

**MICROPROPAGAÇÃO DE CAIXETA, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.****MICROPROPAGATION OF CAIXETA *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.**Nilton César Mantovani<sup>1</sup> Elci T. H. Franco<sup>2</sup> Miguel P. Guerra<sup>3</sup> Juarez M. Hoppe<sup>4</sup>**RESUMO**

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo básico para a micropropagação da caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. Segmentos nodais foram desinfestados em hipoclorito de sódio 10 % por diferentes períodos de exposição, e inoculados em dois meios básicos: WPM (Lloyd & McCown, 1981) e MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados com BAP, TDZ, ANA, GA<sub>3</sub>, AIB e carvão ativado em diferentes combinações e concentrações para cada estágio de desenvolvimento. A desinfestação dos segmentos nodais com hipoclorito de sódio por 10 minutos proporcionou os melhores resultados para o estabelecimento asséptico das culturas. A maior taxa de regeneração e alongamento de brotações foi obtida com o meio WPM contendo 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP. Contudo após três subcultivos neste mesmo meio observou-se redução na taxa de multiplicação. O enraizamento das brotações foi obtido no meio WPM suplementado com 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de AIB. O processo de aclimatização possibilitou a sobrevivência das plântulas micropropagadas às condições *ex vitro*.

**Palavras-chave:** *Didymopanax morototoni*; micropropagação; cultura de tecidos vegetais.

**ABSTRACT**

This study was carried out aiming to study the *in vitro* regeneration of caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.). In order to establish a basic micropropagation protocol axillary buds and nodal segments were desinfested with sodium hypochlorite 10 % and inoculated in two basal media: WPM (Lloyd & McCown, 1981) and MS (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with BAP, TDZ, NAA, GA<sub>3</sub>, IBA and activated charcoal in different combinations and concentrations for each developmental step. The desinfestation method based on sodium hypochlorite during 10 minutes allowed the best results for the establishment of aseptic cultures in nodal segments. With these explants the regeneration rate and the shoot elongation were higher in the WPM medium containing 1,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP. However after three subcultures it was observed a reduction in the regeneration rate. The rooting of regenerated shoots was observed in a WPM

1. Engenheiro Florestal, M.Sc., Professor do Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Luterana do Brasil – ULBRA. CEP: 7700-000. Palmas. TO.
2. Bióloga, M.Sc., Professora do Departamento de Biologia. Centro de Ciências Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria. CEP: 97105-900. Santa Maria. RS.
3. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Departamento de Fitotecnia. Universidade Federal de Santa Catarina. CEP: 88010-970. Florianópolis. SC.
4. Engenheiro Florestal, M.Sc., Professor Adjunto do Departamento de Ciências Florestais. Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria. CEP: 97105-900. Santa Maria. RS.

medium supplemented with 1,0 mg.l<sup>-1</sup> IBA. The acclimatization process allowed the plantlet survival in *ex vitro* conditions.

**Key words:** *Didymopanax morototoni*; micropropagation; Plant tissue culture.

## INTRODUÇÃO

A caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch., é uma árvore da família Araliaceae, que tem despertado interesse para o uso industrial devido às boas qualidades de sua madeira. Aliada à influência humana na sua exploração, a caixeta apresenta ainda restrições na sua forma natural de reprodução através de sementes (REITZ *et al.*, 1988), e devido a estes fatores sua presença e distribuição nas florestas se faz de forma cada vez menos frequente. Características de crescimento do tronco dificultam a propagação vegetativa desta espécie através de métodos convencionais, como a estaquia e enxertia.

A micropropagação, termo sugerido por HARTMAN & KESTER (1990), compreende o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Como forma de propagação vegetativa, baseada em técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, a micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural, e também onde os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (THORPE *et al.*, 1991).

Um dos maiores benefícios desta técnica refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética, através da propagação clonal, tornando-se uma ferramenta poderosa nos programas de melhoramento florestal para a propagação massal de genótipos superiores (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Segundo MURASHIGE (1974), a micropropagação pode ser conduzida através de uma sequência de passos, ou estágios de desenvolvimento, cada um apresentando diferentes objetivos e exigências em relação à composição do meio de cultura, concentração e tipo de regulador de crescimento, e também, condições ambientais como luz, temperatura e fotoperíodo. A micropropagação, utilizando segmentos nodais como explantes, é um método direto de regeneração de plantas através da indução de crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas. Envolve o isolamento e inoculação *in vitro* de segmentos nodais contendo gemas axilares que são estimuladas a crescer dando origem a brotações, e estas por sua vez, podem ser isoladas e manipuladas como microestacas, ou multiplicadas de modo a formar tufos de novas brotações. As brotações formadas podem ser enraizadas *in vitro* ou *ex vitro* (DEBERGH & READ, 1991). Este procedimento pode originar respostas de propagação massal em progressão geométrica, sendo que, as plantas produzidas apresentam menores possibilidades de variações genéticas quando comparadas a outras técnicas que utilizam vias indiretas de regeneração (THORPE *et al.*, 1991).

