveis (Lorenzi, 2002).

A propagação de espécies nativas é realizada, na maioria das vezes, a partir de sementes, e pouco se sabe sobre a propagação vegetativa dessas espécies. A produção de mudas via seminal pode ser limitada devido à ocorrência de dormência tegumentar, como é o caso da sucupira-preta, dificultando a germinação das sementes, que ocorre de forma lenta e em baixa porcentagem. A micropropagação representa uma alternativa para produção de mudas de espécies florestais, sendo bastante difundida para diversas espécies.

A micropropagação pode ser enquadrada como uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*. Na área florestal, ela se encontra embutida nos programas de pesquisa, onde tem sido utilizada na preservação de germoplasma, produção de plantas livres de doenças, multiplicação rápida de plantas em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, rejuvenescimento clonal e produção de mudas de clones selecionados (Xavier et al., 2009).

Comparada com outras técnicas, tem sido considerada aquela que mais se difundiu nos últimos anos, com aplicações comprovadas em diversas espécies de plantas, como a

Aspidosperma polyneuron (Ribas et al., 2005), *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Cordeiro et al., 2004), *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (Andrade et al., 2000), *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (Mantovani et al., 2001). No entanto, informações sobre a micropropagação de sucupira-preta são escassas na literatura. Nesse sentido, é importante o desenvolvimento de procedimentos básicos que permitam o melhor aproveitamento do material genético dessa espécie.

Os objetivos desse trabalho foram verificar e avaliar os efeitos dos meios de cultura MS e WPM, combinados com dois aditivos, PVP e carvão ativado, na germinação *in vitro* de sementes escarificadas e não escarificadas de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*), bem como a aclimação das plantas germinadas; e adaptar um procedimento básico de micropropagação via gemas axilares para essa mesma espécie.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p.174-180, 2000.

CARVALHO, P. E. R.. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v.2, 2002, 627 p..

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

LORENZI, H.. **Árvores Brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1, 4 ed.. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 384 p..

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

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

SANTOS, B. R., et al. **Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro**, 2001. Lavras: UFLA, 2005, 32 p.. (boletim agropecuário, 64).

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L..**Silvicultura Clonal: princípios e Técnicas**. Ed. UFV, Viçosa – MG, 2009, 272p.

CAPÍTULO 1

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE SUCUPIRA-PRETA (*Bowdichia virgilioides* Kunth.)

Resumo - Este trabalho teve como objetivos avaliar a germinação *in vitro* e a aclimação de plantas de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*). Sementes escarificadas e não escarificadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS ou WPM, com 100 ou 50% dos sais e vitaminas; suplementados com dois tipos de aditivos, carvão ativado e PVP, e mantidas em sala de cultura. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (2 aditivos e 4 formulações de meio de cultura) com 4 repetições e 6 sementes por repetição. Aos 30 dias obteve-se o percentual de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG). As plantas foram transferidas para tubetes, contendo substrato e aclimatadas em casa de vegetação, onde permaneceram durante 60 dias, sendo transferidas para casa de sombra, onde permaneceram por outros 60 dias. Aos 30, 60, 90 e 120 dias, avaliou-se o percentual de sobrevivência e a altura das mudas aclimatadas. A germinação *in vitro* de sementes escarificadas apresentou os maiores percentuais utilizando-se os meios de cultura MS e WPM reduzidos à metade da concentração dos sais e vitaminas. A germinação ocorreu independentemente do aditivo utilizado tanto para sementes escarificadas como para as não escarificadas. A aclimação das plantas germinadas *in vitro* ocorreu independentemente do histórico de aditivos ou meios de cultura utilizados.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, meio de cultura, propagação de plantas.

1. Introdução

Bowdichia virgilioides, conhecida vulgarmente como sucupira-preta, é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae com ampla dispersão pelo Brasil. Pode ser utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas de preservação permanente, e, sua madeira, por ser de alta densidade e longa durabilidade natural, é empregada na construção civil e na fabricação de móveis (Lorenzi, 2002).

A produção de mudas de sucupira-preta é realizada geralmente via seminal e a germinação só ocorre em sementes viáveis, não dormentes e sob condições ambientais favoráveis. Suas sementes possuem impermeabilidade tegumentar à água (Sampaio et al.,

2001) e a escarificação química com H_2SO_4 por 5 minutos é indicada para a superação da dormência (Smirdele; Souza, 2003).

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa que pode ser utilizada para certas espécies que tem a semente como insumo limitante, com dificuldade de germinação e armazenamento, permitindo também a maximização da qualidade e uniformidade dos plantios quando utilizados genótipos selecionados, além da propagação de espécies de interesse econômico de maneira a preservar as florestas naturais (Xavier et al., 2003).

A micropropagação é dividida em cinco etapas, sendo: 0) preparo de plantas matrizes; 1) estabelecimento de culturas assépticas; 2) multiplicação; 3) indução, alongamento e enraizamento e 4) aclimatação em condições de casa de vegetação (Debergh; Maene, 1981). Uma das formas de estabelecimento de cultura assépticas é a germinação *in vitro*.

As atividades de cultivo *in vitro* são realizadas em ambiente asséptico e com temperatura e iluminação controladas, visando a otimização das respostas aos estímulos termo e fotoperiódico, aplicados ao material *in vitro*, entre outros fatores (Teixeira; Torres, 1999). As soluções de sais e açúcares que compõem o meio de cultura possuem como principal função fornecer substâncias essenciais para o crescimento e controlar, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Xavier et al., 2009).

Diversas formulações de meios de cultura têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação-padrão, mas o meio MS (Murashige; Skoog, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies. Para espécies lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em algumas situações e composições mais diluídas em macronutrientes, podem proporcionar melhor desempenho (Nogueira et al., 2004). O meio nutritivo WPM (Lloyd; McCown, 1981), por exemplo, apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de maior quantidade de potássio e um alto nível de íons sulfato, tendo sido amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (Pasqual, 2001).

Aditivos podem ser adicionados ao meio de cultura para diminuir a intoxicação de culturas pelos fenóis oxidados produzidos pelos próprios tecidos vegetais, como é o caso do PVP (polivinilpirrolidona) e do carvão ativado, que além de função antioxidante, pode estimular o enraizamento, restaurar a capacidade embriogênica em culturas (Caldas et al., 1999) e, em algumas condições, regular o crescimento da planta *in vitro* (Xavier et al., 2009).

A aclimação é o processo que envolve o transplante da planta cultivada *in vitro* para a casa de vegetação (Grattapaglia; Machado, 1999). Esta fase é de grande importância, sendo considerada um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos, por afetar diretamente a sobrevivência e a qualidade final das mudas produzidas (Niciolli, 2006).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos meios de cultura MS e WPM, combinados com dois aditivos, PVP e carvão ativado, na germinação *in vitro* de sementes escarificadas e não escarificadas de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*), bem como a aclimação das plantas germinadas.

2. Material e Métodos

2.1. Material Vegetal

Frutos de sucupira-preta foram coletados em seis matrizes procedentes do Parque Estadual do Rio Preto, localizado no município de São Gonçalo do Rio Preto/MG. Após beneficiadas, as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno e colocadas em câmara fria com temperatura média de 7°C, e umidade relativa média de 30%. Para realização dos experimentos 1 e 2, foram utilizadas sementes 10 e com 12 meses de armazenamento.

Todos os experimentos foram conduzidos no laboratório de Melhoramento Florestal e no viveiro de mudas do Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais - CIPEF da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, localizada em Diamantina – MG, durante o período de outubro de 2010, a junho de 2011.

2.2. Experimento 1 (sementes não escarificadas)

Sementes de sucupira-preta, armazenadas durante 10 meses, foram lavadas previamente com água destilada e, em câmara de fluxo laminar, enxaguadas com água deionizada e autoclavada, imersas em álcool 70% por 1 minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos, sendo adicionado 4 a 5 gotas de Tween 20, para cada 100 mL de solução. As sementes foram novamente enxaguadas com água deionizada e autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura previamente preparado.

Os tratamentos foram o resultado da combinação dos aditivos CA (carvão ativado – 800 mg.L⁻¹) e PVP (polivinilpirrolidona – 1000 mg.L⁻¹) com os meios de cultura MS

(Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd e McCown, 1981) (Tabela 1), contendo 100% ou 50% dos sais e vitaminas, com as seguintes denominações: T1 (CAMS); T2 (CAMS/2); T3 (CAWPM); T4 (CAWPM/2); T5 (PVPMS); T6 (PVPMS/2); T7 (PVPWPM); e T8 (PVPWPM/2). Nos tratamentos T1, T3, T5 e T7 os meios MS e WPM continham 100% dos sais e vitaminas e nos demais tratamentos 50% (MS/2 e WPM/2). Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (2 tipos de aditivos e 4 formulações de meios de cultura) com 4 repetições e 6 sementes por repetição.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) e WPM (Lloyd; McCown, 1981) usados na germinação *in vitro* de sucupira-preta

Composto	Fórmula Química	Concentração (mg L ⁻¹)	
		MS	WPM
Macronutrientes			
Nitrato de Amônio	NH ₄ NO ₃	1.650,0	400,0
Nitrato de Potássio	KNO ₃	1.900,0	-
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	96,0
Sulfato de Potássio	K ₂ SO ₄	-	990,0
Nitrato de Cálcio	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556,0
Fosfato de Potássio	KH ₂ PO ₄	170,0	170,0
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	370,0
Micronutrientes			
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	6,2	6,2
Molibdato de Sódio	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
Cloreto de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
Sulfato de Manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	22,3
Sulfato de Zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25
Iodeto de Potássio	KI	0,83	-
FeEDTA			
Sódio EDTA	Na ₂ E.D.T.A.	37,2	37,2
Sulfato de Ferro	Fe ₂ (SO ₄) ₃	27,8	27,8
Vitaminas			
Ácido Nicotínico	-	0,5	0,5
Piridoxina.HCL	-	0,1	0,5
Tiamina.HCL	-	0,1	1,0
Glicina	-	2,0	2,0

Todos os tratamentos receberam 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7g L⁻¹ de ágar MERCK®, tiveram pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1atm. Após a inoculação, as sementes foram

colocadas em sala de Cultura sob fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro e intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

As avaliações foram realizadas diariamente, por 30 dias, registrando-se o número de sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas (plantas) as que apresentavam comprimento radicular maior do que 2 mm. Aos 30 dias obteve-se o percentual de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG), calculado de acordo com Maguirre (1962).

$$\text{IVG} = \frac{N_1}{D_1} + \frac{N_2}{D_2} + \dots + \frac{N_n}{D_n}$$

Onde:

N_1 = nº de sementes germinadas na 1ª contagem

D_1 = nº de dias para a 1ª contagem

N_n = nº de sementes germinadas na última contagem

D_n = nº de dias para a última contagem

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e pela análise estatística descritiva utilizando o software Statistica 10.0 (Statsoft, 2010).

