

PRODUTIVIDADE DE MICROCEPAS DE GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa*) MANTIDAS *IN VITRO****IN VITRO* PRODUCTIVITY OF APULEIA (*Apuleia leiocarpa*) MICROSTUMPS**

Kelen Haygert Lencina¹ Dilson Antônio Bisognin² Nathalia Pimentel³ Paula Kielse¹
Uilian Stefanello de Mello⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas em diferentes condições de cultivo *in vitro*, visando maximizar a taxa de multiplicação. Microcepas oriundas da poda drástica de plantas assépticas foram cultivadas em meio de cultura WPM acrescido de 0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e subcultivadas em meio de cultura WPM sem citocinina. Microcepas de grápia também foram cultivadas em meio de cultura WPM, MS ou $\frac{1}{2}$ MS, acrescido ou não de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado e submetidas a três coletas de brotos aos 30, 60 e 90 dias de cultivo. A manutenção das microcepas em meio de cultura WPM ou $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 8,8 μM de BAP, seguido do subcultivo em meio de cultura sem citocinina aumenta o número e o crescimento de brotações. O cultivo de microcepas de grápia em meio de cultura com carvão ativado aumenta a produção de microestacas por microcepas, enquanto a ausência de carvão ativado favorece a formação de calos e brotos por organogênese indireta. A manutenção *in vitro* de microcepas de grápia maximiza a taxa de multiplicação, constituindo-se de uma técnica promissora para a produção de plantas de grápia.

Palavras-chave: micropropagação; propagação *in vitro*; propagação vegetativa.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the *in vitro* productivity of grapia (*Apuleia leiocarpa*) micro-stumps cultivated in different media conditions to maximize its multiplication rate. Micro-stumps from aseptic seedlings were cultivated in WPM medium added with 0, 2.2, 4.4, 6.6 and 8.8 μM of 6-benzylaminopurine (BAP) and subcultured in WPM medium without cytokinin. Micro-stumps were also cultivated in WPM, MS or $\frac{1}{2}$ MS base media with or without the addition of 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal and submitted to drastic pruning at 30, 60 and 90 days of cultivation. The *in vitro* cultivation of grapia micro-stumps in WPM or $\frac{1}{2}$ MS media added with 8.8 μM of BAP and the subcultivation in media without cytokinin increase the number and length of shoots. The cultivation of grapia micro-stumps in media with activated charcoal increases the productivity of micro-cuttings per micro-stumps, but in the absence of activated charcoal induces callus formation and indirect organogenesis of shoots. The *in vitro* conservation of grapia micro-stumps maximizes the multiplication rate, being a feasible technique for the production of grapia plantlets.

Keywords: micropropagation; *in vitro* propagation; vegetative propagation.

- 1 Engenheira Florestal, Dr^a, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. khaygert@gmail.com / paulinhakielse@gmail.com
- 2 Engenheiro Agrônomo, PhD., Professor do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. dbisognin@gmail.com
- 3 Engenheira Florestal, MSc., Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. nathaliapimentel@outlook.com
- 4 Acadêmico do curso de Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. uilian.mello@hotmail.com

Recebido para publicação em 28/01/2016 e aceito em 27/10/2016

INTRODUÇÃO

A grápia [*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.] é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, pertencente à família Fabaceae, empregada em marcenaria, esquadrias, carrocerias, trabalhos em torno e para a construção civil (LORENZI, 2008). Além de fornecer madeira de elevada qualidade, apresenta relevante importância ecológica em vegetação secundária, por ser espécie pioneira que colabora eficientemente no desenvolvimento da vocação florestal dessas áreas (BACKES; IRGANG, 2004). A espécie apresenta frutificação irregular ao longo dos anos e sementes com tegumento impermeável à água (CARVALHO, 2003) e baixa taxa de germinação, variando entre 21,3% a 54% (HENICKA et al., 2006; DE MARCO et al., 2012), o que dificulta a reprodução sexuada.