Segundo BONGA (1985), por ser de manipulação relativamente fácil, principalmente devido ao tamanho do explante utilizado, e por originar plantas em geral geneticamente mais estáveis, a proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada para a micropropagação de plantas lenhosas

em larga escala.

Investigações revelaram a possibilidade de regeneração de plantas através da indução e ativação de rotas morfogênicas durante o cultivo *in vitro* de explantes foliares e radiculares da caixeta (MANTOVANI & FRANCO, 1995ab). Assim sendo, este trabalho objetivou o estabelecimento de um protocolo básico para a micropropagação da caixeta, através da indução de crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares em segmentos nodais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria - RS.

### Cultivo das plantas-fornecedoras e obtenção dos explantes

Plantas jovens de caixeta, obtidas por sementes, foram mantidas em sala de crescimento sob iluminação natural complementada por lâmpadas fluorescentes branca-frias, com intensidade luminosa de aproximadamente 500 lux por 8 horas diárias, e temperatura em torno de 25°C. O controle fitossanitário e nutricional destas plantas foi realizado através de pulverizações semanais intercaladas de fungicidas sistêmico (Benomyl) e de contato (Captan) na concentração de 2,0 g.l<sup>-1</sup>. As regas foram feitas sempre que necessário diretamente no substrato com água destilada e quinzenalmente com solução nutritiva Ouro Verde. Para indução e crescimento de brotações, efetuou-se a poda do ápice caulinar e também aplicou-se 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) através de pulverizações semanais até o início do crescimento das brotações. Os explantes foram retiradas destas brotações, e em câmara de fluxo laminar os segmentos nodais foram excisados com aproximadamente dois centímetros de comprimento, mantendo-se duas gemas axilares.

### Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram o WPM (Wood Plant Medium, elaborado por Lloyd & McCown, 1981) e MS (elaborado por MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementados com as auxinas ANA (ácido 1-naftalenoacético) e AIB (ácido indol-3-butírico), as citocininas BAP (6-benzilaminopurina) e TDZ (thidiazuron), e a giberelina GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), em concentrações e combinações variadas conforme cada teste.

A sacarose foi utilizada como fonte de carbono e adicionada aos meios de cultura na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> (20 g.l<sup>-1</sup> para o enraizamento das brotações). O Carvão Ativado (1,5 g.l<sup>-1</sup>) e o agar (5,8 - 6,0 g.l<sup>-1</sup>) foram dissolvidos por aquecimento nos meios de cultura após o ajuste do pH (5,8 com NaOH e/ou HCl 1N após a adição dos reguladores de crescimento).

Os meios de cultura foram distribuídos em tubos de ensaio com capacidade de 60 ml (15 ml/tubo) e em frascos com capacidade de 200 ml (20 ml/frasco), os quais foram tampados com papel alumínio e tampas plásticas e esterilizados em autoclave por 15 minutos à temperatura de 120°C e 1 atm de pressão.

### **Condições ambientais para crescimento das culturas**

As culturas foram mantidas em sala de incubação sob controle de temperatura a 25°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias. Para os testes de desinfestação e isolamento, as culturas permaneceram no escuro por um período inicial de sete dias, nas mesmas condições de temperatura.

### **Desinfestação de segmentos nodais**

Os segmentos nodais permaneceram em recipiente com água corrente por 30 minutos e em câmara de fluxo laminar foram imersos em álcool 70% por 2 minutos e posteriormente em hipoclorito de sódio (10%, a 2% de cloro ativo e pH ajustado para 6,5) por 5, 10, 15 e 20 minutos. Após a assepsia, os segmentos nodais foram lavados por três vezes em água destilada e autoclavada e as extremidades foram cortadas para remover o tecido danificado, e foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM sem reguladores de crescimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento e 5 tubos por parcela. A avaliação da taxa de contaminação foi efetuada aos 30 dias após a inoculação.

### **Indução de crescimento de gemas axilares**

Após a escolha do melhor tempo de desinfestação, os segmentos nodais foram desinfestados seguindo os procedimentos do teste anterior, utilizando-se álcool 70% por 2 minutos e hipoclorito de sódio 10% por 10 minutos, e em seguida inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM acrescido de BAP nas concentrações de 0,01; 0,10; 1,00 e 10,0 mg.l<sup>-1</sup>. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 8 repetições por tratamento e 5 tubos por parcela. As avaliações foram efetuadas aos 30 dias de inoculação.

### **Influência da composição do meio de cultura e do BAP na multiplicação de brotações**

Brotações com 40 dias de idade e aproximadamente 1,5 cm de comprimento, provenientes dos testes anteriores de desinfestação e indução de crescimento de gemas axilares (do tratamento sem reguladores de crescimento), foram inoculadas em frascos contendo os meios de cultura MS; WPM; MS +BAP 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, e WPM + BAP 1,0 mg.l<sup>-1</sup>. A taxa de multiplicação e o crescimento das brotações foram avaliados após dois subcultivos no mesmo meio de cultura (1 subcultivo a cada 30 dias). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento e 3 frascos com 2 brotações por parcela.

