

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PROPAGAÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA EM PLANTAS NATIVAS COM
POTENCIAL ORNAMENTAL

Bolsista: Lorena de Paula Cabral, CNPq

MANAUS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PIB - B - /0056/2011

PROPAGAÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA EM PLANTAS COM POTENCIAL
ORNAMENTAL

Bolsista: Lorena de Paula Cabral, CNPq

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eva Maria Alves Cavalcanti Atroch.

MANAUS

2012

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Síntese dos experimentos de propagação vegetativa.....	10
Quadro 2: Síntese dos experimentos de macropropagação.....	11
Quadro 3: Tratamentos Assépticos testados em <i>Paullinia stipularis</i> , <i>Paullinia cupana</i> e <i>Psychotria rosea</i>	13
Quadro 4: Síntese das atividades da Etapa A apresentando a identificação das famílias, o hábito da planta, a condição fenológica na ocasião das excursões ao campo, e a situação da propagação.....	14
Quadro 5: Análise de variância do efeito de sete tratamentos de assepsia sobre a ocorrência de contaminação por fungos, bactérias, oxidação, brotação e sobrevivência em explantes de segmentos nodais de <i>Paulinia cupana</i> , <i>Paulinia stipularis</i> e <i>Psychotria rosea</i> . Sendo os tratamentos, T1: fungicida + álcool + hipoclorito de sódio; T2: fungicida + álcool + cloreto de mercúrio; T3: lavagem em água + álcool + hipoclorito de sódio; T4: lavagem em água + álcool + cloreto de mercúrio; T5: fungicida + álcool 70%; T6: lavagem em água + álcool 70%; T7: lavagem em água.....	16
Tabela 1: Porcentagem de sobrevivência (Sobrev.), enraizamento (R), e brotações (Brot) em plântulas de <i>Cattleya</i> sp avaliadas nos intervalos de 30, 60 e 90 dias, em meio de cultura de MS (1962) com variação no teor de sacarose: T1(100%), T2 (50%), T3 (25%) e T (0%). Média de 05 repetições de 20 plântulas.....	17

SUMÁRIO

1. Introdução.....	05
2. Material e Métodos.....	09
Local de desenvolvimento das atividades e material vegetal.....	09
2.1.Planejamento das atividades de coleta e propagação.....	09
2.1.1. Desenvolvimento da etapa A.....	10
2.1.1.1.Seleção, identificação e coleta de material biológico.....	10
2.1.1.2.Registro da condição fenológica na ocasião da coleta de material biológico.....	11
2.1.2. Desenvolvimento da etapa B.....	11
3. Resultados.....	14
3.1. Etapa A: Seleção, identificação e coleta de material biológico.....	14
3.2. Etapa B: Propagação.....	15
4. Discussão.....	18
5. Conclusão.....	23
6. Referências.....	24

1. Introdução

A produção vegetal requer o domínio dos processos de propagação que proporcionem um grande número de mudas. Neste sentido é fundamental conhecer as características das formas de propagação da espécie, via sementes e vegetativa, para investir em tecnologias que assegurem produção em escala.

Em se tratando de plantas nativas, é essencial que os procedimentos de propagação sejam também norteados pela necessidade da conservação das espécies em questão, de forma a proteger os indivíduos de ocorrência natural de uma coleta excessiva de ramos, frutos ou sementes. Também é um fator limitante a dificuldade, de diferentes naturezas, ao acesso do material para propagação. Por isso buscou-se neste trabalho avaliar as possibilidades de várias técnicas de propagação associando-se às técnicas convencionais, como a germinação de sementes e o enraizamento de estacas de ramos, à micropropagação *in vitro*. A ideia foi maximizar a multiplicação dos propágulos, para diminuir a pressão das coletas na planta matriz. Esta concepção de trabalho se aplicou principalmente às espécies *Psychotria rosea* (Rubiaceae), *Miconia cf. phanerostila* (Melastomataceae), *Stigmaphyllon* sp (Malpighiaceae), *Paullinia cupana* var. *sorbilis* e *Paullinia stipularis* (Sapindaceae). Por outro lado, a propagação *in vitro* de orquídeas, como em *Cattleya eldorado*, utiliza como material inicial numerosos protocormos presentes nos frutos dessa planta.

Ao se tratar de espécies nativas, que expressem características de interesse para utilização nos mais diversos fins, coloca-se como etapa inicial a necessidade de procedimentos de domesticação, destacando-se o domínio das formas de propagação (Tombolato et al, 2004). Esta fase abrange também o acompanhamento da fenologia da

planta, no sentido de definir a época adequada de coleta dos diferentes tipos de propágulos. Além desses aspectos, importa salientar o grande número de fatores que podem interferir no sucesso da propagação vegetativa, principalmente por estaquia de ramos, como a natureza da estaca, o balanço entre inibidores e promotores de enraizamento, a disponibilidade de recursos como carboidratos e aminoácidos, entre outros (Davies e Hartmann, 1988). Na macropropagação o surgimento de raízes adventícias é o evento crucial para o estabelecimento ou “pegamento” da estaca. Para este fim utilizam-se principalmente substâncias da classe das auxinas, e entre estas o ácido indolil butírico (AIB) devido a sua estabilidade frente à luz e ao sistema AIA-oxidase, e baixa toxicidade (Alvarenga e Carvalho, 1983; Hartmann et al., 2002).