Estudos sobre reprodução assexuada ou propagação vegetativa de espécies arbóreas nativas têm sido cada vez mais frequentes, pois o aumento da demanda por mudas associada à dificuldade de reprodução sexuada dessas espécies limita a sua produção em escala suficiente para a reposição ou recuperação florestal, além de não garantir a qualidade genética necessária para o estabelecimento de povoamentos com fins comerciais. No caso de espécies do gênero *Eucalyptus*, em decorrência de sua importância no cenário da silvicultura brasileira, já foram desenvolvidas tecnologias de propagação vegetativa que aperfeiçoaram a técnica de estaquia, a exemplo da miniestaquia e microestaquia, que viabilizaram o processo de produção de mudas de clones de difícil enraizamento (XAVIER; SILVA, 2010). Para a produção de mudas por miniestaquia é necessário estabelecer um minijardim clonal a partir de mudas de origem seminal ou produzidas por estaquia, que formarão as minicepas fornecedoras das miniestacas (XAVIER; SILVA, 2010). Um microjardim clonal se diferencia basicamente pela origem do material que compõe o sistema de cultivo, pois mudas micropropagadas são estabelecidas e submetidas à poda drástica para a formação das microcepas, fornecedoras das microestacas. A grande contribuição da microestaquia para a silvicultura de eucalipto baseia-se na possibilidade de resgate de genótipos de difícil enraizamento, visto que os sucessivos subcultivos *in vitro* promovem o rejuvenescimento e revigoramento das plantas micropropagadas (ASSIS; MAFIA, 2007), que resultam em rápido estímulo para a iniciação e o crescimento de raízes adventícias (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

A manutenção *in vitro* de microcepas consiste na aplicação concomitante das metodologias preconizadas pelas micropropagação e microestaquia com vistas no fornecimento continuado de microestacas para o enraizamento. Uma das vantagens que se propõe para essa metodologia é possibilitar o aproveitamento dos propágulos de plântulas assépticas, dos quais são geralmente retirados os segmentos nodais e apicais para serem utilizados na multiplicação *in vitro* (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013), descartando-se o restante da parte aérea e do sistema radicular, que constituem uma microcepa. Além disso, permite maximização da taxa de multiplicação, visto que inúmeras coletas podem ser realizadas associada a conservação de germoplasma.

Para louro-pardo [*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel], a manutenção *in vitro* de microcepas mostrou-se um método promissor para a multiplicação *in vitro* (FICK, 2007; HEBERLE, 2010), sendo o mesmo observado para erva-mate [*Ilex paraguariensis* (Saint) Hilaire] (HORBACH, 2008). Para a grápia [*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride] também foi avaliada a manutenção *in vitro* de microcepas (LENCINA, 2013).

Estudos preliminares relacionados ao estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas e à manutenção *in vitro* de microcepas de grápia, mostraram que as microcepas podem servir de fonte de propágulos livres de contaminantes e com características juvenis para condução da etapa de multiplicação e o posterior enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* (LENCINA, 2013; LENCINA et al., 2014). Mais estudos foram recomendados, principalmente relacionados às condições de cultivo das microcepas, avaliações da taxa de multiplicação em sucessivos subcultivos e quanto à competência dos explantes para a formação de raízes adventícias de grápia (LENCINA, 2013). Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos das condições de cultivo na produtividade de microestacas e a manutenção *in vitro* de microcepas de grápia para fornecimento de explantes utilizados na micropropagação.

MATERIAL E MÉTODO

As plântulas assépticas utilizadas para formar as microcepas foram obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes de grápia em meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), conforme protocolo estabelecido por Lencina et al. (2014). Em todos os experimentos, os cultivos foram realizados em frascos de vidro (150 mL) com aproximadamente 40 mL de meio de cultura, esterilizado por autoclavagem durante 20 min à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. Foi utilizado um explante por frasco. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e os cultivos mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de $14,3 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes.