2.3. Experimento 2 (sementes escarificadas)

Sementes de sucupira-preta armazenadas durante 12 meses foram desinfestadas, escarificadas e colocadas para germinar *in vitro*. Todos os procedimentos do item 2.2. foram seguidos, porém, após a desinfestação (descrita no item 2.2.), as sementes foram submetidas ao tratamento de escarificação química com ácido sulfúrico concentrado por 5 minutos, antes de serem inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura. Os tratamentos (tipos de aditivos x formulações de meio de cultura) foram semelhantes aos descritos no item 2.2.

A avaliação foi realizada diariamente, como descrito no item 2.2., e os dados foram analisados por meio de análise de variância, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade e pela análise descritiva utilizando o software Statistica 10.0 (Statsoft, 2010).

2.4. Transplântio e Aclimação

Plantas dos experimentos descritos nos itens 2.1. e 2.2. foram transplantadas para tubetes de 55 cm^3 , contendo substrato composto por 60% de vermiculita e 40% de casca de

arroz carbonizada, adicionado de 7 g L⁻¹ de formulado de liberação controlada (3 a 4 meses) Osmocote® (19-6-10). As plantas foram mantidas por 60 dias em casa de vegetação coberta com filme plástico (150 microns de espessura) e com tela de sombreamento de 50% e com irrigações diárias de 30 segundos a cada 30 minutos por nebulização (nebulizador FOGGER com vazão de 7 L h⁻¹). Após esse período, as mudas foram transferidas para casa de sombra coberta com tela de sombreamento de 50% e com 5 irrigações diárias de 5 minutos (microaspersor bailarina com vazão de 85 L h⁻¹), por outros 60 dias. Os valores de temperatura e umidade relativa foram computados diariamente nos dois ambientes.

Aos 30, 60, 90 e 120 dias, avaliou-se o percentual de sobrevivência e a altura das mudas aclimatadas, que foram analisados por meio de análise de variância e análise descritiva.

As plantas provenientes de sementes que não foram escarificadas (experimento 1), foram aclimatadas respeitando-se o histórico dos tratamentos da germinação *in vitro*, mantendo-se de 1 a 6 plantas por tratamento.

As plantas provenientes de sementes que receberam tratamento de escarificação (experimento 2) foram aclimatadas respeitando-se o histórico dos tratamentos da germinação *in vitro* em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x4) com 3 repetições e 1 a 6 plantas por repetição.

3. Resultados

3.1. Experimento 1 (sementes não escarificadas)

A germinação iniciou 10 dias após a inoculação para T1 (CAMS), T2 (CAMS/2), T4 (CAWPM/2) e T7 (PVPWPM); 11 dias para T6 (PVPMS/2); 12 dias para T3 (CAWPM) e T5 (PVPMS); e 17 dias para T8 (PVPWPM/2) (Figura 1). Observou-se, pela ANOVA, que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da interação entre os aditivos e meios de cultura e de cada fator isoladamente sobre o percentual de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG).

No geral, o percentual de germinação e o IVG foram baixos, não ultrapassando 25% e 1,12 respectivamente (Figuras 2A e 2B). Os maiores percentuais de germinação ocorreram com o uso do carvão ativado combinados com o meio MS 100% (T1) ou 50% (T2) da concentração de sais e vitaminas. Para o IVG, os maiores resultados foram obtidos com o uso

do carvão ativado combinado com o meio MS/2, com valor de 1,12 (T2) e com o meio MS, com valor de 0,89 (T1), e ainda com o uso do PVP combinado com o meio WPM, com valor de 0,88 (T7).

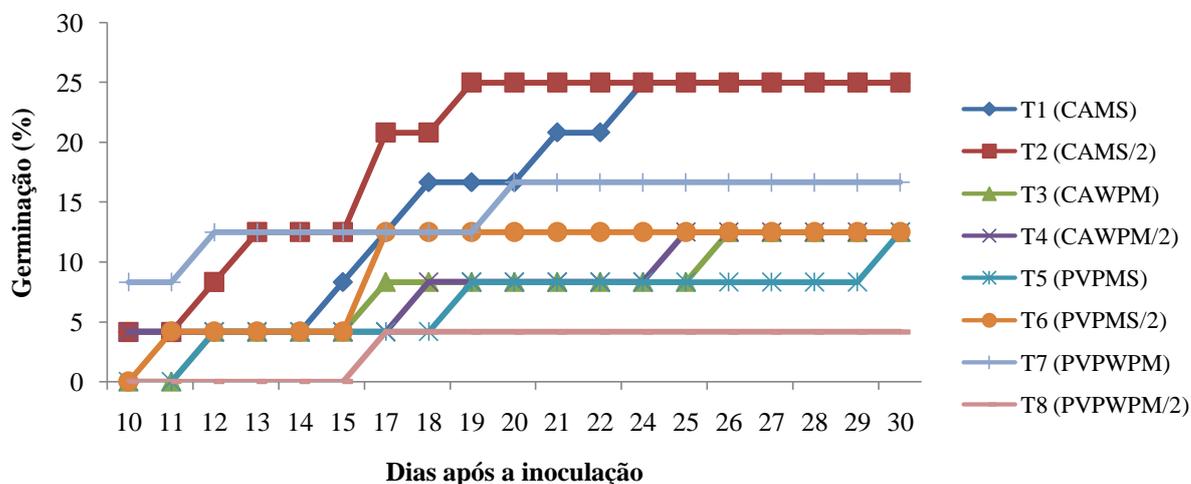


Figura 1: Curva do percentual de germinação de sementes não escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos durante 30 dias.

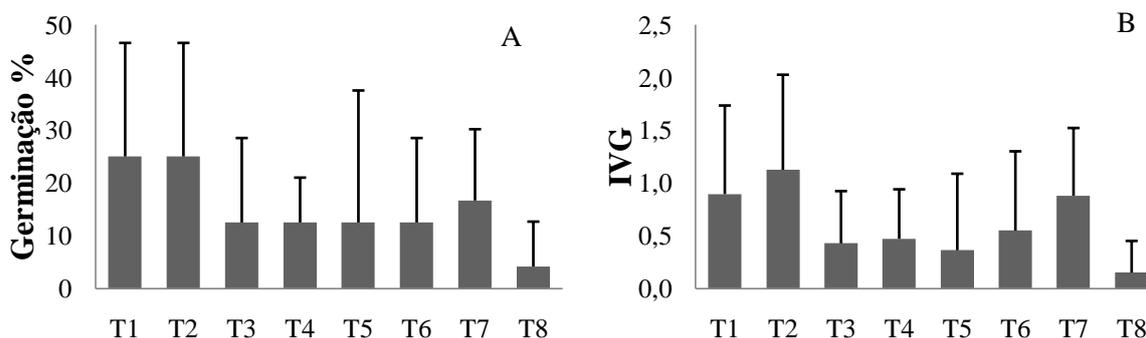


Figura 2: Percentual de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes não escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos. As barras indicam o desvio padrão.

Durante a permanência das plantas na casa de vegetação, a temperatura média foi de 23,3°C e a umidade relativa média de 70%, e na casa de sombra, a temperatura média foi de 19,7°C e a umidade relativa média de 86,6%. Os tratamentos com maior percentual de sobrevivência, aos 30, 60 e 90 dias, foram T4 (carvão ativado + meio WPM/2), T5 (PVP + meio MS) e T6 (PVP + meio MS/2) todos com 100% de sobrevivência (Figura 3A). Aos 120 dias, os tratamentos T5 e T6 foram também os que obtiveram maiores percentuais de sobrevivência, ambos com 75%, e o tratamento T3 e T4 tiveram percentual de sobrevivência de 66,7% (Figura 3A). Em relação à altura das mudas aos 120 dias, os melhores tratamentos

foram T3 (carvão ativado + meio WPM) com altura de 13,5 cm, T4 (carvão ativado + meio WPM/2) com altura de 11,6 cm e T6 (PVP + meio MS) com altura de 10,3 cm (Figura 3B).