Em relação à micropropagação, também são considerados um grande número de fatores que influenciam a regeneração de plantas *in vitro*. De maneira que, em geral, organizam-se as etapas da micropropagação em três estágios: (I) seleção dos explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; (II) multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio adequado para multiplicação; (III) transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e posterior transplantio para substrato ou solo. Contudo, salienta-se a importância do tratamento dedicado à planta matriz, que se constitui no estágio zero (Grattapaglia e Machado, 1998)

Em geral, segmentos nodais são os explantes mais frequentemente utilizados na micropropagação. Neste material, a desinfestação se constitui no primeiro desafio para o estabelecimento do cultivo. Para vencê-lo utiliza-se de substâncias como hipoclorito de sódio e cálcio, etanol, antibióticos e fungicidas. Com menor frequência também são usados o cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio e peróxido de hidrogênio (Grattapaglia e Machado, 1998). Em muitos casos há necessidade da

combinação de várias substâncias desinfestantes antes da inoculação e, algumas vezes, até mesmo a adição destas ao meio, para controle efetivo da contaminação (Barrueto Cid e Zimmermann, 2006).

A dificuldade de desinfestação, que se coloca no estabelecimento de muitas espécies *in vitro*, poderá ser minimizada com a redução, e mesmo exclusão da sacarose do meio de cultura, no início do cultivo. Esta possibilidade abre perspectivas não somente para o sucesso da assepsia, mas também para estabelecer condições autotróficas para o cultivo. Apesar da importância da sacarose no meio para sobrevivência da planta, sua presença também resulta em distúrbios fisiológicos que se refletem, sobretudo, durante a aclimatização.

A ocorrência de oxidação de compostos fenólicos, que são liberados pelas células danificadas pelo corte, principalmente em espécies lenhosas se constitui também em um desafio para o estabelecimento dos explantes (Grattapaglia e Machado, 1998). O controle da oxidação pode ser efetuado com algumas medidas como lavagem abundante do explante, utilização de substâncias antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado, adicionadas ao meio ou na forma de banho (Grattapaglia e Machado, 1998).

O sucesso da micropropagação está associado à capacidade de respostas morfogénicas *in vitro*. Para tal concorrem vários fatores como as características do explante e as condições de cultivo, principalmente quanto à constituição do meio de cultura. Estes são em geral constituídos por água, macro e microelementos minerais, uma fonte de carboidrato, frequentemente a sacarose, e outras substâncias orgânicas como as vitaminas. Existem diversas formulações de meios básicos, contudo o meio de Murashige e Skoog (1962), bem como suas modificações e diluições vêm sendo utilizadas com sucesso em várias espécies (Pasqual et al., 1998).

Para indução de respostas morfogênicas, em geral, adicionam-se reguladores de crescimento ao meio e, embora substâncias das variadas classes de fitormônios sejam utilizadas (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno), são adicionadas com maior frequência substâncias das classes das auxinas e citocininas. Nestas classes são comumente empregados o ácido indolil butírico (AIB), e benzil amino purina (BAP), respectivamente. (Grattapaglia e Machado, 1998).

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para propagação vegetativa via macropropagação (Malpighiaceae, Menispermaceae, Melastomataceae e Fabaceae), e micropropagação em *Psychotria rosea* (Rubiaceae), *Paullinia cupana* var *sorbilis*, e *Paullinia stipularis* (Sapindaceae).

2. Material e Métodos

2.1. Local de desenvolvimento das atividades e material vegetal

As excursões para observação e coleta de material vegetal das famílias Malpighiaceae, Menispermaceae, Fabaceae e Melastomataceae ocorreram no campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

O material para micropropagação de *Psychotria rosea* (Rubiaceae) e *Paullinia stipularis* (Sapindaceae) foram provenientes de mudas obtidas a partir da coleta de sementes no campus, em ocasião anterior a este projeto. De forma semelhante, as mudas de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Sapindaceae) foram obtidas de sementes cedidas pela Embrapa Amazônia Ocidental.

Para micropropagação de *Cattleya* sp foram utilizadas plântulas já estabelecidas *in vitro* no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Ufam.

2.2. Planejamento das atividades de coleta e propagação

Estas atividades foram organizadas em três etapas que compreendem:

A) Seleção da planta: realizada a partir de observações a campo de plantas com aspecto bonito e harmonioso, principalmente quanto às características: cor e forma de flores e/ou folhas, e porte (harmonia entre altura e estrutura da copa).