No primeiro experimento foram avaliadas a sobrevivência e a produtividade de brotações das microcepas em diferentes concentrações de BAP e diferentes condições de cultivo. Plantas assépticas de grápia com 15 dias de idade foram submetidas à poda da parte aérea, com corte realizado acima das folhas cotiledonares, formando-se as microcepas (Figura 1A), as quais foram transferidas para o meio de cultura suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de inositol, 6 g L^{-1} de ágar e das concentrações 0; 2,2; 4,4; 6,6 e $8,8 \mu\text{M}$ de BAP para cultivo inicial. Aos 30 dias de cultivo inicial as microcepas foram avaliadas para a porcentagem de sobrevivência e de brotação, o número e comprimento (cm) das brotações por microcepa e o número de microestacas por brotação e por microcepa. Após a avaliação, as microcepas foram novamente submetidas à poda da parte aérea e subcultivadas em meio de cultura WPM sem citocinina, para avaliar o efeito residual das concentrações de BAP.

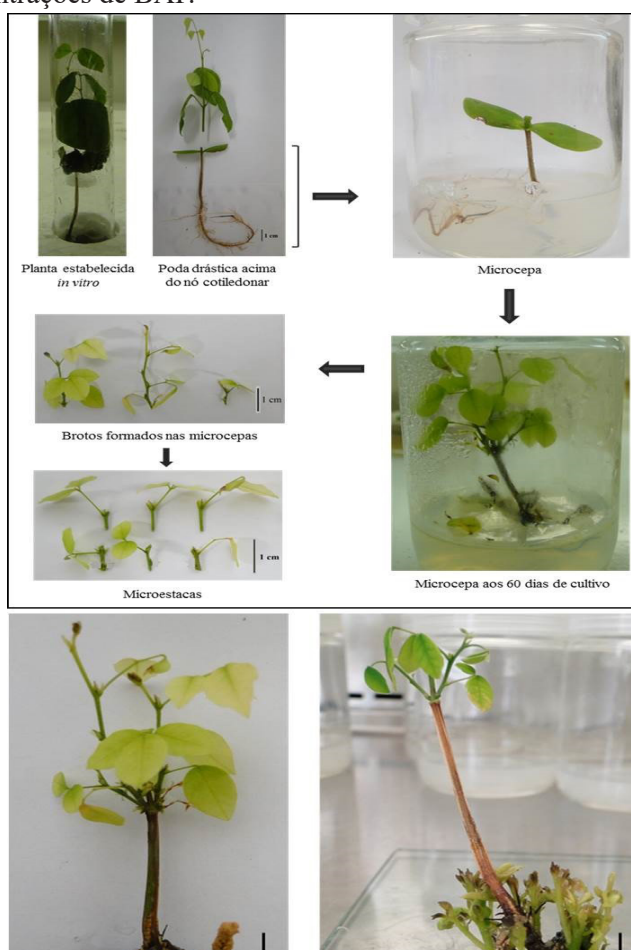


FIGURA 1: Etapas para a formação de microcepas e para o preparo de microestacas de *Apuleia leiocarpa* (A), microcepa com formação de calo na raiz (B) e brotos formados em calos na raiz de microcepas (C).

FIGURE 1: Steps for the formation of micro-stumps and the preparation of micro-cuttings of *Apuleia leiocarpa* (A), micro-stumps with callus formation in the roots (B) and regeneration of shoots from root callus of micro-stumps (C).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 (concentrações de BAP e condições de cultivo), com cinco repetições de quatro microcepas. As condições de cultivo consistem no cultivo inicial em diferentes concentrações de BAP e subcultivo em meio de cultura livre de citocinina. Aos 30 dias de subcultivo, as microcepas foram avaliadas para as mesmas variáveis descritas anteriormente.