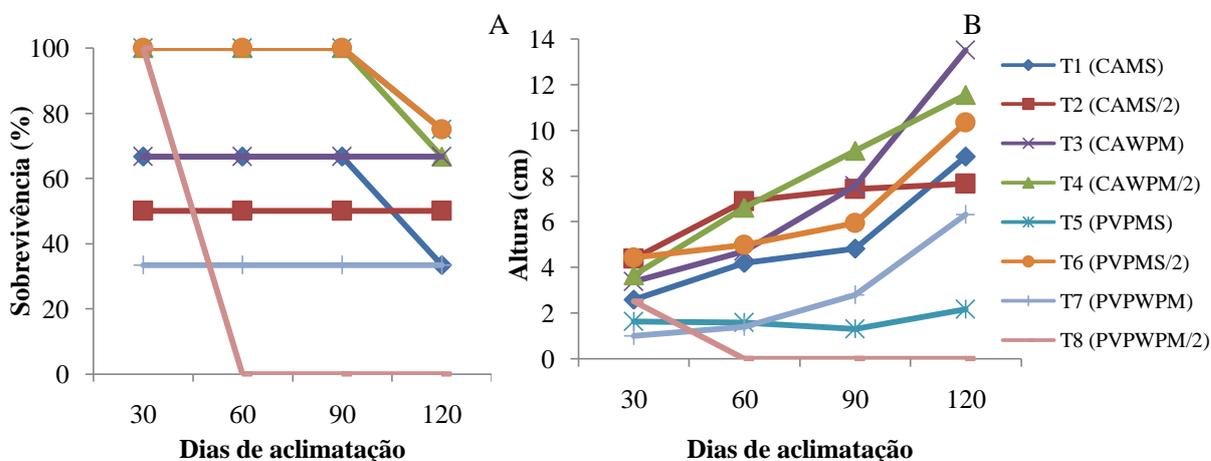


Figura 3: Percentual de sobrevivência (A) e crescimento em altura (B) de plantas de sucupira-preta, germinadas *in vitro* a partir de sementes não escarificadas, em função dos tratamentos, aos 30, 60, 90 e 120 dias de aclimação.

3.2. Experimento 2 (sementes escarificadas)

A germinação iniciou após 5 dias da inoculação para T1 (CAMS), T2 (CAMS/2) e T6 (PVPMS/2); 7 dias para T7 (PVPWPM); 8 dias para T4 (CAWPM/2), T5 (PVPMS) e T8 (PVPWPM/2); e 26 dias para T3 (CAWPM) (Figura 4). Observou-se, pela ANOVA, que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da interação entre os aditivos e meios de cultura e do aditivo sobre o percentual de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 2A). Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes meios de cultura tanto para o percentual de germinação como para o IVG (Tabela 2A). Observou-se superioridade no percentual de germinação dos meios MS/2 e WPM/2 em relação ao WPM (Tabela 2B). Para o IVG o meio MS/2 foi estatisticamente superior ao WPM (Tabela 2B). Numericamente, o tratamento T6 (PVP + meio MS) foi o que apresentou maiores médias no percentual de germinação e no IVG (Figura 5A e 5B).

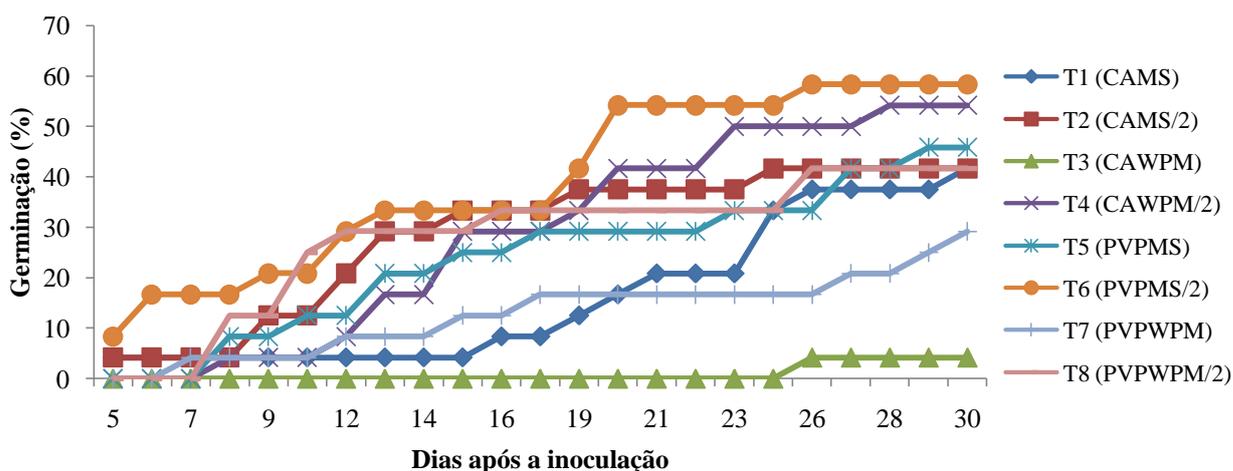


Figura 4: Curva do percentual de germinação de sementes escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos durante 30 dias.

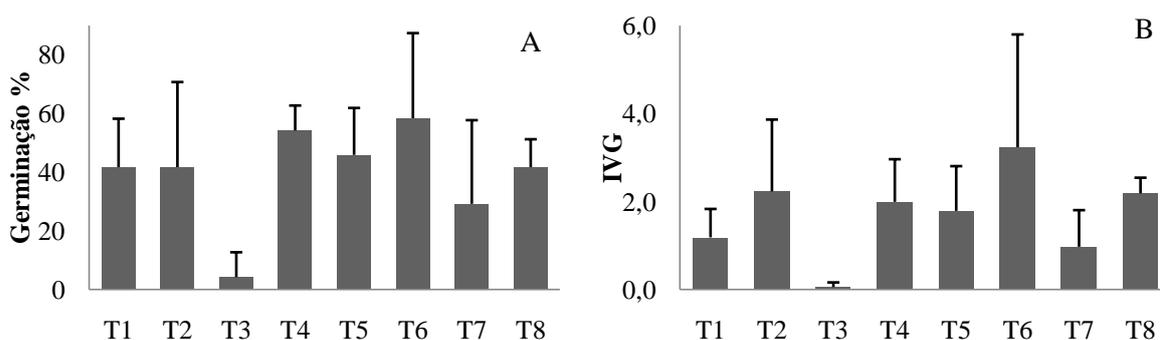


Figura 5: Percentual de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes escarificadas de sucupira-preta em função dos tratamentos. As barras indicam o desvio-padrão.

Tabela 2: Resumo da análise de variância para os dados de percentual de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG) (A); percentual de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes escarificadas de sucupira-preta em função dos diferentes meios de cultura (B)

A				B		
FV	GL	Quadrados Médios		Meio de Cultura	G (%)	IVG
		G(%)	IVG			
Aditivo	1	703,12 ^{ns}	3,72 ^{ns}	MS	43,75 ab	1,48 ab
Meio	3	2045,72 ^{**}	7,11 [*]	MS/2	52,08 a	2,73 a
Aditivo x Meio	3	587,38 ^{ns}	0,27 ^{ns}	WPM	18,75 b	0,51 b
Resíduo	24	379,05	1,55	WPM/2	47,92 a	2,09 ab
Média Geral		40,10	1,70			
CV _{exp.} (%)		48,55	73,24			

^{ns} valor não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ^{**} e ^{***} valores significativos pelo teste F a 5% e a 1% de probabilidade respectivamente; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

Valores em uma mesma coluna, seguidos por uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Durante a permanência das plantas na casa de vegetação, a temperatura média foi de 21,1°C e a umidade média de 81,6%, e na casa de sombra, a temperatura média foi de 17,0°C e a umidade média de 82,2%. Na fase de aclimação, por volta dos 60 dias, o experimento foi atacado por insetos, comprometendo o crescimento e sobrevivência das mudas. Entretanto, até os 60 dias, os tratamentos que se destacaram em relação à sobrevivência foram T1 (carvão ativado + meio MS) e T3 (PVP + meio WPM) e com 100% de sobrevivência aos 30 e 60 dias (Figura 6A). No geral, as mudas não ultrapassaram 4,46 cm de altura aos 60 dias, valor inferior ao encontrado no experimento de germinação da sucupira-preta não escarificada (Item 3.1.). Os melhores tratamentos foram T3 (carvão ativado + meio WPM) com altura de 4,46 cm e T2 (carvão ativado + meio MS/2) com altura de 3,95 cm aos 60 dias (Figura 6B).

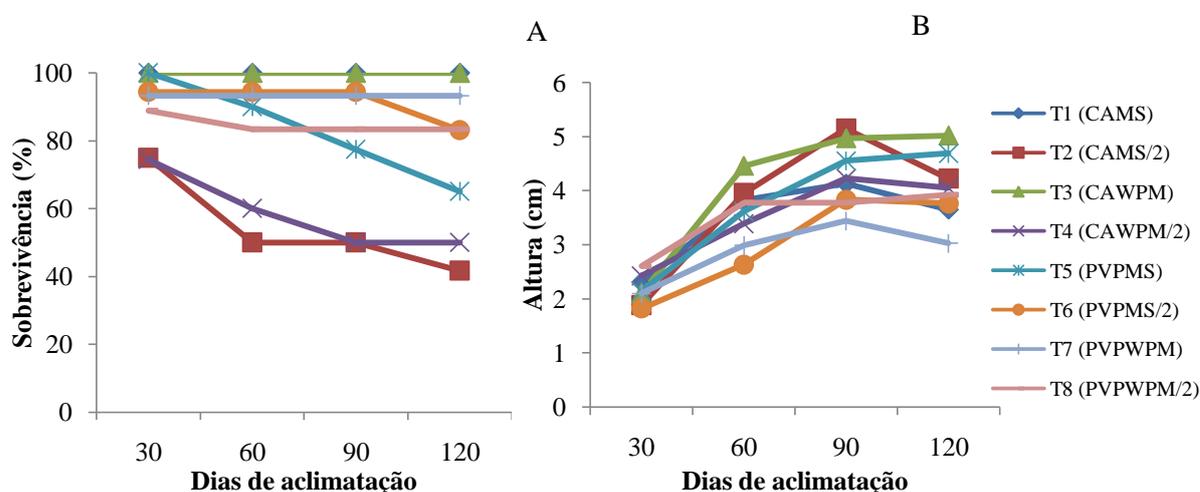


Figura 6: Percentual de sobrevivência (A) e crescimento em altura (B) de plantas de sucupira-preta, germinadas *in vitro* a partir de sementes escarificadas, em função dos tratamentos, aos 30, 60, 90 e 120 dias de aclimação.

4. Discussão

O baixo percentual de germinação para as sementes não escarificadas obtidos neste trabalho (máximo de 25%) pode ser explicada pela dormência tegumentar existente na sucupira-preta. A impermeabilidade do tegumento restringiu a entrada de água e oxigênio, retardando o processo de emergência em sementes de chichá (*Sterculia foetida* L.) (Santos et al., 2004). Em sucupira-preta, Albuquerque et al. (2007) e Gonçalves et al. (2008) observaram 11% e 20% de sementes germinadas, respectivamente, em condição de BOD, para sementes que não receberam nenhum tratamento.