B) Procedimentos para propagação: levantamento, seleção, registro da fase fenológica e coleta de material propagativo, no campus da UFAM, para compor experimentos de propagação assexuada, via estaca e micropropagação, e propagação sexuada via sementes. A propagação assexuada conta com experimentos de macropropagação (B1 e B2), e micropropagação (B3e B4), conforme descrição abaixo:

Quadro 1. Síntese dos experimentos de propagação vegetativa

Espécie	Macropropagação		Micropropagação	
	B1:estacas caulinares Sem microamb.	B2:estacas caulinares Com microamb. *	B3 Microes tacas	B4 plântulas
<i>Stigmaphyllon</i> sp				
Fabaceae				
Menispermaceae				
<i>Paullinia stipularis</i>				
<i>Paullinia cupana</i>				
<i>Psychotria rosea</i>				
<i>Cattleya</i> sp				

*Para adaptação de um microambiente com elevada umidade do ar, cada recipiente foi envolvido por saco plástico transparente.

2.1.1. Desenvolvimento da Etapa A

2.1.1.1. Seleção, identificação e coleta de material biológico

As espécies foram selecionadas utilizando-se como critérios, o aspecto ornamental apresentado por suas flores, frutos ou estrutura vegetativa, bem como o acesso ao material propagativo, sejam ramos ou sementes. Após a seleção foram marcadas com fita de rafia e referenciadas para posterior localização.

A identificação das espécies está sendo realizada com o auxílio de uma parataxonomista e do Guia da Flora da Reserva Ducke (Ribeiro et al., 1999), e o material testemunho será posteriormente levado, ao herbário da UFAM e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA para confirmação da identificação.

Os segmentos caulinares coletados foram obtidos de, no mínimo, dois indivíduos diferentes. Nas excursões de campo foram coletados, no mínimo, dois jogos de ramos

com folhas e flores e/ou frutos de aproximadamente para confecção de exsicata para registro e depósito no Herbário da UFAM.

2.1.1.2.Registro da condição fenológica na ocasião da coleta de material biológico

Durante a coleta de material para propagação foram feitos registros da fase fenológica apenas quanto à ocorrência de estágio vegetativo ou reprodutivo (presença de flores e/ou frutos) (Quadro 1).

2.1.2. Desenvolvimento da Etapa B

Macropropagação por meio de estacas de ramos vegetativos em *Stigmaphyllon* sp (Malpighiaceae), sem adaptação de microambiente (**B1**) e com adaptação de microambiente em plantas de *Stigmaphyllon* sp, Fabaceae e Menispermaceae (**B2**).

Quadro 2. Síntese dos tratamentos de macropropagação.

Esp	Cond. Cultivo	Tratamentos com AIB (gL ⁻¹)				
		0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
<i>Stig. sp</i>	S/microamb.					
<i>Stig. sp</i>	C/microamb.					
Fabaceae	C/microamb.					
Menisperm.	C/microamb.					

No experimento sem adaptação de microambiente (**B1**), ramos vegetativos de *Stigmaphyllon* sp foram coletados para obtenção das estacas, no período da manhã. *In situ*, tais ramos foram seccionados em estacas (15 cm), e no laboratório foram tratadas com fungicida Cuprocarb[®] (Oxicloreto de cobre), na concentração de 2 gL⁻¹ durante 01 h. As bases das estacas foram tratadas com as soluções de AIB por 10 minutos e, em seguida, plantadas em tubetes contendo terra preta úmida. Foram cobertas na primeira semana por sacos plásticos para evitar desidratação. Diariamente foi avaliada a

sobrevivência das estacas, e o surgimento de raízes após 60 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem.

No experimento com adaptação de microambiente (**B2**), as estacas caulinares de *Stigmaphyllon* sp (Malpighiaceae), Fabaceae e Menispermaceae, foram preparadas de forma semelhante ao experimento anterior, entretanto, após serem tratadas com as soluções de AIB, foram plantas em recipiente contendo substrato úmido composto por areia e vermiculita (1:1). Para adaptação de um microambiente com elevada umidade do ar, cada recipiente foi envolvido por saco plástico transparente.

O experimento foi acompanhado semanalmente por 30 dias, e durante este período foi observada a ocorrência de fungos, turgescência das folhas, sobrevivência e emissão de raízes.

Os experimentos foram organizados em delineamento experimental inteiramente casualizado, em que os tratamentos se constituíram nos níveis do regulador AIB e dez repetições, sendo cada repetição constituída por uma estaca.

B3. Micropropagação: Assepsia em segmentos nodais de *Paullinia stipularis*, *Paullinia cupana* e *Psychotria rosea*.