### **Efeito de reguladores de crescimento e do carvão ativado na multiplicação e qualidade de brotações**

Avaliou-se o efeito do TDZ e do BAP (1,0 mg.l<sup>-1</sup>) em combinações com ANA e GA<sub>3</sub> (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) e do carvão ativado (1,5 g.l<sup>-1</sup>), na multiplicação, alongamento e qualidade das brotações em três subcultivos no meio de cultura WPM (1 subcultivo a cada 30 dias). As brotações utilizadas foram formadas em meio WPM + BAP 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, da etapa anterior. O delineamento experimental

utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento e 5 frascos com 3 brotações por parcela.

Devido a dificuldade na determinação do número e do comprimento das folhas e das brotações, a capacidade de multiplicação, crescimento e o aspecto das brotações, foram avaliadas na forma descritiva, atribuindo-se notas conforme os seguintes critérios: (1) brotação morta; (2) ausência de brotações novas e folhas amareladas; (3) brotações novas, caules curtos e folhas verdes pequenas; (4) brotações novas, caules alongados e folhas verdes grandes (maiores que 10 mm de comprimento).

### **Enraizamento de brotações**

Brotações com aproximadamente 2 cm de altura (provenientes do teste anterior do tratamento com carvão ativado  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ ), foram inoculadas em meio WPM acrescido de carvão ativado ( $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ ) e AIB nas concentrações de 0,5; 1,0 e  $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ . O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento e 5 frascos com 3 brotações por parcela. As avaliações foram realizadas após 30 dias da inoculação.

### **Aclimatização das plântulas micropropagadas**

Após o enraizamento *in vitro*, os frascos de cultura foram destampados permanecendo na sala de incubação. Após 7 dias as plântulas foram removidas e tiveram as raízes lavadas em água corrente, e em seguida foram transferidas para copos plásticos contendo substrato esterilizado (vermiculita e solo mineral 2:1 v/v). Utilizou-se garrafas plásticas transparentes sobre cada planta para manter um ambiente úmido. Após 7 dias as plântulas foram transferidas para sala de crescimento com luz, temperatura e umidade relativa do ar em condições naturais. Neste ambiente as garrafas plásticas foram perfuradas na extremidade superior e finalmente após 7 dias foram retiradas e transferidas para viveiro florestal. Após esta etapa de aclimatização as plântulas foram transferidas para ambiente de casa de vegetação onde avaliou-se a taxa de sobrevivência.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O cultivo das plantas fornecedoras de explantes, em condições controladas foi fator fundamental para o estabelecimento *in vitro* das culturas de caixeta. Testes anteriores utilizando segmentos nodais e discos foliares destas plantas revelaram altos níveis de contaminação por fungos e bactérias, mesmo após o processo de desinfestação superficial (MANTOVANI & FRANCO, 1995b).

Segundo LEIFERT *et al.* (1991), a condição fitossanitária da planta determina a eficiência no processo de desinfestação dos explantes. A utilização de fungicidas de contato permite a eliminação ou a redução da presença de fungos exógenos, e os agentes sistêmicos como o Benomyl são indicados por apresentarem amplo espectro de ação, possibilitando o controle de fungos de natureza endógena, os quais não são expostos aos agentes utilizados na desinfestação superficial dos

explantes (HALDEMAN *et al.*, 1987).

Embora tenha sido obtida redução na ordem de 10% na contaminação dos explantes de caixeta em condições *in vitro* através das medidas adotadas, principalmente em relação à contaminação fúngica, a ocorrência de contaminação bacteriana foi verificada mesmo após o processo de desinfestação superficial dos explantes. A exata identificação destas bactérias não foi possível devido a grande variedade de gêneros encontrados em cada análise. As bactérias observadas poderiam tanto ser de origem endógena como exógena. Por esta razão, optou-se pela não utilização de antibióticos no cultivo *in vitro* da caixeta, pois o sucesso destes tratamentos depende do isolamento e da exata identificação da bactéria (LEIFERT *et al.*, 1991).

A fertilização e as aplicações de BAP estimularam o crescimento das plantas e o surgimento de brotações laterais que foram utilizadas como fontes de explantes. Estas medidas também foram utilizadas por DREW (1988) e JANKOWSKI & GRAÇA (1993), para estimular a brotação de ramos laterais em plantas de mamoeiro e canela-sassafras respectivamente, aumentando a disponibilidade e promovendo o rejuvenescimento dos explantes.

### Desinfestação de segmentos nodais

O aumento do período de exposição ao hipoclorito de sódio (10 %) reduziu consideravelmente a contaminação dos segmentos nodais de caixeta por fungos e bactérias, como pode ser visto na Figura 1.