No segundo experimento foram avaliadas a sobrevivência e a produtividade de brotações das microcepas em diferentes meios de cultura, na presença ou não de carvão ativado e durante três coletas sucessivas. Plantas assépticas de grábia com 15 dias de idade foram submetidas à poda da parte aérea para formar as microcepas (Figura 1A) e transferidas para meio de cultura WPM, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou ½ MS (MS com metade da concentração de sais minerais e vitaminas), na presença ou não de carvão ativado (1,5 g L⁻¹) e suplementado com 8,8 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de inositol e 6 g L⁻¹ de ágar.

O experimento foi um fatorial 3 x 2 x 3 (meio de cultura, carvão ativado e coletas sucessivas), no delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições de cinco microcepas. As microcepas foram avaliadas aos 30, 60 e 90 dias de cultivo (primeira, segunda e terceira coleta), sendo realizada a poda drástica da microcepa após cada avaliação e adicionado 20 mL da mesma composição do meio líquido de cultura. As microcepas foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência e de emissão de brotações, ao número e comprimento (cm) das brotações por microcepa, ao número de microestacas por brotação e microcepa, e para a porcentagem de calogênese, de calos com brotação e de oxidação nas raízes das microcepas.

Para atender aos pressupostos da normalidade, os dados de porcentagem foram transformados para arcosseno $\sqrt{x/100}$ e de número para $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey ou regressão polinomial, com o auxílio do programa ESTAT (Unesp - Jaboticabal).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio realizado, não houve interação ($P > 0,05$) para todas as variáveis entre as concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultura e as condições de cultivo, que consistiram no cultivo inicial em diferentes concentrações de BAP e subcultivo em meio de cultura livre de citocinina. As microcepas de grábia apresentaram média de sobrevivência de 97,8% e de brotação de 100%, indicando que as condições de manutenção *in vitro* de microcepas de grábia foram satisfatórias (Tabela 1).

A adição de diferentes concentrações de BAP afetou apenas o número de brotos por microcepa, com maiores respostas no tratamento com 8,8 µM de BAP, mas sem diferir do tratamento com 6,6 µM (Tabela 1). Esta variável é de grande importância, sendo que, quanto maior o número de brotos, possivelmente, maior será o número de explantes disponíveis para a próxima fase da micropropagação, o enraizamento adventício. Este resultado provavelmente ocorreu devido à adição de fitorreguladores no meio de cultura, como o BAP, o qual apresenta a função de estimular fortemente os processos morfogênicos, como o desenvolvimento de gemas axilares preexistentes ou a indução de gemas adventícias, ambas fundamentadas na divisão e diferenciação celular (RIBEIRO et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013). Sendo assim, a adição de fitorreguladores, em muitos casos, é necessária para ajustar as respostas morfofisiológicas dos explantes (ALMEIDA et al., 2012). O uso do BAP também mostrou efeitos benéficos na multiplicação de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith), que, apesar dos segmentos nodais terem apresentado organogênese em todas as concentrações testadas (0, 1,1, 2,2, 4,4, 8,8, 16,2 e 32,4 µM de BAP), a maior resposta de número de brotos foi observada no tratamento com 16,2 µM de BAP (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

Além da suplementação do meio de cultura com citocinina, vale salientar que as microcepas apresentam o sistema radicular, que corresponde aos principais locais de síntese deste fitorregulador (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, é possível que o conteúdo endógeno tenha contribuído para as repostas morfogênicas, proporcionando uma alta relação citocinina/auxina, favorecendo a emissão das brotações (HARTMANN et al., 2011). Essa hipótese corrobora o fato de a gema apical ter sido retirada pela poda drástica, visto que a gema apical apresenta elevada concentração de IAA (ácido indolil-3-acético), auxina que determina a dominância apical, a qual, por sua vez, auxilia na manutenção de altos níveis de ABA (ácido abscísico) nas

gemas laterais que inibem seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013).

TABELA 1: Porcentagem de sobrevivência (S%) e brotação (B%) das microcepas, número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), número de microestacas por broto (MB) e por microcepa (MM) de *Apuleia leiocarpa* cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

TABLE 1: Percentage of survival (S%) and shoot formation (B%) of micro-stumps, number (NB) and length of shoots (CB), number of micro-cuttings per shoot (MB) and per micro-stump (MM) of *Apuleia leiocarpa* grown in culture medium supplemented with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) for 30 days and sub-cultured for 30 days in medium without cytokine.