As plantas matrizes de *Paullinia cupana* e *Paullinia stipularis* foram mudas provenientes de sementes com 24 meses de idade, e em média 05 pares de folhas, enquanto as mudas de *Psychotria rosea* estavam com 08 meses, e em média 3-4 pares de folhas. Para melhorar as condições fitossanitárias a rega foi feita diretamente no pé de cada muda para que sua parte aérea não fosse molhada. Durante 30 dias as plantas receberam duas adubações quinzenais, com solução nutritiva feita a partir dos sais do meio de MS (1962). Junto a este procedimento, foram feitas pulverizações de solução com o fungicida sistêmico Amistar® (0,5%).

A coleta foi realizada por meio da decape da parte apical das mudas, deixando-se as minicepas com aproximadamente 04 cm de altura. As minicepas de *Psychotria rosea* estão sendo avaliadas quanto à capacidade de rebrota.

Após a coleta, o material foi levado ao laboratório onde se realizou os procedimentos iniciais de limpeza com remoção de todas as folhas, e lavagem com detergente neutro utilizando-se uma escova com cerdas macias, e água corrente. Em seguida o material foi separado para aplicação dos seguintes tratamentos de assepsia:

Quadro 3: Tratamentos Assépticos testados em *Paullinia stipularis*, *Paullinia cupana* e *Psychotria rosea*

Tratamentos	Constituição
T1	Fungicida amistar® 0,5% (2h) + Álcool 70% (1 min) + Hipoclorito de sódio 1% (5 min em <i>Paullinia stipularis</i> e <i>Paullinia cupana</i> e 2min em <i>Psychotria rosea</i>)
T2	Fungicida amistar® 0,5% (2h) + Álcool 70% (1 min) + Cloreto de Mercúrio 0,1% (10 min)
T3	Água (2h) + Álcool 70% (1 min) + Hipoclorito de sódio 1% (5 min em <i>Paullinia stipularis</i> e <i>Paullinia cupana</i> e 2min em <i>Psychotria rosea</i>)
T4	Água (2h) + Álcool 70% (1 min) + Cloreto de Mercúrio 0,1% (10 min)
T5	Fungicida amistar® 0,5% (2h) + Álcool 70% (1 min)
T6	Água (2h) + Álcool 70% (1 min)
T7	Somente imersão em água (2h)

Após cada imersão, os segmentos nodais com um par de gemas, foram lavados por três vezes com água destilada autoclavada, e então inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura de MS (1962) com metade da força iônica ($\frac{1}{2}$ MS), sem sacarose, acrescido de $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de Agrimicina® (oxitetraciclina e estreptomicina) e 1 gL^{-1} de Benlate® (benomyl). Os meios foram gelificados com agar ($6,0 \text{ gL}^{-1}$) e o pH ajustado para 5,8 . Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Os experimentos foram avaliados após 15 dias de inoculação observando-se a ocorrência de contaminação por fungos e bactérias, de oxidação, de sobrevivência, e o número de brotações dos explantes.

B4: Micropropagação de *Cattleya* sp: desenvolvimento de autotrofia *in vitro*

As plântulas foram avaliadas em intervalos de 30 dias até atingirem 90 dias nos tratamentos de redução do teor de sacarose no meio de MS (1962). Nestes intervalos foram avaliados a porcentagem de sobrevivência, surgimento de raízes e de brotações, para visualização da capacidade das plantas se adaptarem à variação nos teores de sacarose. O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos, teores de sacarose (100, 50, 25 e 0%), e cinco repetições de vinte tubos de ensaio contendo uma plântula.

Os resultados foram expressos em porcentagem.

3. Resultados

3.1. Etapa A: Seleção, identificação e coleta de material biológico

Quadro 4. Síntese das atividades da Etapa A apresentando a identificação das famílias, o hábito da planta, a condição fenológica na ocasião das excursões ao campo, e a situação da propagação.

Ordem da excursão	Famílias coletadas e situação de identificação	Hábito	Fenologia	Propagação
Primeira (setembro)	Malpighiaceae: <i>Stigmaphyllon</i> sp Identificação em andamento	Liana	Frutos novos aparecendo	Macroprop.: Enraiz. no tratamento sem regulador
	Melastomataceae: ainda sem coleta de material fértil	Árvoreta	Indivíduo jovem	Macroprop.: Sem enraiz. e morte das estacas
Segunda (setembro)	Malpighiaceae: <i>Stigmaphyllon</i> sp Identificação em andamento	Liana	Frutos novos aparecendo	Macroprop.: Sem enraiz. e morte das estacas
	Fabaceae: identificação em andamento	Liana	Floração adiantada	Macroprop.: Sem enraiz. e morte das estacas
	Menispermaceae: sem material fértil	Liana	Ausência de fenofase	Macroprop.: Sem enraiz.
Terceira (Novembro)	Melastomataceae: <i>Miconia</i> cf <i>phanerostila</i>	Árvore	Frutos maduros aparecendo	Não realizada
Quarta (dezembro)	Melastomataceae: <i>Miconia</i> cf <i>phanerostila</i>	Árvore	Frutos maduros caindo e sementes dispersas	Propagação sexuada: Germinação
Quinta (dezembro)	Malpighiaceae <i>Byrsonima</i> sp	Árvore	Frutos maduros aparecendo	Propagação sexuada: Germinação

3.2. Etapa B: Propagação

Etapa B1. Macropropagação por meio de estacas de ramos vegetativos em *Stigmaphyllon* sp (Malpighiaceae), sem adaptação de microambiente.