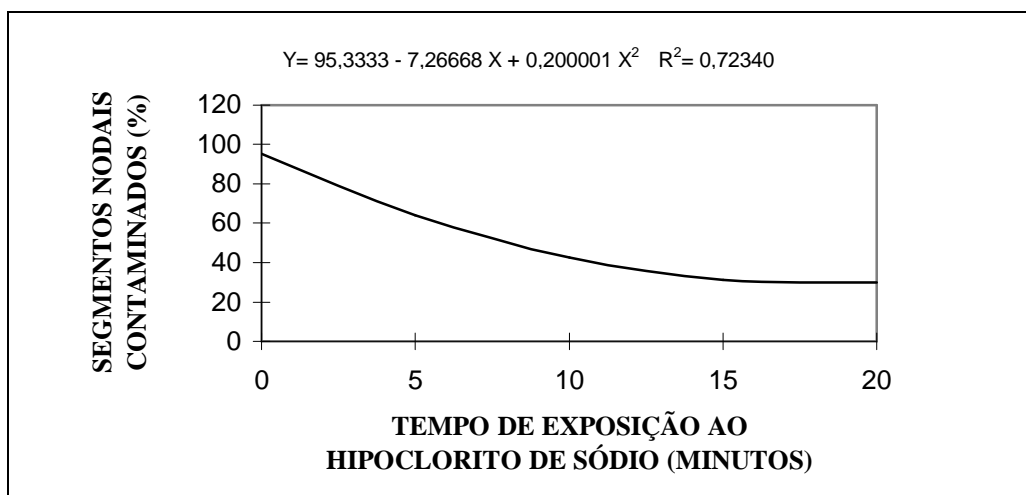


FIGURA 1: Porcentagem de segmentos nodais de caixeta (*Didymopanax morototoni*), contaminados por fungos e bactérias, após tratamentos com hipoclorito de sódio (10%), em diferentes tempos de exposição, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Em relação à testemunha, sem exposição ao hipoclorito de sódio, observou-se uma acentuada redução na contaminação, até o período de tempo de 10 minutos, sendo que a partir deste, a contaminação continuou decrescente porém não tão pronunciada. A menor porcentagem de

contaminação (30%), ocorreu no tratamento com 20 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio. A ação destes microorganismos pode inibir o desenvolvimento das culturas pela concorrência por nutrientes e produção de toxinas que modificam a composição do meio de cultura (LEIFERT *et al.*,1991).

A imersão dos segmentos nodais em hipoclorito de sódio por 15 e 20 minutos proporcionou as menores taxas de contaminação, porém danificaram os tecidos provocando escurecimento e necrose, resultando na inibição do desenvolvimento e morte dos explante.

A sobrevivência e estabelecimento dos segmentos nodais de caixeta, foi observada na ausência de contaminação e de necrose. Observa-se na Figura 2, que a maior porcentagem de explantes sobreviventes ( em torno de 53%), e conseqüentemente capazes de regenerar brotações, foi obtido no tratamento com 10 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio.

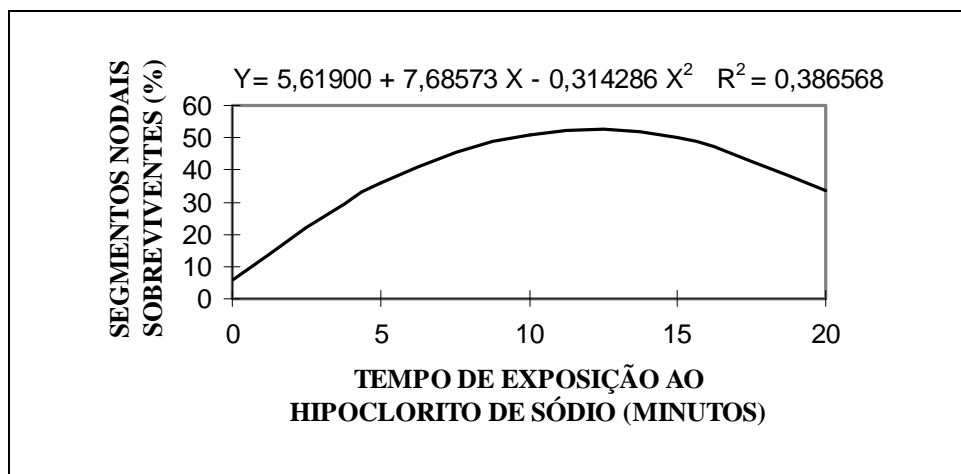


FIGURA 2: Porcentagem de segmentos nodais de caixeta (*Didymopanax morototoni*), sobreviventes, após tratamentos com hipoclorito de sódio (10%), em diferentes tempos de exposição, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

### Indução de crescimento de gemas axilares em segmentos nodais

Após 30 dias de cultivo, observou-se em todos os tratamentos o desenvolvimento das gemas axilares que formaram brotações, sendo que o número máximo foi de duas brotações por segmento nodal, uma para cada gema axilar pré-formada. A porcentagem de segmentos nodais com brotações emitidas, e também o comprimento destas, foram influenciados pela concentração do BAP. As citocininas, segundo PREECE (1995), atuam na quebra da dominância apical e na indução e crescimento de brotações em segmentos nodais.

Como pode ser visto na Tabela 1, o aumento da concentração de BAP proporcionou aumento nas respostas de indução de brotações, até a concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, onde obteve-se a maior taxa, de 87,5% de segmentos nodais com gemas axilares induzidas formando brotações. Na

concentração de 10 mg.l<sup>-1</sup> este resultado diminuiu para 52,5%.