Tratamento	S (%)	B (%)	NB	CB (cm)	MB	MM
BAP (μ M)						
0,0	94,2	100,0	1,8 b	2,3	1,5	2,7
2,2	100,0	100,0	2,0 b	2,4	1,7	3,5
4,4	100,0	100,0	2,0 b	2,5	1,8	3,2
6,6	95,0	100,0	2,2 ab	2,7	1,9	3,9
8,8	100,0	100,0	2,8 a	2,7	1,5	3,7
Condições de cultivo						
Cultivo inicial	97,0	100,0	2,0	1,0 b	1,2 b	2,4 b
Subcultivo	98,6	100,0	2,3	4,0 a	2,1 a	4,5 a
Média	97,8	100,0	2,1	2,5	1,7	3,5
CV (%)	10,3	-	10,7	10,2	12,9	13,7

Em que: Valores seguidos de letra diferente diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As condições de cultivo influenciaram o comprimento dos brotos e o número de microestacas por broto e por microcepa, em que as respostas foram superiores no subcultivo (Tabela 1). É possível que esta resposta esteja relacionada com o efeito das concentrações de BAP e a níveis ótimos de reguladores de crescimento vegetal atingidos durante o cultivo inicial das microcepas, já que o subcultivo foi realizado em meio isento de citocinina. Sabe-se que os efeitos dos fitorreguladores adicionados aos meios de cultura não se restringem ao cultivo inicial, podendo ocorrer efeito residual de um cultivo para outro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Resultados semelhantes foram obtidos em *Eucalyptus* (GRATTAPAGLIA; ASSIS; CALDAS, 1987), *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (FLORES; NICOLoso; MALDANER, 2007) e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (FLORES et al., 2009). No cultivo *in vitro* de *P. glomerata*, os brotos com maior crescimento e vigor foram observados nos segmentos nodais cultivados em 1,0 e 5,0 μ M de BAP ou Tidiazuron (TDZ) e subcultivados em meio isento de citocinina (FLORES et al., 2009). Para *P. tuberosa*, as citocininas têm sido utilizadas apenas na fase de multiplicação, sendo o alongamento e o enraizamento dos brotos conduzidos em meio isento desse fitorregulador (FLORES; NICOLoso; MALDANER, 2007). Entretanto, deve ser salientado que foi testado apenas uma fase de cultivo na presença de citocinina e uma de subcultivo na ausência dessa, e talvez a manutenção das microcepas por períodos mais longos de cultivo na ausência de citocinina, reduza o potencial de desenvolvimento em número de brotos, como o observado em explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), após três subcultivos em meio de cultura sem suplementação de BAP (SOARES et al., 2011).

No que se refere aos resultados obtidos para o segundo ensaio realizado, não houve interação ($P > 0,05$) entre o meio de cultura, a adição ou não de carvão ativado e as sucessivas coletas na manutenção e produtividade de brotações nas microcepas para nenhuma das variáveis analisadas. A sobrevivência e a brotação das microcepas não foram influenciadas por nenhum dos fatores testados, apresentando médias de 99,6 e 99,4%, respectivamente, indicando que as condições avaliadas para manutenção *in vitro* de microcepas de grápias também foram satisfatórias nesse experimento (Tabela 2).

TABELA 2: Porcentagem de sobrevivência (S%) e brotação (B%) das microcepas, número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), número de microestacas por broto (MB) e por microcepas (MM) de *Apuleia leiocarpa* cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

TABLE 2: Percentage of survival (S%) and shoot formation (B%) of micro-stumps, number (NB) and length of shoots (CB), number of micro-cuttings per shoot (MB) and per micro-stump (MM) of *Apuleia leiocarpa* grown in different culture media supplemented or not with activated charcoal and evaluated three times.