A aplicação do regulador de crescimento (AIB) não resultou em enraizamento das estacas, sugerindo efeito tóxico das concentrações testadas (1gL^{-1} e 2gL^{-1}), ou do tempo de exposição (10 min), uma vez que ocorreu enraizamento em 70% das estacas do tratamento controle ($0,0\text{ gL}^{-1}$ de AIB).

Etapa B2. Macropropagação por meio de estacas de ramos vegetativos em *Stigmaphyllon* sp (Malpighiaceae), Fabaceae e Menispermaceae, com adaptação de microambiente.

A aplicação de AIB em concentrações de 1 a 4 gL^{-1} , além do tratamento controle ($0,0\text{ gL}^{-1}$ de AIB), bem como a manutenção das estacas em recipientes com adaptação de microambiente para conservação da umidade do ar, não proporcionou as condições necessárias ao enraizamento. A elevada umidade dentro dos recipientes causou uma grande proliferação de fungos, embora as estacas tenham recebido previamente um tratamento desinfestante, e todas as estacas morreram antes de qualquer sinal de enraizamento.

Etapa B3. Micropropagação: Assepsia em segmentos nodais de *Paullinia stipularis*, *Paullinia cupana* e *Psychotria rosea*.

A ANAVA indicou que os protocolos utilizados para assepsia, apresentaram efeitos diferenciados entre os tratamentos para ocorrência de contaminação por fungos e bactérias, oxidação e sobrevivência ($p \leq 0,001$), bem como ocorrência de brotações ($p \leq 0,05$). Também que as espécies apresentaram respostas diferenciadas ($p \leq 0,001$) para todas as variáveis, com exceção da contaminação por fungos, que incidiu igualmente

sobre as três espécies. Observa-se ainda que as espécies responderam de forma diferenciada aos tratamentos, para todas as variáveis avaliadas ($p \leq 0,001$). Quadro 5.

Quadro 5. Análise de variância do efeito de sete tratamentos de assepsia sobre a ocorrência de contaminação por fungos, bactérias, oxidação, brotação e sobrevivência em explantes de segmentos nodais de *Paulinia cupana*, *Paulinia stipularis* e *Psychotria rosea*. Sendo os tratamentos, T1: fungicida + álcool + hipoclorito de sódio; T2: fungicida + álcool + cloreto de mercúrio; T3: lavagem em água + álcool + hipoclorito de sódio; T4: lavagem em água + álcool + cloreto de mercúrio; T5: fungicida + álcool 70%; T6: lavagem em água + álcool 70%; T7: lavagem em água.

F.V	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		FUNGO	BACTÉRIA	OXIDAÇÃO	BROTAÇÃO	SOBREV.
Tratamentos	6	0,7260**	0,9313**	0,2328**	0,1470*	0,3853**
Espécies	2	0,0457NS	0,3123**	0,2086**	1,1481**	0,1851**
Trat X Espécies	12	0,0962**	0,2165**	0,0799**	0,1526**	0,1287**
Erro	243	0,0261	0,0331	0,0293	0,0669	0,0399
Média Geral		0,82	1,00	0,79	0,85	1,06
CV (%)		19,69	18,17	21,42	30,23	18,82

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; NS: não significativo.

Observa-se que os tratamentos T1, T2, T3 e T4 resultaram no melhor controle de fungos nas três espécies. Nestes tratamentos houve a combinação de até três substâncias desinfestantes. Em T2 e T4 destaca-se a utilização de cloreto de mercúrio, substância de elevado efeito biocida, e por esta razão muito tóxico para qualquer organismo, sendo por isso utilizado em baixas concentrações (0,001%), ou rápida exposição. Em T4 não foi utilizado substância fungicida. O tratamento T1 teve como diferencial a adição de hipoclorito de sódio na sequência de assepsia. Esta é uma das substâncias mais frequentes em procedimentos de desinfestação. O tratamento T3 demonstrou melhor desempenho nas espécies *Paullinia cupana* e *Psychotria rosea*, e apresenta uma sequência de álcool 70% (1 min) e hipoclorito 1% utilizado por 5 minutos em *Paullinia cupana* e *Paullinia stipularis*, e apenas 02 minutos em *Psychotria*

rosea para evitar o efeito oxidativo no explante, em tempo de exposição mais prolongado (Quadro 3).