O mesmo comportamento foi verificado em relação ao comprimento médio das brotações formadas. O BAP estimulou o alongamento das brotações, até a concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, onde obteve-se a média de 1,90 cm. Porém, na concentração de 10,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP houve inibição do crescimento, originando brotações com tamanhos menores do que aquelas formadas nos segmentos nodais da testemunha. A sensibilidade a níveis elevados do BAP foi identificada da mesma forma por PINTO *et al.* (1994), em segmentos nodais de *Kielmeyera coriacea*, onde concentrações desta citocinina, acima de 8 mg.l<sup>-1</sup> provocaram a formação de brotações anormais e de menor tamanho.

TABELA 1: Porcentagem de segmentos nodais de caixeta (*Didymopanax morototoni*) com brotações emitidas e comprimento médio das brotações em função das concentrações de BAP, após 30 dias de cultivo *in vitro*

Tratamentos (BAP mg.l <sup>-1</sup> )	Segmentos nodais com brotações (%)	Comprimento médio das brotações (cm)
Testemunha	32,5 c	1,35 bc
0,01	50,0 bc	1,38 bc
0,10	65,0 ab	1,81 ab
1,00	87,5 a*	1,90 a
10,00	52,5 bc	0,89 c
C.V. (%)	31,73	24,18

Médias não seguidas por mesma letra diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Verificou-se que alta concentração de BAP (10,0 mg.l<sup>-1</sup>), provocou a formação de brotações atípicas de caixeta, com entrenós curtos e com folhas curvadas, espessas, quebradiças e de tamanho reduzido. Segundo ZIV (1991), estes sintomas são provocados por desordens fisiológicas, denominadas de vitrificação, que ocorrem frequentemente na cultura *in vitro* de muitas espécies, e são atribuídas principalmente ao excesso de citocininas nos meios de cultura.

### Influência da composição do meio de cultura e do BAP na multiplicação de brotações

Pode-se observar, pelos dados apresentados na Tabela 2, que o meio WPM proporcionou os melhores resultados de multiplicação de brotações de caixeta quando comparado ao meio MS. Na ausência da citocinina, o meio WPM proporcionou maior porcentagem de explantes com novas brotações (36,7%) em relação ao meio MS (18,3%). Da mesma forma, a porcentagem de brotações com folhas maiores que 10 mm de comprimento, foi maior no meio WPM (50,0%) do que no meio MS (18,2%).

A adição de BAP (1,0 mg.l<sup>-1</sup>) aos meios proporcionou aumento na porcentagem de explantes com novas brotações e também maior expansão foliar. O meio WPM + BAP (1,0 mg.l<sup>-1</sup>) foi o tratamento que induziu as maiores porcentagens de explantes com formação de novas brotações (80%), e de novas brotações com folhas maiores que 10 mm de comprimento (75,0%). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por BIASI (1993), e também, por PINTO *et al.* (1994), na multiplicação de abacateiro e *Kielmeyera coriacea*, respectivamente



As citocininas tem função primordial na divisão celular e podem estar envolvidas na síntese de proteínas, fundamental ao processo de mitose, e atuam também, na quebra da dominância apical e na indução e crescimento de brotações (PREECE, 1995).

TABELA 2: Porcentagem de explantes de caixeta (*Didymopanax morototoni*) com novas brotações, e brotações com folhas maiores que 10 mm de comprimento, em função da composição do meio de cultura e do BAP (1,0 mg.L<sup>-1</sup>), após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Explantes com novas brotações (%)	Brotações novas com folhas maiores que 10mm de comprimento (%)
MS	18,3 b	18,2 c
WPM	36,7 b	50,0 b
MS + BAP	38,3 b	39,1 bc
WPM + BAP	80,0 a*	75,0 a
C.V. (%)	39,6	42,7

Médias não seguidas por mesma letra diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Embora o BAP seja utilizado na maioria dos sistemas experimentais *in vitro*, verifica-se às vezes, que as culturas apresentam diferentes sensibilidades a esta citocinina dependendo do meio de cultura utilizado. DESCHAMPS (1993), observou que as brotações de sarandi apresentaram um maior desenvolvimento em meio WPM sem reguladores de crescimento, e que a adição de BAP foi responsável pela redução do número de folhas por explante e também pela redução do comprimento das brotações. NANNETTI & PINTO (1995), verificaram a necessidade de diferentes concentrações de citocininas para diferentes níveis de nitrogênio e cálcio para o desenvolvimento de brotações de *Heliconia sp.* RAGHAVA *et al.* (1992), compararam diferentes diluições do meio MS com o meio WPM acrescidos de diferentes reguladores de crescimento, e observaram que a composição e a concentração dos nutrientes no meio de cultura influenciaram no requerimento de diferentes concentrações de reguladores de crescimento para a mesma espécie. Segundo PREECE (1995), no meio MS completo foi necessário somente um quarto da concentração de TDZ para induzir o mesmo resultado que foi obtido com MS diluído à metade das suas concentrações de sais. De fato, o meio nutritivo pode afetar a resposta do explante ao regulador de crescimento. MURASHIGE & SKOOG (1962), quando publicaram a formulação do meio MS, chamaram a atenção para a interrelação entre os sais inorgânicos e os reguladores de crescimento no meio de cultura. Esta interação entre nutrientes e reguladores de crescimento pode, em parte, explicar as diferenças na capacidade de multiplicação de brotações e no desenvolvimento das folhas de caixeta. A menor concentração de sais do meio WPM, em relação ao meio MS, induziu melhores resultados tanto na ausência como na presença do BAP, sendo que na presença desta citocinina o número de brotações novas foi estatisticamente mais elevado que quando na ausência de BAP (Tabela 2).