Efeitos significativos dos meios de cultura sobre a germinação *in vitro* de sementes também foram observados por Nogueira et al. (2004) estudando as concentrações de 50 e 100% dos meios MS e WPM em sementes de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), onde o meio MS 50% foi o que proporcionou maior germinação dessas sementes.

Estudando os efeitos dos aditivos PVP e carvão ativado, Melo et al. (2001) também encontraram resultados não-significativos na germinação *in vitro* de embriões de guarirrobeira (*Syagrus oleracea*). Resultados diferentes foram encontrados por Disarz; Corder (2009), trabalhando com a micropropagação de acácia (*Acacia mearnsii*), que observaram menor formação de calos, maior formação de raízes e ausência de clorose em explantes subcultivados em meio MS com a adição de carvão ativado.

Neste trabalho, a redução dos sais e vitaminas a 50% dos meios de cultura MS e WPM proporcionou um aumento no processo de germinação das sementes escarificadas e pode estar relacionado ao balanço osmótico, onde o meio nutritivo muito concentrado pode prejudicar o processo germinativo. Resultados semelhantes foram encontrados por Nogueira et al. (2004), trabalhando com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*). No presente trabalho, o meio de cultura MS com 100% dos sais e vitaminas também proporcionou um alto percentual de germinação e IVG. O meio de cultura MS 100% foi também satisfatório na multiplicação de gemas axilares de acácia (*Acacia mearnsii*) (Disarz ; Corder, 2009). No entanto, devido à semelhança dos resultados obtidos em relação à redução de 50% dos sais e vitaminas, recomenda-se o uso dessa concentração do meio de cultura para redução dos custos.

A fase de transferência das plantas estabelecidas *in vitro*, visando à aclimação e rustificação em condições *ex vitro*, constitui importante etapa na formação de mudas de qualidade, uma vez que, esse material passa de uma condição heterotrófica para a autotrófica, sofrendo estresses fisiológicos (Bandeira et al., 2007). No presente caso, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para o percentual de sobrevivência e para a altura das mudas aclimatadas de sucupira-preta. Isso pode estar relacionado ao fato de as plantas já estarem enraizadas no momento em que foram repicadas do tubo de ensaio para o tubete, o que facilitou sua adaptação ao novo ambiente, independentemente do histórico de aditivo ou meio de cultura em que foi germinada. Resultados diferentes foram encontrados por Santos et al. (2006), trabalhando com micropropagação de pequi, que observaram que as plantas provenientes do cultivo *in vitro* em meio WPM, acrescido com 4g L⁻¹ de carvão ativado apresentaram, no final da aclimação, maiores proporções de plantas vivas em relação às plantas provenientes do meio de cultivo com ausência de carvão ativado, embora o

aspecto das plantas sobreviventes, provenientes dos dois tratamentos, tenham sido semelhantes.

No geral, a altura das mudas de sucupira-preta obtidas neste trabalho, provenientes de sementes escarificadas, foi menor do que a altura média das mudas provenientes de sementes não escarificadas e, ambas foram inferiores ao padrão de altura desejável de uma muda pronta para expedição. Aos 120 dias, as mudas provenientes de sementes não escarificadas tinham uma altura média de 7,5cm, enquanto que as mudas provenientes de sementes escarificadas, de 4,0cm. Tanto as mudas provenientes de sementes não escarificadas, como as de sementes escarificadas, devem permanecer em rustificação por um período maior do que 120 dias, até atingirem um padrão para o plantio em campo.

5. Conclusões

- A escarificação de sementes e a utilização dos meios de cultura MS com 50 e a 100% e WPM com 50% dos sais e vitaminas proporcionaram os maiores percentuais de germinação *in vitro* de sucupira-preta.
- A germinação da sucupira-preta ocorreu, independentemente, do tipo de aditivo utilizado, carvão ativado ou PVP;
- A aclimação de plantas de sucupira-preta germinadas *in vitro* ocorreu, independentemente, do histórico de aditivos ou meios de cultura utilizados;
- A germinação *in vitro* de sucupira-preta é um método viável para propagação da espécie e pode ser utilizada para introdução de material vegetal *in vitro* de forma asséptica;
- A germinação *in vitro* de sucupira-preta é um processo importante para a micropropagação por meio da proliferação de gemas axilares visando a propagação e a conservação genética da espécie.

6. Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, K. S. et al.. Métodos para a superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1716-1721, 2007.

BANDEIRA, F. S. et al.. Aclimação *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 3, n. 5, p. 773 - 781, 2007.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1999. v.2, p.87-132.

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

DISARZ, R.; CORDER, M. P. M.. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsi* Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, v.33, n.4, p.599-606, 2009.

GONÇALVES, J. V. S. et al.. Caracterização física e avaliação da pré-embebição na germinação de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Cerne**, v.14, n. 4, p. 330-334, 2008.

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: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1999. v.2, p.183-260.

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

LORENZI, H.. **Árvores Brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1, 4 ed.. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 384 p.

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

MELO, B. et al.. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas ma cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.6, p.1301-1306, 2001.

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

NICIOLI, P. M.. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) – Coville]**. 2006, 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UFLA, Lavras – MG.

NOGUEIRA, R.C.. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

SAMPAIO, L. S. de V. et al. Ácido sulfúrico na superação da dormência de sementes de sucupira preta (*Bowdichiavirgilioides*Kunth. - Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 184-190, 2001.

SANTOS, B. R. et al.. Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SANTOS, T.O.; MORAIS, T.G.O.; MATOS, V.P. Escarificação Mecânica em Sementes de Chichá (*Sterculiafoetida*L.). **Revista Árvore**, v. 28, n 1, p 1-6, 2004.

SMIRDELE, O. J.; SOUZA, R. C. P. Dormência em sementes de paricana (*Bowdichia virgilioides* Kunth – Fabaceae - Papilonoideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, nº 2, p.48-52, 2003.

STATSOFT, Inc. (2010). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C.. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.533-568.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L.. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrelafissilis*Vell.). **Revista Árvore**, v.27, n.3, p.351-356, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L..**Silvicultura Clonal: princípios e Técnicas**. Ed. UFV, Viçosa – MG, 2009, 272p.

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGAÇÃO DE SUCUPIRA-PRETA (*Bowdichia virgilioides* Kunth.)

Resumo - O objetivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento básico de micropropagação via gemas axilares para sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*). Explantes retirados de plantas germinadas *in vitro* isentas de contaminação foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com concentrações de BAP, constituindo a fase de multiplicação, formada pelo cultivo inicial e três subcultivos subsequentes. Para a fase de alongamento, os tratamentos foram combinações de concentrações de ANA com BAP que foram adicionadas ao meio de cultura. Para a fase de enraizamento, foram realizados 3 experimentos, sendo o primeiro constituído por tratamentos com concentrações de AIB, o segundo pela repicagem dos experimento anterior e mantendo-se os tratamentos com concentrações de AIB, e o terceiro por tratamentos com combinações de aditivos (carvão ativado e PVP) com concentrações de ANA. Para a fase de aclimação plantas foram transplantadas para substrato e cobertas com saco de polietileno que foram, posteriormente, perfurados, retirados ou não-retirados, e mantidas em ambiente fechado, constituindo os tratamentos da pré-aclimação. As plantas foram então transplantadas para tubetes contendo substrato em casa de vegetação, sendo mantido o histórico dos tratamentos da pré-aclimação, constituindo a aclimação propriamente dita. As maiores taxas de multiplicação da sucupira-preta foram alcançadas utilizando-se explantes de segmentos cotiledonares e a concentração de 0,3 mg.L⁻¹ de BAP adicionada ao meio de cultura. O maior alongamento de gemas axilares foi na combinação de 0,3 mg.L⁻¹ de ANA com 0,03 mg.L⁻¹ de BAP adicionados ao meio. O maior percentual de indução de raízes ocorreu na ausência de AIB ou em resposta às concentrações de 0,5 e 2,5 mg.L⁻¹. O carvão ativado adicionado ao meio de cultura de enraizamento melhorou a qualidade das brotações. A aclimação de plantas de sucupira-preta produzidas *in vitro* foi satisfatória quando se manteve uma cobertura plástica entorno da planta na fase de pré-aclimação.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, propagação de plantas, espécie nativa.

1. Introdução

A sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) é uma árvore pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae (Lorenzi, 2002). Possui madeira densa, de cerne pardo escuro, de alta durabilidade, sendo empregada em móveis de luxo, acabamentos internos, construções, dormentes, pontes, entre outros. A sucupira-preta é conhecida popularmente por suas propriedades terapêuticas no tratamento de sífilis, reumatismo, do diabetes e das afecções cutâneas (Carvalho, 2002).

A propagação da espécie é realizada principalmente através da germinação de sementes. Entretanto, a sucupira-preta apresenta dormência tegumentar, e que reduz sensivelmente a porcentagem de germinação, sendo esta de 0 a 2,1% sem a superação da dormência, e de 45 a 88% com a superação da dormência (Carvalho, 2002).

Assim, a micropropagação representa uma alternativa para produção de mudas desta espécie. A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa que pode ser utilizada para certas espécies que tem a semente como insumo limitante, com dificuldade de germinação e armazenamento, permitindo também a maximização da qualidade e uniformidade dos plantios quando utilizados genótipos selecionados, além da propagação de espécies de interesse econômico de maneira a preservar as florestas naturais (Xavier et al., 2003).

No entanto, para o uso prático da micropropagação, é necessário otimizar as condições de cultivo para cada espécie. Dentre os fatores que mais influenciam na maximização do potencial genotípico *in vitro*, estão os reguladores de crescimento em especial as citocininas e as auxinas (Rogalski, 2003). A formação de raízes, parte aérea, calos e proliferação de gemas são regulados pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores (Caldas et al., 1999).