De maneira geral os tratamentos foram mais eficientes no controle de fungos que de bactérias (médias com valores mais elevados). Principalmente porque a inibição do crescimento dos fungos permitiu um maior desenvolvimento das bactérias.

Embora as espécies tenham apresentado bom nível de sobrevivência, na avaliação aos 30 dias de inoculação, não houve o estabelecimento das plântulas ao longo de tempo de cultivo.

Assim considera-se que, em geral, os tratamentos não se mostraram tóxicos para as plantas, porque a sobrevivência aos 30 dias foi comprometida principalmente nos tratamentos mais suaves em que houve um excessivo crescimento de fungos. Desta forma outros aspectos podem estar influenciando o estabelecimento *in vitro*, como profilaxia e nutrição da planta matriz, tipo de explante e constituição do meio de cultura.

B4: Micropropagação de *Cattleya* sp: desenvolvimento de autotrofia *in vitro*

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência (Sobrev.), enraizamento (R), e brotações (Brot) em plântulas de *Cattleya* sp avaliadas nos intervalos de 30, 60 e 90 dias, em meio de cultura de MS (1962) com variação no teor de sacarose: T1(100%), T2 (50%), T3 (25%) e T (0%). Média de 05 repetições de 20 plântulas.

T	30 dias (%)			60 dias (%)			90 dias (%)		
	Sobrev.	R	Brot	Sobrev	R	Brot	Sobrev	R	Brot
1	96	65	23	87	81	34	84	84	39
2	85	61	26	85	80	37	71	85	45
3	94	32	18	92	66	45	84	68	50
4	93	1	14	74	19	19	52	19	22

4. Discussão

Etapa B: Propagação

Etapas B1 e B2: Macropropagação por meio de estacas de ramos vegetativos em *Stigmaphyllon* sp (Malpighiaceae), sem adaptação de microambiente; e com adaptação de microambiente em *Stigmaphyllon* sp, e em indivíduos das famílias Fabaceae e Menispermaceae.

O enraizamento adventício em estacas de ramos está sob influência de vários fatores que são relativos às características do material vegetal, como a constituição (herbácea ou lenhosa), a origem da estaca no ramo (base, meio, ápice), a presença de substâncias estimuladoras (hormônios) e/ou inibidoras (compostos fenólicos), características genéticas, entre outras. Também são importantes as condições do ambiente como o substrato, nível de luz, umidade do ar e temperatura (Hartmann *et al* 2002).

Dentre os fatores endógenos, o teor de hormônios na estaca poderá ser determinante para o sucesso do enraizamento, uma vez que frequentemente aplica-se alguma substância sintética, geralmente uma auxina, à base das estacas para estimular a formação de raízes. As auxinas estimulam o enraizamento em baixas concentrações, entretanto em concentrações elevadas podem inibi-lo (Hartmann *et al* 2002).

O enraizamento em estacas herbáceas de *Stigmaphyllon* sp, sem adaptação de microambiente, verificado apenas no tratamento sem adição de auxina, indica que as concentrações de 1 e 2 gL⁻¹ de AIB aplicadas às estacas foram excessivas. Em algumas espécies observa-se que ocorre melhor enraizamento em estacas que não recebem tratamento com AIB, conforme verificado por Negash (2002) em *Juniperus procera*. Atroch *et al.*, (2007) observaram que dosagens acima de 2000 ppm de AIB inibiram o enraizamento de estacas de clones de guaranazeiro (*Paullinia cupanana*). Também Dias

et al. (2011) observaram que concentrações de AIB superiores a 2gL^{-1} , inibiram a iniciação de raízes em estacas provenientes de brotações radiculares de amoreira preta (*Rubus* spp). Estes autores acreditam que concentrações mais elevadas do regulador de crescimento provavelmente causaram um desequilíbrio nas relações hormonais, que comprometeu a formação de raízes adventícias.

Também merece nota o fato da maioria das estacas serem provenientes de plantas em estágio de floração ou frutificação (Quadro 4). Em algumas espécies esta condição dificulta o enraizamento devido à alocação de reservas (Hartmann et al., 2002).

A manutenção de uma atmosfera úmida no ambiente de enraizamento é uma condição fundamental, para garantir que as estacas não desidratem prejudicando a iniciação radicial (Hartmann *et al* 2002) . Na ausência de estrutura física adequada para atender a essa condição é possível, de forma empírica, providenciar adaptações que minimizem uma transpiração excessiva.

Ainda que empiricamente, esta técnica é utilizada principalmente para a aclimatização de plantas micropropagadas. Neste caso, certamente o sucesso da técnica é maior porque o material vegetal foi produzido em condições assépticas. No presente trabalho as estacas não resistiram à intensa proliferação de fungos em nenhum dos tratamentos, embora estivessem tratadas com substância fungicida. Acredita-se que a aplicação de algumas providências, como a esterilização do substrato e melhor drenagem possam trazer melhores resultados.