Tratamento	S (%)	B (%)	NB	CB (cm)	MB	MM
Meio de cultura						
WPM	100,0	98,9	2,6 b	1,9 a	2,3	5,9
MS	99,4	100,0	2,9 ab	1,6 b	2,2	6,0
½ MS	99,6	99,4	3,1 a	1,8 ab	2,2	6,2
Carvão ativado						
0	99,4	98,9	3,2 a	1,4 b	1,9 b	5,8 b
1,5	100,0	100,0	2,5 b	2,1 a	2,6 a	6,3 a
Coletas						
1º (30 dias)	100,0	100,0	2,6 b	2,8 a	2,9 a	7,4 a
2º (60 dias)	99,0	99,4	2,8 ab	1,5 b	2,2 b	6,2 b
3º (90 dias)	100,0	98,9	3,1 a	0,9 c	1,5 c	4,6 c
Média	99,6	99,4	2,8	1,7	2,2	6,1
CV (%)	4,8	4,8	9,5	9,3	10,0	14,4

Em que: Valores seguidos de letra diferente diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quanto à influência dos diferentes meios de cultura, o número de microestacas por broto e por microcepa não varia significativamente. Já o maior número de brotos foi observado no meio de cultura ½ MS, mas sem diferir significativamente do meio de cultura MS. Para o comprimento dos brotos, o meio de cultura WPM resultou nas maiores respostas, mas sem diferir do meio de cultura ½ MS (Tabela 2). É possível que estas repostas tenham relação com o fato de o meio de cultura WPM apresentar 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, como o ½ MS corresponder à metade da concentração de sais do meio MS. Além disso, o meio de cultura WPM foi desenvolvido especialmente para espécies lenhosas, para as quais modificações como a redução da concentração de macronutrientes apresentam melhor desempenho (BERTOZZO; MACHADO, 2010). Assim, novos estudos podem ser realizados com objetivo de avaliar o efeito de meios de cultura mais diluídos, como por exemplo, o meio de cultura WPM com a metade da concentração de sais. Contudo, o uso de meio de cultura mais diluído pode exigir mais transferências para meio de cultura fresco e assim, maior investimento em mão de obra e aumento do risco de perda por contaminação.

A adição de carvão ativado ao meio de cultura afetou o número e comprimento dos brotos assim como o número de microestacas por broto e por microcepa. A manutenção das microcepas em meio de cultura sem carvão ativado resultou em maior número de brotos (Tabela 2). Esta resposta pode estar associada à maior disponibilidade de BAP para as microcepas nos meios de cultura sem carvão ativado, já que este possui a propriedade de adsorver, entre outras substâncias, fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, apesar de não se conhecer ao certo a quantidade que pode ser adsorvida pelo mesmo (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009). As citocininas, tais como a BAP, são importantes na regulação da morfogênese em explantes, pois estimulam a divisão das células, a indução e a proliferação de brotações (TAIZ; ZEIGER, 2013). Nesse caso, a presença de carvão ativado no meio de cultura pode ter ocasionado a redução dos teores de citocinina adicionada ao meio de cultura e seu consequente efeito na superação da dominância apical, o que resultou em menor número de brotações nas microcepas mantidas em meio de cultura com carvão ativado (Tabela 2). Cabe ressaltar que, apesar da menor formação de brotações nas microcepas cultivadas em meio de cultura com carvão ativado, estas se mostraram vigorosas e com coloração verde intensa, o que não foi observado nas microcepas mantidas em meio de cultura sem carvão

ativado. Além disso, o carvão ativado promoveu o aumento do comprimento das brotações e do número de microestacas por brotação e por microcepa.