A adição de citocininas é favorável, ou até necessário. Das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, apresenta melhores resultados. Já as auxinas mais utilizadas são o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB), sendo o primeiro utilizado na fase de alongamento e o segundo na indução de raízes *in vitro* (Grattapaglia; Machado, 1999).

Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a micropropagação. Na seleção dos explantes devem ser considerados aspectos como, o nível de diferenciação do tecido utilizado, e a finalidade da micropropagação. Teoricamente, qualquer tecido pode ser

utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procuram-se usar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia; Machado, 1999).

A aclimação é o processo que envolve o transplante da planta cultivada *in vitro* para o ambiente externo (Grattapaglia; Machado 1999). Esta fase é de grande importância, sendo considerado um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos, por afetar diretamente a sobrevivência e a qualidade final das mudas produzidas (Niciolli, 2006).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende, portanto, do controle de grande número de variáveis em cada uma de suas fases. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento básico de micropropagação via gemas axilares para sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*).

2. Material e Métodos

2.1. Material Vegetal

Frutos de sucupira-preta foram coletados em matrizes localizadas no Parque Estadual do Rio Preto, localizado no município de São Gonçalo do Rio Preto, MG. Após o beneficiamento, as sementes foram armazenadas em sacos de papel e colocadas em laboratório à temperatura ambiente.

Todos os experimentos foram conduzidos no laboratório de Melhoramento Florestal, e na casa de vegetação do Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais - CIPEF da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, localizada em Diamantina – MG, durante o período de setembro de 2010 a novembro de 2011.

2.2. Estabelecimento das culturas assépticas

Para a germinação *in vitro*, as sementes com 7 meses de armazenamento foram inicialmente escarificadas com lixa d'água nº 20 e desinfestadas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio (25mm x 150mm), contendo 10 mL de meio de cultura constituído de sais e vitaminas de MS (Murashige; Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 20 g L⁻¹ de sacarose e 5 g L⁻¹ de ágar MERCK®. O meio de cultura teve o

pH ajustado para $5,8 \pm 0,01$ e foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1atm. Foi inoculada uma semente por frasco, os quais foram vedados e mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até a ocorrência da germinação.

2.3. Multiplicação de gemas axilares

Das plantas germinadas *in vitro* com aproximadamente 30 dias, isentas de contaminação por microorganismos, foram retirados os dois tipos de explantes (segmentos cotiledonares e segmentos nodais, com tamanho aproximado de 1cm). Para o cultivo inicial, os explantes foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura previamente preparado e autoclavado. Utilizou-se o meio WPM (Lloyd; McCown, 1981) com 100% da concentração dos sais e vitaminas, suplementado com 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de PVP, 20 g L^{-1} de sacarose, 5 g L^{-1} de ágar MERCK® e BAP em concentrações variando de acordo com os tratamentos e o pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,01$. Foram utilizadas as concentrações de 0,1 e 0,3 mg L^{-1} de BAP, combinadas com 0,01 mg L^{-1} de ANA. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (2 tipos de explantes e 2 concentrações de BAP) com 4 repetições e 6 explantes por repetição. O experimento foi conduzido em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A fase de multiplicação foi constituída pelo cultivo inicial e três subcultivos subseqüentes (subcultivos 1, 2 e 3), sendo em cada um deles repetidos os procedimentos descritos anteriormente. Para avaliar o efeito do tipo de explante (segmentos cotiledonares e segmentos nodais), respeitou-se o histórico do explante, ou seja, no subcultivo 1 foram usadas gemas axilares retiradas de segmentos nodais e de segmentos cotiledonares do cultivo inicial, e assim sucessivamente.

Aos 30 dias para o cultivo inicial, e aos 40 dias para os subcultivos 1, 2 e 3, avaliou-se o número de gemas axilares por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e testes de média, utilizando o software Statistica 10.0 (Statsoft, 2010).

2.4. Alongamento de gemas axilares

Foram utilizadas gemas axilares obtidas na fase de multiplicação em meio contendo $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e com 40 dias. Os tratamentos foram constituídos pelas combinações das concentrações de 0,1; 0,3 e $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA com 0,01; 0,03 e $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, que foram adicionadas ao meio de cultura. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3 (três concentrações de BAP e três concentrações de ANA), com 5 repetições e 4 explantes por repetição. Considerou-se um frasco de cultivo (55mm x 90mm), contendo 40 mL de meio de cultura com quatro gemas axilares como repetição. O meio de cultura básico utilizado foi semelhante ao descrito no item 2.2, porém, com modificações referentes à adição dos reguladores de crescimento, conforme descrito anteriormente.

Após a inoculação, os frascos com os explantes foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 40 dias.

Aos 40 dias de alongamento avaliou-se o comprimento da maior brotação (cm) e os dados foram submetidos à análise de variância e testes de média com o auxílio do software Statistica 10.0 (Statsoft, 2010).

2.5. Enraizamento de brotações

Nesta etapa foram utilizadas brotações maiores que 2 cm de comprimento obtidos na fase de multiplicação ou alongamento. O meio de cultura básico utilizado foi semelhante ao descrito no item 2.2, porém, com modificações referentes à adição dos reguladores de crescimento, conforme descrito nos experimentos 1, 2 e 3. As brotações foram inoculadas verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura.

Experimento 1: brotações foram retiradas de plantas de sucupira-preta multiplicadas com $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e com 90 dias. Os tratamentos foram constituídos pelas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB que foram adicionadas ao meio de cultura. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 brotações por repetição.

Experimento 2: brotações provenientes do experimento anterior e que não enraizaram, tiveram sua base podada e foram novamente inoculadas em meio de cultura. Os

tratamentos foram constituídos pelas concentrações de 0; 1; 2; 3 e 4 mg L⁻¹ de AIB, que foram adicionadas ao meio de cultura. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 brotações por repetição.

Experimento 3: Brotações foram retiradas de plantas de sucupira-preta alongadas com 0,3 mg L⁻¹ de ANA e 0,03 mg L⁻¹ de BAP e com 40 dias. Os tratamentos foram constituídos pelas combinações de 2 tipos de aditivos (carvão ativado e PVP nas concentrações de 2000 mg L⁻¹ e de 800 mg L⁻¹ respectivamente) com 4 concentrações de ANA (0, 1, 2 e 4 mg L⁻¹) que foram adicionadas ao meio de cultura. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (2 aditivos e 4 concentrações de ANA) com 4 repetições e 6 brotações por repetição.

Para os 3 experimentos, após a inoculação, os tubos de ensaio com as brotações foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux e temperatura de 25 ± 2°C durante 120 dias.

Aos 60 e aos 120 dias avaliou-se o percentual de enraizamento e de calosidade das brotações para os experimentos 1 e 2 e, aos 120 dias, o percentual de enraizamento e de calosidade das brotações, o percentual de clorose e de queda de folhas e ainda, a análise descritiva do percentual de plantas bem desenvolvidas para o experimento 3 (Figura 4). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, testes de média e análise de regressão com o auxílio do software Statistica 10.0 (Statsoft, 2010).

2.6. Aclimação de plantas propagadas *in vitro*

Plantas maiores que 2 cm de comprimento, enraizadas *in vitro* e com 120 dias foram transplantadas para copos de polietileno de 200 cm³, contendo substrato composto por 70% de vermiculita e 30% de Bioplant[®]. As plantas foram cobertas com um saco de polietileno transparente e mantidas em ambiente fechado caracterizando a pré-aclimação da sucupira-preta. Foram realizadas irrigações de 2 em 2 dias, com solução de macro e micronutrientes WPM a 50%. Após 10 dias de pré-aclimação, foram realizados os seguintes tratamentos: T1- retirada total dos sacos de polietileno, T2- aberturas parciais nos sacos de polietileno (6 furos, sendo 3 de cada lado), e T3- permanência do saco de polietileno intacto. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições. Após 60 dias de pré-aclimação, as plantas foram transplantadas para tubetes de 180 cm³ contendo substrato composto por 70% de vermiculita e 30% de Bioplant[®], adicionado de 7 g L⁻¹ de formulado de liberação controlada

(3 a 4 meses) Osmocote® (19-6-10). Estas foram mantidas em casa de vegetação coberta com filme plástico (150 microns de espessura) e com tela de sombreamento de 50% e com 3 irrigações diárias de 3 minutos cada por nebulização (nebulizador FOGGER com vazão de 7 L h⁻¹) durante mais 30 dias, caracterizando o processo de aclimação propriamente dito. Durante o processo de aclimação em casa de vegetação, foi mantido o histórico dos tratamentos da pré-aclimação (T1- retirada total dos sacos de polietileno, T2- aberturas parciais nos sacos de polietileno e T3- permanência do saco de polietileno intacto) em delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições. Os valores de temperatura e umidade relativa do ar foram registrados diariamente na casa de vegetação.

Aos 60 dias de pré-aclimação avaliou-se a sobrevivência, a altura, o número de raízes e o aspecto visual da parte aérea, que foi classificado numa escala de 1 a 4, sendo 1- aspecto ruim, 2- aspecto médio, 3- aspecto bom e 4- aspecto ótimo (Figura 4). Aos 30 dias de aclimação em casa de vegetação, avaliou-se o percentual de sobrevivência e a altura das mudas. Os dados foram submetidos a análise de variância, testes de médias e análises descritivas com o auxílio do software Statistica 10.0 (Statsoft, 2010).

3. Resultados

3.1. Multiplicação de gemas axilares

Com relação ao número médio de gemas por explante, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$), para a interação tipo de explante x concentrações de BAP para o subcultivo 1, para o tipo de explante no cultivo inicial e no subcultivo 3, e para as concentrações de BAP no subcultivo 2 (Tabela 1).