Etapa B3. Micropropagação: Assepsia em segmentos nodais de *Paullinia stipularis*, *Paullinia cupana* e *Psychotria rosea*.

A assepsia é o primeiro desafio a vencer no estabelecimento *in vitro* de uma espécie, principalmente porque muitos fatores interferem neste processo. A condição de cultivo da planta matriz, a origem do explante na planta (órgãos aéreos ou raiz), as

características morfológicas do material vegetal, quanto à resistência perante os procedimentos de desinfestação. Também os tipos de substâncias utilizadas e o tempo de exposição do explante (Grattapaglia e Machado, 1998).

Existem substâncias que são mais frequentemente utilizadas, por serem solúveis em água, apresentarem baixo custo, facilidade de manuseio e baixa toxicidade. Entre estas se destacam o álcool a 70% e o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (Barrueto Cid e Zimmermann, 2006). Estas substâncias são utilizadas principalmente na assepsia do explante, entretanto, em casos de materiais vindos do campo, é possível adicionar ao meio de cultura antibióticos e fungicidas. Desta forma, neste trabalho estes efeitos provavelmente se complementam. Altan et al., (2010) alcançaram um bom controle de contaminação por fungo na micropropagação de *Lilium candidum* L., adicionando ao meio de cultura Benomyl e nistatina.

A atividade biocida do hipoclorito é relatada por Chaves et al., (2004) ao constatarem que, o hipoclorito de sódio em concentrações de 0,5 a 2% de cloro ativo apresentou eficiência no controle de contaminação em segmentos nodais de *Prunus* cv Mr. S 2/5. No presente trabalho o hipoclorito de sódio foi utilizado apenas na concentração de 1% (v/v), e nos tratamentos em que esteve presente (T1 e T3), obteve-se um controle satisfatório da contaminação. O álcool etílico a 70% (v/v) também estava presente nestes tratamentos. Contudo a inclusão do cloreto de mercúrio em baixa concentração (0,01%) conferiu um bom controle de contaminação para todas as espécies, observado nos tratamentos T2 e T4.

A ocorrência de crescimento, avaliado pela observação de brotações nos explantes, apresentou resultados significativos apenas em *Psychotria rosea*. Nesta espécie certamente o próprio balanço hormonal endógeno, bem como a ausência de impedimentos, como processos oxidativos, permitiu o crescimento das gemas laterais.

Entretanto as duas espécies de *Paullinia* praticamente não apresentaram crescimento. Além destas espécies apresentarem crescimento mais lento que a *Psychotria*, pelas observações nas plantas matrizes no viveiro, também ocorreu oxidação em muitos explantes de *Paullinia cupana* e *Paullinia stipularis*, possivelmente com a liberação de substâncias inibidoras de crescimento, no meio de cultura.

As espécies apresentaram, de maneira geral, bom nível de sobrevivência aos 30 dias de avaliação.

Etapas B4: Micropropagação de *Cattleya* sp - desenvolvimento de autotrofia *in vitro*

Para o cultivo de plantas *in vitro*, em geral, adiciona-se uma fonte de carbono para compensar a ausência ou ineficiência do processo fotossintético, em salas de crescimento iluminadas com lâmpadas fluorescentes brancas frias. O meio de cultura de MS (1962) é o mais frequentemente empregado com a adição de 3% de sacarose, o que significa que as plantas se desenvolvem em uma condição heterotrófica. A diminuição da sacarose no meio de cultura é interessante por dois aspectos principais, pois dificulta o desenvolvimento de microrganismos (contaminação), e favorece o desenvolvimento da autotrofia tornando mais fácil a aclimatização das plantas *ex vitro*.

Embora a contaminação não seja um problema na introdução de orquídeas *in vitro*, quando se utiliza sementes (protocormos) como explante inicial, porque a assepsia é realizada no fruto alcançando elevado índice de sucesso, o estabelecimento de condição autotrófica é bastante interessante para favorecer a aclimatização. Além disso, a variação no teor de sacarose induz na planta respostas de crescimento relacionadas a esta condição (Rodrigo et al, 2008) que, em diferentes níveis, podem se constituir em um estresse para a planta e induzir respostas para serem aplicadas aos processos de multiplicação.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que apenas 50% das plantas conseguem sobreviver ao final dos 90 dias em condição de autotrofia. Tal situação é explicada pelas características das lâmpadas fluorescentes, que representam um nível de aproximadamente $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Para efeito de comparação, em ambiente aberto com iluminação solar registra-se irradiância de $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ou mais. Por outro lado percebeu-se um efeito benéfico na redução do teor de sacarose nas variáveis avaliadas. Assim a sobrevivência praticamente não foi afetada até uma redução de 25% da sacarose (Tabela 1).