### Efeito de reguladores de crescimento e do carvão ativado na multiplicação e qualidade de brotações

Como pode-se observar na Tabela 3, os tratamentos contendo BAP proporcionaram um

maior número de novas brotações, desenvolvimento e também maior tamanho das folhas quando comparados aos tratamentos contendo TDZ, da mesma forma que os tratamentos contendo GA<sub>3</sub> em comparação aos tratamentos contendo ANA. A combinação de TDZ e GA<sub>3</sub> proporcionou a formação de brotações novas porém com caules curtos e folhas verdes pequenas, obtendo a nota 2,00 segundo os critérios adotados, enquanto que na combinação de TDZ e ANA não ocorreu formação de novas brotações, e aquelas já formadas amarelaram e não apresentaram nenhum desenvolvimento após os três subcultivos, obtendo a nota 1,48. O mesmo comportamento foi verificado em relação ao BAP. A presença de GA<sub>3</sub> promoveu a formação de brotações novas mais desenvolvidas quando comparadas às brotações formadas na presença de ANA. Desta forma, a média das notas atribuídas aos critérios de avaliação foi 2,34 para o tratamento contendo BAP e GA<sub>3</sub> e 1,78 para o tratamento contendo BAP e ANA.

TABELA 3: Média das notas atribuídas aos critérios de avaliação de multiplicação, crescimento e aspecto das brotações de caixeta (*Didymopanax morototoni*) em resposta ao TDZ, BAP, ANA, GA<sub>3</sub> e Carvão Ativado em meio de cultura WPM, após 90 dias em três subcultivos *in vitro*.

Tratamentos	Médias das notas das avaliações de multiplicação
TDZ 1,0 mg.l <sup>-1</sup> + ANA 0,1 mg.l <sup>-1</sup>	1,48 b
TDZ 1,0 mg.l <sup>-1</sup> + GA <sub>3</sub> 0,1mg.l <sup>-1</sup>	2,00 b
BAP 1,0 mg.l <sup>-1</sup> + ANA 0,1 mg.l <sup>-1</sup>	1,78 b
BAP 1,0 mg.l <sup>-1</sup> + GA <sub>3</sub> 0,1mg.l <sup>-1</sup>	2,34 b
C.A. 1,5 g.l <sup>-1</sup>	3,92 a

Médias não seguidas por mesma letra diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.

A multiplicação, crescimento e qualidade das brotações nos tratamentos contendo reguladores de crescimento foram inferiores àquelas observadas no tratamento contendo apenas carvão ativado. Este fato deve-se, provavelmente, à interação entre as citocininas exógenas, utilizadas neste teste, com os níveis endógenos de reguladores de crescimento, principalmente de citocininas, já que as brotações utilizadas foram provenientes do tratamento com BAP 1,0 mg.l<sup>-1</sup> do teste anterior. Desta forma, a soma dos níveis endógenos com a concentração de citocininas presentes no meio de cultura pode ter provocado toxidez, resultando em um efeito inibitório da multiplicação das brotações, mesmo após três subcultivos

Alguns tipos de explantes exibem alto potencial regenerativo no início do cultivo, no entanto este potencial pode gradualmente declinar à medida dos subcultivos. Segundo NARAYANASWAMY (1977), a toxidez causada pelo excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta aos reguladores de crescimento, podem provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas resultando na redução da taxa de multiplicação. Estes efeitos residuais de citocininas causam ainda, o encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento. Segundo DEBERGH & READ (1991), o alongamento dos eixos caulinares e a redução dos efeitos residuais das citocininas, podem às vezes ser obtidos com a utilização de

reguladores de crescimento do grupo das giberelinas e auxinas como também a utilização de carvão ativado no meio de cultura.

As brotações de caixeta, quando cultivadas na presença de carvão ativado apresentaram brotações novas com folhas verdes grandes, geralmente maiores que 10 mm de comprimento, e caules alongados que permitiram a individualização das brotações para posterior enraizamento. Este efeito positivo do carvão ativado na multiplicação, deve-se a sua ação na adsorção do excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura (BONGA, 1985).

### Enraizamento de brotações

Nas diferentes concentrações utilizadas, o AIB induziu a formação de raízes, sendo que com  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ , aproximadamente 45% das brotações enraizaram. Aumentando-se esta concentração para  $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , houve um decréscimo na porcentagem de brotações enraizadas ( Figura 3). Comportamento semelhante, em relação a porcentagem de enraizamento, dependente da concentração de AIB foi observado por PINEDO *et al.* (1990), e PAULA (1992), no enraizamento de brotações de *Eucalyptus citriodora* e erva-mate, respectivamente.