Observa-se, de acordo com a Tabela 2, que no desdobramento da interação tipo de explante x concentrações de BAP, o número de gemas axilares por explante, obtido com a utilização do segmento nodal, foi estatisticamente superior ao segmento cotiledonar na concentração 0,3 mg L⁻¹ de BAP no subcultivo 1. A concentração 0,3 mg L⁻¹ foi superior à 0,1 mg L⁻¹ de BAP, para o segmento nodal no subcultivo 1 para essa mesma característica. Considerando o efeito do explante isoladamente no cultivo inicial e no subcultivo 3, o segmento cotiledonar foi estatisticamente e visualmente superior ao segmento nodal (Figura 1). Considerando agora o efeito das concentrações de BAP isoladamente no subcultivo 2, a concentração de 0,3 mg L⁻¹ foi novamente superior à 0,1 mg L⁻¹ de BAP.

Tabela 1: Resumo da análise de variância referente ao número médio de gemas por explante de sucupira-preta no cultivo inicial e nos subcultivos 1, 2 e 3 em função do tipo de explante e das concentrações de BAP

FV	GL	Quadrados Médios (Gemas/explante)			
		Cultivo Inicial	Subcultivo 1 ⁽¹⁾	Subcultivo 2	Subcultivo 3
Explante (EXP)	1	53,17**	0,46 ^{ns}	0,37 ^{ns}	81,60*
BAP	1	5,41 ^{ns}	0,85 ^{ns}	19,29*	2,15 ^{ns}
EXP*BAP	1	11,28 ^{ns}	2,07*	5,96 ^{ns}	4,91 ^{ns}
Resíduo	12	4,87 ^{ns}	0,28 ^{ns}	3,25 ^{ns}	15,71 ^{ns}
Média Geral		9,47	1,84	4,97	12,8
CV_{exp} (%)		23,32	63,38	36,25	30,96

* e ** = significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CV_{exp} = coeficiente de variação experimental. ⁽¹⁾ valores transformados para \sqrt{x} por não apresentarem normalidade pelo teste Lilliefors a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Número médio de gemas axilares por explante de sucupira-preta, em função da interação explante x BAP, dos tipos de explante e das concentrações de BAP para o cultivo inicial e para os subcultivos 1, 2 e 3

		Cultivo Inicial			
Explante	Seg. Cotiledonares	11,30	A		
	Seg. Nodais	7,65	B		
		Subcultivo 1			
				BAP	
			0,1 mg L ⁻¹	0,3 mg L ⁻¹	
Explante	Seg. Cotiledonares	3,38	Aa	2,50	Ba
	Seg. Nodais	2,09	Ab	7,29	Aa
		Subcultivo 2			
BAP	0,1 mg L ⁻¹	3,88	B		
	0,3 mg L ⁻¹	6,07	A		
		Subcultivo 3			
Explante	Seg. Cotiledonares	15,06	A		
	Seg. Nodais	10,55	B		

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas e em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas idênticas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

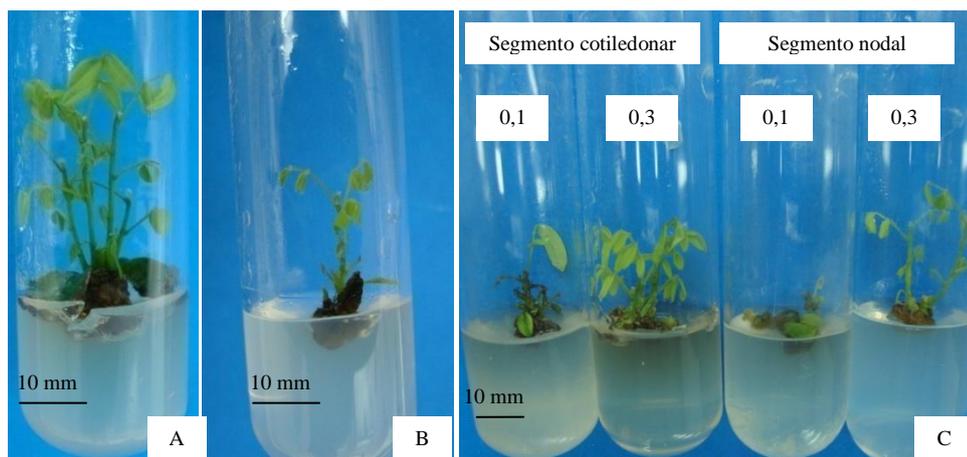


Figura 1: Aspecto visual da multiplicação de explantes de sucupira-preta. A) segmento cotiledonar e B) segmento nodal, ambos do cultivo inicial, C) os 4 tratamentos do subcultivo 2 (segmentos cotiledonar e nodal combinados com as concentrações de 0,1 e 0,3 mg.L⁻¹ de BAP).

3.2. Alongamento de gemas axilares

Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos para a altura média dos explantes aos 40 dias. No entanto, a concentração de 0,3 mg L⁻¹ de ANA combinada com as três concentrações de BAP, em especial a de 0,03 mg L⁻¹ apresentou valores numericamente superiores de altura do explante para a sucupira-preta (2,54 cm). A partir dessa concentração de ANA, observou-se uma tendência de decréscimo na altura obtida para as três concentrações de BAP, sendo esta, em média, 1,72 cm (Figura 2).

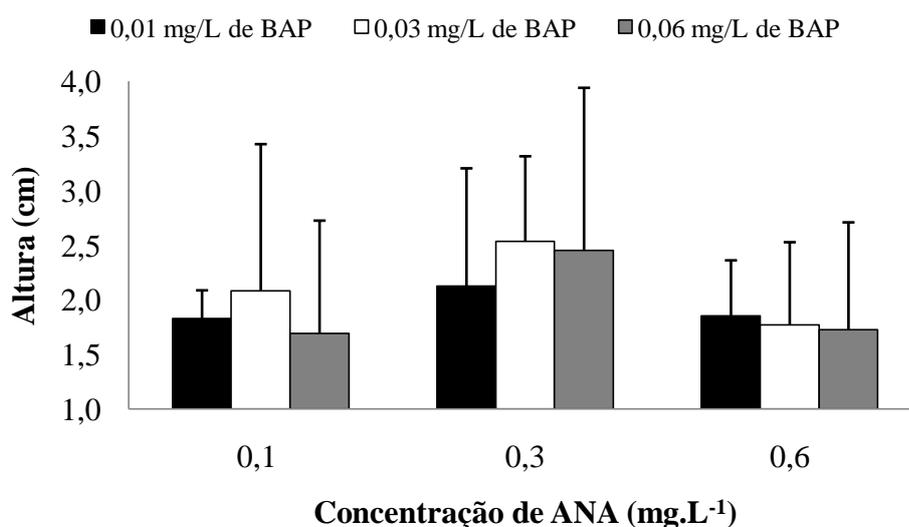


Figura 2: Altura média de explantes de sucupira-preta em função das concentrações de ANA e BAP aos 40 dias de alongamento. As barras indicam o desvio padrão.

3.3. Enraizamento de brotações

Experimento 1: Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o percentual de calosidade aos 60 dias (Tabela 3). A regressão quadrática foi significativa ($p < 0,05$) para o percentual de calosidade aos 60 dias e observou-se uma tendência crescente no percentual de calosidade à medida que se aumentou a concentração de AIB (Figura 3A). Em relação ao percentual de enraizamento aos 120 dias, as concentrações de 2,0; 0,0 e 0,5 mg.L^{-1} de AIB resultaram em maiores valores, sendo 31,7; 29,2 e 29,2% respectivamente (Figura 3B).

Tabela 3: Resumo da análise de variância referente ao percentual de enraizamento e de calosidade aos 60 e aos 120 dias de brotações de sucupira-preta em função das concentrações de AIB

FV	GL	Quadrados Médios			
		60 dias		120 dias	
		Enraizamento	Calosidade	Enraizamento	Calosidade
		%			
Tratamento	8	36,65 ^{ns}	1068,75 ^{**}	36,65 ^{ns}	325,69 ^{ns}
Resíduo	27	33,44	275,41	25,72	321,09
Média Geral		2,31	47,50	20,83	60,65
CV_{exp} (%)		250,32%	34,94%	86,02%	43,64%

* e ** = significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CV_{exp} = coeficiente de variação experimental.

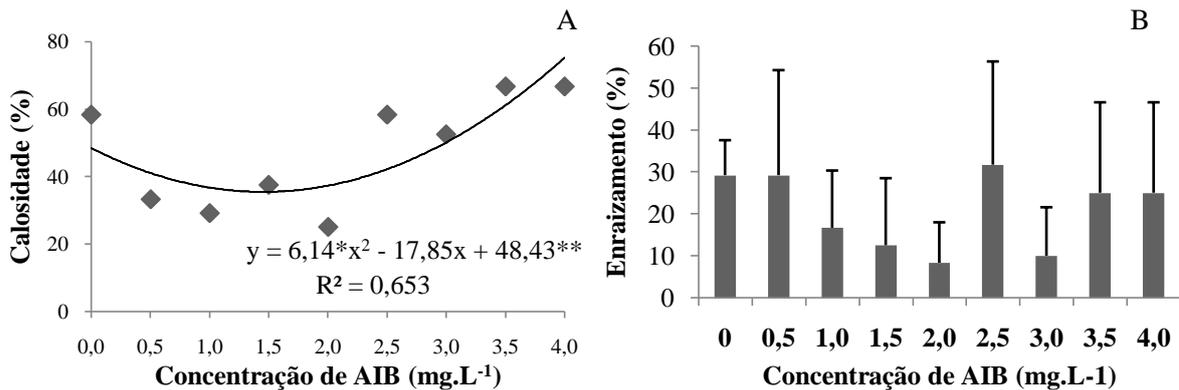


Figura 3: Percentual de calosidade aos 60 dias (A) e percentual de enraizamento aos 120 dias (B) de brotações de sucupira-preta em função das concentrações de AIB. As barras indicam o desvio padrão.