O teor de sacarose resultou em efeitos diferenciados sobre o desenvolvimento de brotações e surgimento de raízes. Observou-se que menores quantidades de açúcar inibem o enraizamento, mas estimulam as brotações. Tais resultados podem ter diferentes aplicações. Se o objetivo for obter plantas completas para a aclimatização, o teor de 75% (T2) de sacarose, se mostrou mais eficiente em relação ao meio com 100% (30 gL^{-1}), pois mantém o mesmo nível de enraizamento e maior porcentagem de brotações. Entretanto, uma redução a 25% do teor de sacarose (T3) poderá ser interessante em protocolos para multiplicação, uma vez que apresentou o maior número de brotações ao final dos 90 dias.

5. Conclusão

- Estacas herbáceas caulinares de *Stigmaphyllon* sp enraízam sem tratamento com enraizador (AIB);
- Concentrações de $1\text{g}^{\text{L}^{-1}}$ e $2\text{g}^{\text{L}^{-1}}$ de AIB são tóxicas para estacas herbáceas caulinares de *Stigmaphyllon* sp;
- A adaptação de microambiente, para preservação de atmosfera úmida, foi ineficiente para a sobrevivência e enraizamento de estacas de *Stigmaphyllon* sp (Malpighiaceae), e de estacas de indivíduos das famílias Fabaceae e Menispermaceae;
- O tratamento T2 resultou na assepsia mais eficiente para segmentos nodais de *Paullinia cupana* var *sorbilis*, considerando o conjunto de fatores, aos 30 dias de avaliação;
- O tratamento T4 resultou na assepsia mais eficiente para segmentos nodais de *Paullinia stipularis* e *Psychotria rosea*, aos 30 dias de avaliação, considerando o conjunto de fatores.
- Não houve sucesso para o estabelecimento *in vitro* das espécies *Paullinia cupana* var *sorbilis*, *Paullinia stipularis* e *Psychotria rosea*;
- A autotrofia é limitada em plantas de *Cattleya* sp cultivadas em sala de crescimento com lâmpadas fluorescentes brancas frias;
- Redução no teor de sacarose no meio de MS (1962) estimula brotações novas em *Cattleya* sp;
- Redução no teor de sacarose no meio de MS (1962) tem efeito inibitório no enraizamento de *Cattleya* sp.

6. Referências

- Alexandre, R. S.; Couto, F. F. de A.; Dias, J. M. M.; Otoni, W. C.; Mendes, R. de C.; Cecon, P. R. 2008. In vitro organogenesis of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) affected by irradiance, sucrose and explant position. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.4, n.2, p. 62-69.
- Altan, F.; Bürün, B.; Sahin, N. 2010. Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of cremotherapeutic substances applied after sterilization. **African Journal of Biotechnology**, 9: 991-995.
- Alvarenga, L. R.; Carvalho, V. D. 1983. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. **Informe Agropecuário**, 9: 47-55. Belo Horizonte.
- Atroch, A.L.; Cravo, M.S.; Santos, J.K. dos. (2007). Enraizamento de estacas de clones de guaranazeiro tratados com ácido-indol-butírico (AIB). **Revista Ciência Agronômica**, 47: 103-111.
- Barrueto Cid, L. P.; Zimmermann, M. J. 2006. A contaminação *in vitro* de plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 20p.
- Chaves, A.C.; Schuch, M.W.; Bianchi, V.J. 2004. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. mr. s. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10: 249-250.
- Davies Junior, F.T.; Hartmann, H.T. 1988. The physiological basis of adventitious root formation. **Acta Horticulturae**, 227: 113-120.
- Dias, J. P. T.; Ono, E. O.; Rodrigues, J. D. 2011. IBA e carboidratos no enraizamento de brotações procedentes de estacas radiciais de *Rubus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Especial: 666-671
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A. (1998) Micropropagação. In: A.C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, 1:183-260. Brasília: Embrapa.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davis Junior, F. T.; Geneve, R. L. 2002. **Plant Propagation: principles and practices**. Englewood Clippis, New York ,880p.
- Negash, L. (2002). Succesful vegetative propagation techniques for the threateneal African pencil cedur (*Junisperus procera* (Toechst ex Endl). **Forest Ecology and Management**, 161: 53-54.
- Pasqual, M.; Hoffmann, A.; Ramos, J.D. 1998. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 159 pp..
- Ribeiro, J.E.L.S, Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.; Martins, L.H.P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira,

E.C.; Silva, C.F.; Mesquita, M.R.; Procópio, L.C. 1999. Flora da Reserva Ducke. **Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-firme na Amazônia Central**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 793 pp.

Tombolato, A. F. C.; Veiga, R. F. de A.; Barbosa, W.; Costa, A. A.; Benatti Júnior, R.; Pires, E. G. 2004. Domesticação e pré-melhoramento de plantas: I. Ornamentais. **O Agrônomo**, 56.