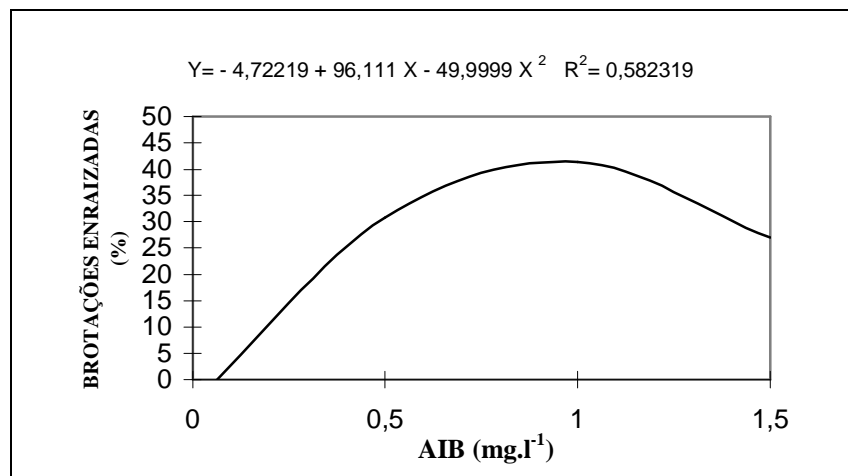


FIGURA 3: Porcentagem de brotações de caixeta (*Didymopanax morototoni*), enraizadas, após tratamento com AIB em diferentes concentrações, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

O número médio de raízes por brotação foi influenciado pela concentração do AIB presente no meio de cultura. O aumento da concentração da auxina, foi acompanhado pelo aumento do número de raízes emitidas por brotação de caixeta, até a concentração de  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ , sendo que a partir desta, o número médio de raízes por brotação diminuiu (Figura 4).

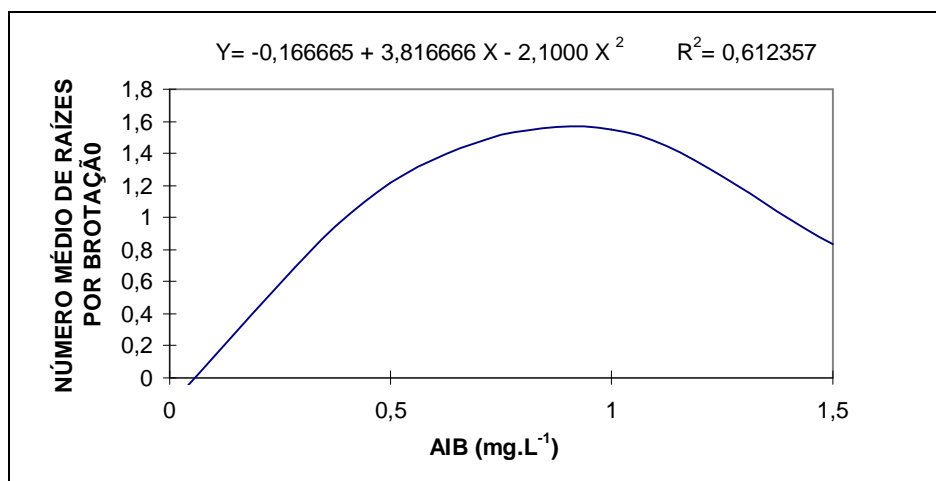


FIGURA 4: Número médio de raízes em brotações de caixeta (*Didymopanax morototoni*), após tratamento com AIB em diferentes concentrações, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

### Aclimatização das plântulas micropropagadas

O processo utilizado para a aclimatização das plântulas regeneradas *in vitro* foi fundamental para a sobrevivência destas quando transferidas para viveiro florestal. A taxa de sobrevivência foi em torno de 65% quando as plântulas eram aclimatizadas, e nula quando estas eram retiradas dos frascos e plantadas diretamente no substrato sem cobertura úmida e após transferidas para viveiro.

Segundo DÍAZ-PÉREZ *et al.* (1995), durante o processo de aclimatização ocorre a conversão da condição heterotrófica para autotrófica e um gradual retorno às características naturais da planta. As novas folhas formadas durante este processo já apresentam características intermediárias entre aquelas apresentadas *in vitro* e *ex vitro*, com mudanças na morfologia, redução na condutância estomatal, incremento no conteúdo de clorofila e maior eficiência na carboxilação.