Experimento 2: Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos para as características analisadas aos 60 dias. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o percentual de enraizamento aos 120 dias

(Tabela 4A). A concentração de 3 mg L⁻¹ foi estatisticamente superior à concentração de 1 mg L⁻¹ (Tabela 4B). No geral, o percentual médio de enraizamento foi inferior quando se realizou a repicagem na fase de enraizamento (experimento 2 em relação ao experimento 1).

Experimento 3: Aos 120 dias, foram encontradas diferenças significativas (p <0,05) para a interação aditivos x concentração de ANA para o percentual de explantes com clorose foliar e entre os aditivos para o percentual de calosidade e de explantes com clorose foliar (Tabela 5).

Tabela 4: Resumo da análise de variância (A) e médias (B) do percentual de enraizamento de brotações de sucupira-preta, aos 120 dias após a repicagem, em função das concentrações de AIB

A			B	
FV	GL	Quadrados Médios Enraizamento (%)	AIB (mg L ⁻¹)	Enraizamento (%)
Tratamento	4	40,37*	0	12,50 ab
Resíduo	15	110,83	1	0,00 b
Média Geral		10,00	2	5,00 ab
VC _{exp} (%)		105,28	3	26,25 a
			4	6,25 ab

* e ** = significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CV_{exp} = coeficiente de variação experimental.

Valores em uma mesma coluna, seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5: Resumo da análise de variância referente ao percentual de enraizamento, de calosidade, de clorose foliar e de queda de folhas aos 120 dias, de brotações de sucupira-preta, em função dos aditivos e das concentrações de ANA

FV	GL	Quadrados Médios			
		Enraizamento	Calosidade	Clorose foliar %	Queda de folhas
Aditivos	1	312,50 ^{ns}	6050,00*	7200,00*	200,00 ^{ns}
ANA	3	48,83 ^{ns}	216,67 ^{ns}	366,67 ^{ns}	350,00 ^{ns}
Aditivos*ANA	3	145,83 ^{ns}	883,33 ^{ns}	633,33*	500,00 ^{ns}
Resíduo	24	87,50	341,67	166,67	283,33
Média Geral		4,38	28,75	77,50	18,75
VC _{exp} (%)		213,81	64,29	16,66	89,77

* e ** = significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CV_{exp} = coeficiente de variação experimental.

Observa-se, de acordo com a Tabela 6, que no desdobramento da interação aditivos x concentrações de ANA, o percentual de clorose foliar na concentração de 0,0 mg L⁻¹ foi estatisticamente inferior à 1,0 mg L⁻¹ de ANA no aditivo carvão ativado. O carvão ativado proporcionou menor percentual de clorose foliar em relação ao PVP em todas as concentrações de ANA estudadas. Considerando o efeito do aditivo isoladamente, o PVP foi estatisticamente superior ao carvão ativado para o percentual de calosidade.

Tabela 6: Percentual de calosidade em função dos aditivos, e percentual de clorose foliar em função da interação aditivo x ANA, de brotações de sucupira-preta aos 120 dias

		Calosidade (%)			
Aditivo	Carvão ativado	15,00 B			
	PVP	42,50 A			
		Clorose foliar (%)			
		ANA (mg L ⁻¹)			
		0,0	1,0	2,0	4,0
Aditivo	Carvão ativado	45,00 Bb	80,00 Ba	60,00 Bab	65,00 Bab
	PVP	90,00 Aa	85,00 Aa	100,00 Aa	95,00 Aa

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas e em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas idênticas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.4. Aclimação de plantas propagadas *in vitro*

Durante a permanência das mudas na casa de vegetação, a temperatura média foi de 19,1 °C e a umidade média foi de 81,6%. Aos 60 dias de pré-aclimação, observou-se 100% de sobrevivência para todos os tratamentos e aos 30 dias de aclimação em casa de vegetação, observou-se 0%, 50% e 75% de sobrevivência para os tratamentos T1, T2 e T3 respectivamente. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o número de raízes na fase de pré-aclimação e para a altura na fase de aclimação (Tabela 7).

Tabela 7: Resumo da análise de variância referente ao número de raízes e à altura aos 60 dias de pré-aclimatação; e referente à altura durante a aclimatação em casa de vegetação aos 30 dias de mudas de sucupira-preta em função dos tratamentos

FV	GL	Quadrados Médios		
		Pré-aclimatação		Aclimatação
		Número de raízes	Altura (cm)	Altura (cm)
Tratamento	2	6,13*	0,50 ^{ns}	0,08*
Resíduo	21	1,61	1,61	1,87
Média Geral		1,50	3,97	1,22
VC_{exp} (%)		84,59	31,96	112,09

* e ** = significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CV_{exp} = coeficiente de variação experimental

De acordo com a Tabela 8 o tratamento T3 (permanência do saco de polietileno) foi estatisticamente superior ao T1 (ausência de saco de polietileno) em relação ao número de raízes durante a pré-aclimatação e em relação à altura durante a aclimatação em casa de vegetação.

Tabela 8: Número de raízes aos 60 dias de pré-aclimatação e altura aos 30 dias de aclimatação em casa de vegetação, de plantas de sucupira-preta, em função dos tratamentos

Tratamentos	Número de raízes (pré-aclimatação)
T1	0,63 b
T2	1,50 ab
T3	2,38 a
Altura (aclimatação)	
T1	0,00 b
T2	1,70 ab
T3	1,96 a

Valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas idênticas não diferem entre, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com relação ao aspecto visual da parte aérea de plantas pré-aclimatadas aos 60 dias, observa-se que o tratamento T3 (permanência do saco de polietileno) foi superior ao T2 (saco de polietileno perfurado), que por sua vez, foi superior ao T1 (ausência de saco de polietileno) (Figura 4).

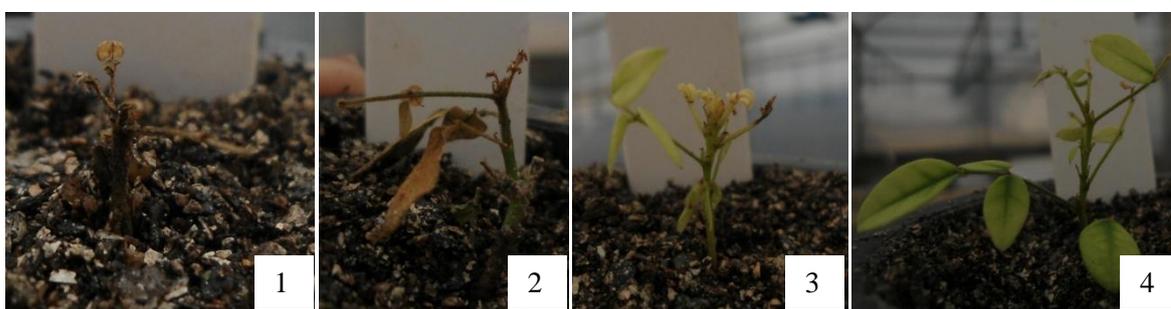
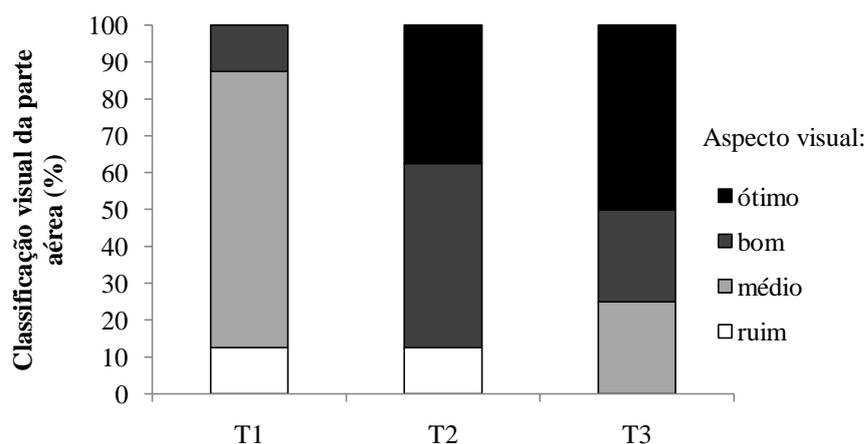


Figura 4: Classificação do aspecto visual da parte aérea de mudas de sucupira-preta, aos 60 dias, em função dos tratamentos. 1) aspecto ruim, 2) aspecto médio, 3) aspecto bom e 4) aspecto ótimo.

4. Discussão

Com relação ao efeito do BAP, a concentração de 0,3 foi superior a de 0,1 mg L⁻¹ nos subcultivos 1 e 2, com médias de 5,0 e 6,0 gemas por explante respectivamente. Ribas et al. (2005), utilizando segmentos nodais de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) e BAP adicionado ao meio de cultura (1,0 a 2,0 mg L⁻¹) obteve 4,0 a 5,0 brotações por explante. Cordeiro et al. (2004) observaram 2,0 a 3,0 brotos produzidos por explante de paricá (*Schizolobium amazonicum*) à medida que se aumentou a concentração de BAP (até 2,5 mg L⁻¹).

De acordo com Ferri et al. (1981), a habilidade de emissão de brotações em segmentos cotiledonares é devida à maior juvenildade desse tipo de explante, já que, o cotilédone é uma estrutura embrionária formado por meristema, tecido não diferenciado, capaz de multiplicar-se por divisão celular e formar outros tecidos. Resultados contrastantes foram encontrados por Andrade et al. (2000) que não observaram qualquer formação de brotos nos explantes cotiledonares de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) utilizando meio MS modificado com

50% dos sais e vitaminas e suplementado com diferentes combinações entre ANA, BAP e cinetina.

Com relação ao alongamento, Andrade et al. (2000) observaram resultados bastante semelhantes a este estudo na micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) sendo que o comprimento da brotação aumentou conforme elevaram-se os níveis de BAP. Porém, a maior média alcançada (6,3) ocorreu em concentração bastante superior à do presente estudo (1,0 mg.L⁻¹ de BAP) e, a partir dessa concentração observou-se uma tendência de queda no comprimento da parte aérea. Isso pode estar ligada ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas até uma determinada concentração, o que varia de acordo com a espécie, e a partir desta, ocorre um efeito tóxico, que se caracteriza, entre outros, pela falta de alongamento das culturas (Gratapaglia; Machado, 1999).

Observou-se uma tendência crescente do percentual de calosidade aos 60 dias em relação ao aumento da concentração do AIB (experimento 1 de enraizamento). A formação de calos na base do explante pode ser um indício de enraizamento futuro, pois, em espécies consideradas de difícil enraizamento, geralmente, há formação de calos precedendo a formação de raízes (Hamann, 1998; Lima et al., 2007). Isso pode ser comprovado pelo aumento no percentual de enraizamento de 2,31% aos 60 dias para 20,83% aos 120 dias no experimento 1. Com relação ao comportamento diferente das concentrações de 0,5 a 2,0 mg L⁻¹ de AIB, no percentual de calosidade, deve-se levar em consideração que o material utilizado no trabalho foi proveniente de sementes de genótipos diferentes, podendo estar associado a alta variabilidade dentro da espécie. De acordo com Cordeiro et al. (2004) deve-se ressaltar que tais diferenças obtidas também podem estar ligadas à variação no tamanho do explante e condições *in vitro* parcialmente controladas.

O comportamento do percentual de enraizamento aos 120 dias também foi bastante irregular no experimento 1 e, segundo Assis; Teixeira (1999), há várias evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada, pois há bastante variação entre espécies e mesmo entre clones de uma mesma espécie. As concentrações de 0,0; 0,5 e 2,5 mg L⁻¹ de AIB foram as que proporcionaram maiores percentuais de enraizamento para a sucupira-preta no experimento 1, concordando com Couto et al. (2003) que também obtiveram maiores percentuais de enraizamento de porta-enxertos de pessegueiro (*Prunus* sp. “Barrier”) usando essas mesmas concentrações de AIB adicionada ao meio de cultura. Também aos 120 dias, a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB foi a que mais se destacou em relação ao percentual de enraizamento no experimento 2 (repicagem), com média de 26,3%. Porém, esse valor foi

inferior aos encontrados no experimento 1 (31,7 e 29,2%) para o percentual de enraizamento aos 120 dias, concluindo-se que não é indicado fazer uma repicagem na fase de enraizamento e utilizando AIB para a sucupira-preta.

O carvão ativado mostrou-se importante em relação à qualidade de brotações de sucupira-preta no presente estudo, já que proporcionou menor percentual de clorose foliar e maior percentual de plantas bem desenvolvidas do que o PVP em todas as concentrações de AIB estudadas. Disarz; Corder (2009), trabalhando com a micropropagação de acácia (*Acacia mearnsii*), observaram ausência de clorose em explantes subcultivados em meio MS com a adição de carvão ativado. O carvão ativado é um dos compostos mais utilizados para auxiliar a rizogênese *in vitro*, por possuir a capacidade de fixar auxinas, sendo, de forma geral, benéfico por promover o alongamento das raízes (Gomes, 1999). Além disso, o carvão ativado auxilia na adsorção de substâncias tóxicas como os fenóis, reguladores de crescimento em excesso que se acumulam no meio de cultura e também reduz a incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular (Bonga, 1985; Mantovani et al., 2001).

A fase de transferência das plantas estabelecidas *in vitro*, visando à aclimação e rustificação em condições *ex vitro*, constitui importante etapa na formação de mudas de qualidade, uma vez que estas são retiradas de uma condição heterotrófica para autotrófica, sofrendo estresses fisiológicos (Bandeira et al., 2007). Ao final da pré-aclimação, observou-se 100% de sobrevivência para todos os tratamentos e, aos 30 dias de aclimação em casa de vegetação, observou-se 0%, 50% e 75% de sobrevivência para os tratamentos T1, T2 e T3 respectivamente. Tratamentos de redução gradativa de umidade relativa são recomendados para aumentar a sobrevivência no transplante, já que resultam numa adaptação mais rápida dos estômatos do que em plantas transplantadas diretamente para a casa de vegetação (Grattapaglia ; Machado, 1999). No presente estudo, o número de raízes e o aspecto visual da parte aérea ao final da pré-aclimação, e a altura aos 30 dias de aclimação foram superiores quando se manteve a cobertura com o saco plástico intacto. Augusto et al. (2006) observaram que o uso de um túnel plástico na aclimação de plantas de amoreira-preta enraizadas *in vitro* levou a um maior crescimento das plantas (3,04 cm, contra 2,15 cm da câmara de nebulização).

Com base nos resultados obtidos, pôde-se estabelecer um procedimento básico de micropropagação via gemas axilares de sucupira-preta. Assim, partindo-se de segmentos cotiledonares, a indução de gemas axilares ocorre em meio de cultura WPM, suplementado com 0,3 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA, resultando em taxas médias de regeneração de

9; 2; 5 e 13 gemas axilares por explante respectivamente para o cultivo inicial e três subcultivos, em um período de 5 meses. O alongamento é satisfatório em meio de cultura WPM, acrescido de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, durante 40 dias. A indução de raízes ocorre na ausência ou em resposta às concentrações de $0,5$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, todos promovendo em torno de 30% de enraizamento em 4 meses, e a qualidade das brotações pode ser aumentada com a adição de carvão ativado ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) ao meio de cultura de enraizamento. Finalmente, o transplântio e aclimatação podem ser efetuados utilizando substrato composto por vermiculita e Bioplant e mantendo-se, primeiramente, em ambiente fechado e com cobertura plástica entorno da muda, resultando numa sobrevivência de 100% e, posteriormente, em casa de vegetação, resultando numa sobrevivência de 75%.

5. Conclusões

- Explantes obtidos de segmentos cotiledonares de sucupira-preta são indicados para a emissão de gemas axilares;
- Os melhores resultados para a multiplicação foram obtidos utilizando-se a concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP adicionada ao meio de cultura;
- Os melhores resultados no alongamento foram obtidos utilizando-se a combinação de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA com $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP adicionada ao meio de cultura;
- Os melhores resultados no enraizamento ocorreram na ausência de AIB ou em resposta às concentrações de $0,5$ e em especial $2,5 \text{ mg L}^{-1}$;
- O carvão ativado ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) adicionado ao meio de cultura de enraizamento melhorou a qualidade das brotações;
- Os melhores resultados para aclimatação de plantas de sucupira-preta produzidas *in vitro* foram obtidos mantendo-se uma cobertura plástica transparente entorno da muda na fase de pré-aclimatação.

6. Referências Bibliográficas

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A.. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1999. v.1, p. 261-296.

AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES C. A.. Enraizamento e aclimação de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 473-476, 2006.

BANDEIRA, F. S. et al.. Aclimação *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 3, n. 5, p. 773 - 781, 2007.

BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M., DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 4-35.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.87-132.

CARVALHO, P. E. R.. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v.2, 2002, 627 p..

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

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C.. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'Barrier' em diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) e

do meio Murashige e Skoog (MS). **Revista Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 367-370, 2003.

DISARZ, R.; CORDER, M. P. M.. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, v.33, n.4, p.599-606, 2009.

FERRI, M. G.; MENEZES, N. L.; MONTEIRO, W. R.. **Glossário ilustrado de botânica**. São Paulo: Nobel, 1981.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Macluratinctoria*)**. 1999. 92p. Mestrado em Fisiologia Vegetal, UFLA, Lavras, MG.

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: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.533-568.

HAMANN, A. Adventitious root formation of loblolly pine (*Pinus taeda*L.): developmental sequence and effects of maturation. **Trees**, v. 12, p. 175-180, 1998.

LIMA, Y. O. U. et al. Tipos de estacas e substratos no enraizamento de jambolão. **Nota científica da Scientia Agraria**, v.8, n.4, p.449-453, 2007.

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

LORENZI, H.. **Árvores Brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1, 4 ed.. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 384 p.

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

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

NICIOLLI, P. M.. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [Stryphnodendron adstringens (Mart.) – Coville]**. 2006, 89 p. Mestrado em Agronomia, UFLA, Lavras, MG.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P.. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (paroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.517-524, 2005.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L.. Multiplicação *in vitro* da ameixeira “Santa Rosa”: efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

STATSOFT, Inc. (2010). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L.. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrelafissilis*Vell.). **Revista Árvore**, v.27, n.3, p.351-356, 2003.

3. CONCLUSÕES GERAIS

- A escarificação de sementes e a utilização dos meios de cultura MS com 50 e a 100% e WPM com 50% dos sais e vitaminas proporcionaram os maiores percentuais de germinação *in vitro* de sucupira-preta; a germinação *in vitro* e a aclimação de plantas germinadas *in vitro* ocorreram, independentemente do histórico de aditivos ou meios de cultura utilizados; a germinação *in vitro* de sucupira-preta é um método viável para propagação da espécie e pode ser utilizada para introdução de material vegetal *in vitro* de forma asséptica e é, um processo importante para a micropropagação por meio da proliferação de gemas axilares visando a propagação e a conservação genética da espécie.
- Na micropropagação, explantes obtidos de segmentos cotiledonares de sucupira-preta são indicados para a emissão de gemas axilares; os melhores resultados para a multiplicação foram obtidos utilizando-se a concentração de 0,3 mg L⁻¹ de BAP adicionada ao meio de cultura; os melhores resultados no alongamento foram obtidos utilizando-se a combinação de 0,3 mg L⁻¹ de ANA com 0,03 mg L⁻¹ de BAP adicionada ao meio de cultura; os melhores resultados no enraizamento ocorreram na ausência de AIB ou em resposta às concentrações de 0,5 e em especial 2,5 mg L⁻¹; o carvão ativado (2,0 mg L⁻¹) adicionado ao meio de cultura de enraizamento melhorou a qualidade das brotações; os melhores resultados para aclimação de plantas de produzidas *in vitro* foram obtidos mantendo-se uma cobertura plástica transparente entorno da muda na fase de pré-aclimação.

ANEXOS

Anexo 1: Procedimento básico de micropropagação via gemas axilares para a sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*)