### CONCLUSÕES

- o cultivo das plantas de caixeta, fornecedoras de explantes, em condições controladas de fitossanidade e nutricional, aumentou a obtenção de explantes capazes de responder às condições de cultivo *in vitro*;

- o processo de desinfestação superficial foi mais efetivo com a utilização do hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos, possibilitando a obtenção do maior número de segmentos nodais livres de patógenos contaminantes e também de maior sobrevivência destes;

- o desenvolvimento de gemas axilares em segmentos nodais, foi estimulado pela presença do BAP no meio de cultura. A concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> desta citocinina proporcionou maior número de segmentos nodais com brotações de gemas, e também maior alongamento destas, no entanto, na concentração de 10,0 mg.l<sup>-1</sup>, o BAP foi responsável pela vitrificação das brotações;

- o WPM foi o melhor meio de cultura para a multiplicação de brotações de caixeta, quando em comparação ao meio MS. A adição de BAP 1,0 mg.l<sup>-1</sup> ao meio WPM proporcionou maiores taxas de multiplicação e também maior expansão foliar quando comparado ao TDZ adicionado a este mesmo meio. No entanto, as brotações de caixeta mostraram-se sensíveis aos reguladores de crescimento TDZ e BAP (1,0 mg.l<sup>-1</sup>) após três subcultivos, demonstrando que um processo cumulativo de citocinina foi responsável pela redução das taxas de multiplicação;

- o maior índice de enraizamento foi obtido com 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de AIB;

- o processo de aclimatização (através da abertura gradual dos frascos de cultura, lavagem das raízes em água corrente, utilização de substrato esterilizado e cobertura das plântulas com garrafas plásticas transparentes), mostrou-se eficiente para a sobrevivência das plântulas de caixeta regeneradas *in vitro*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos evidenciam a possibilidade de regeneração *in vitro* de caixeta através de segmentos nodais, utilizando como protocolo básico os estágios de controle fitossanitário e nutricional das plantas fornecedoras de explantes, desinfestação superficial dos segmentos nodais, indução de crescimento das gemas axilares, multiplicação e enraizamento das brotações e por fim, aclimatização das plântulas regeneradas:

Para melhor viabilizar o sistema regenerativo baseado na indução de crescimento e proliferação de gemas axilares em segmentos nodais de caixeta, determinados aspectos, em termos de composição do meio de cultura, tipo e balanço dos reguladores de crescimento, período e número de subcultivos, e também condições físicas como luz, temperatura, fotoperíodo e tipo de frasco de cultura, necessitam ser otimizados em função das necessidades específicas de cada estágio de desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIASI, L. A. **Micropropagação do abacateiro ouro verde através da cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de discos foliares**. Porto Alegre: URGs, 1993. 163p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M., DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 4-35.
- DEBERGH, P. C., READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 1-13.
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa *in vitro* de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL.**

- ARG.**), espécie florestal de mata ciliar. Lavras: ESAL, 1993. 128p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1993.
- DÍAZ-PÉREZ, J., SHACKEL, K. A., SUTTER, E. G. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microculture apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 9, p. 225-232, 1995.
- DREW, R. A. Rapid clonal propagation *in vitro* from mature field-grown trees. **Hort. Sci.**, v. 23, p. 609-611, 1988.
- GEORGE, E. F., SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Eastern Press, 1984. 709p.
- HALDEMANN, J. H., THOMAS, R. L., McKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **Scientia Horticult.**, v. 22, p.306-307, 1987.
- HARTMANN, T. H., KESTER, D. E., DAVIES, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall., 1990. 647p.
- JANKOWSKY, A., GRAÇA, M. E. C. Obtenção de brotações epicórnicas de canela-sassafras (*Ocotea odorifera* (VELLOZO) RHOWER) para cultivo *in vitro*. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1. e CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1993. p.764.
- LEIFERT, C., RITCHIE, J. Y., WAITES, W. M. Contaminants of plant tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 452-469, 1991.
- LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v.30, p.421-327, 1981.
- MANTOVANI, N. C., FRANCO, E. T. H. Respostas morfogênicas de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch em cultivo *in vitro*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46., 1995a, Ribeirão Preto. **Anais ...** Ribeirão Preto, 1995a. p.275.
- \_\_\_\_\_. Influência de diferentes explantes e meios de cultura na micropropagação de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995b, Lavras. **Anais ...** Lavras, 1995b. p. 170.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- \_\_\_\_\_. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Ver. Plant. Physiok.**, v.25, p. 135-166, 1974.
- NANNETTI, D. C., PINTO, J. E. B. P. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio e cálcio combinados com BAP e TDZ no desenvolvimento de *Heliconia* sp. *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais ...** Lavras, 1995a. p. 144.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin:

Springer Verlag, 1977. p.179-248.

- PAULA, S. R. de. **Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e comparação das folhas de plantas *in vitro* com as originadas em casa de vegetação.** Curitiba: UFPR, 1992. 74 p. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1992.
- PINEDO, D. N. H., GRAÇA, M. E. C., ARAÚJO, A. J. Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão, 1990. p.361-372.
- PINTO, J. E. B. P., ARELLO, E. F., PINTO, C. A. B. P. *et al.* Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.29, n.6, p.867-873, 1994.
- PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant tissue culture and biotechnology**, n. 1, v.1, p.26-37, 1995.
- \_\_\_\_\_. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Rev. Plant. Physiol.**, v. 25, p. 135-166, 1974.
- RAGHAVA SWAMY, B. V., HIMABINDU, K., LAKSHMI SITA, G. In vitro micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, 1992. p. 126-131,
- REITZ, R., KLEIN, M., REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Companhia Rio-Grandense de Artes Gráficas, 1988. 525 p.
- THORPE, T. A., HARRY, I. S., KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application.** Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 49-69.