O carvão ativado é adicionado ao meio de cultura no intuito de otimizar o crescimento e o desenvolvimento celular nas diferentes fases da cultura de tecidos (VIEITEZ et al., 2009). Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos do carvão ativado na adsorção de compostos fenólicos nos cultivos *in vitro*, sendo utilizado em protocolos de regeneração de espécies lenhosas (GOMES et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2011; SARTOR et al., 2013) com o intuito de diminuir a taxa de oxidação dos explantes. Desse modo, apesar do carvão ativado não ter contribuído para o aumento do número de brotações, o mesmo promoveu o aumento do número de microestacas por brotação, que define a taxa de multiplicação *in vitro*.

Houve diferenças significativas entre as coletas sucessivas para o número e comprimento dos brotos e número de microestacas por broto e por microcepa. O número de brotos foi superior na terceira coleta, mas sem diferir da segunda coleta. Esse aumento no número de brotos formados nas microcepas de grápias após as sucessivas coletas equivale a 16% de acréscimo da primeira para a terceira coleta. Por outro lado, o comprimento dos brotos e o número de microestacas por broto e por microcepa foi significativamente superior na primeira coleta. O comprimento dos brotos teve redução de 67,8%, enquanto o número de microestacas por broto e por microcepa apresentou redução de 48,3% e 37,8%, respectivamente, da primeira para a terceira coleta (Tabela 2). É possível que o aumento do número de brotos associado à redução do comprimento e do número de microestacas nas coletas sucessivas seja em decorrência da distribuição desigual dos carboidratos disponíveis em função de uma relação de competição estabelecida entre os diferentes processos. A competição determina a distribuição dos açúcares de transporte entre os vários tecidos-drenos da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013). A planta apresenta diversos órgãos-dreno e existe a presença de mecanismos para definir qual órgão receberá maior influxo de recursos (FARRAR, 1993). Além disso, salienta-se que as coletas nas microcepas de grápias foram realizadas em intervalos de 30 dias, período que pode ter sido insuficiente para a formação de novas gemas e obtenção de brotos de maior comprimento. Possivelmente, o uso de concentração de carvão ativado superior à utilizada neste estudo, ou ainda, o aumento do intervalo entre as coletas possibilitaria maior alongamento dos brotos e, assim, maior facilidade de manipulação das microcepas e aproveitamento dos explantes.

Neste estudo, foi observado que as raízes das microcepas de grápias apresentaram a formação de calo (Figura 1 B), brotos nos calos (Figura 1 C) e oxidação. O meio de cultura influenciou apenas na formação de calo, cuja maior resposta foi observada em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 3). O carvão ativado influenciou a porcentagem de calo, de calo com brotações e a oxidação das microcepas da grápias. Microcepas mantidas em meio de cultura sem carvão ativado apresentaram 97,6% de calo, diferindo significativamente das microcepas mantidas em meio de cultura com adição de carvão ativado, que apresentaram 1,6% de calo (Tabela 3). A maior formação de calos em raízes de microcepas cultivadas em meio de cultura sem carvão ativado pode estar relacionada à capacidade deste em adsorver diversos componentes do meio de cultura, inclusive as citocininas, que atuam diretamente na indução de calos em explantes de espécies lenhosas (WERNER et al., 2009). Também, os calos formados nas raízes das microcepas mantidas em meio de cultura sem carvão ativado apresentaram elevada capacidade morfogênica, com a formação de brotação múltipla em 58,4%, o que não foi verificado nos calos das raízes das microcepas mantidas em meio de cultura com carvão ativado, que não apresentaram a formação de brotos.

Nas raízes das microcepas de grápias mantidas em meio de cultura sem carvão ativado também foi observada a presença de oxidação (Tabela 3). As microcepas cultivadas em meio de cultura sem carvão ativado apresentaram 67,1% de oxidação, significativamente superior ao tratamento com carvão ativado, no qual não foi verificada oxidação.

Esse resultado pode estar associado ao efeito adsorvente do carvão ativado, que imobiliza parte das substâncias presentes no meio de cultura, incluindo compostos fenólicos produzidos pelos explantes (WERNER et al., 2009). A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, os quais são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, modificando a absorção de metabólitos e inibindo o crescimento dos explantes (ANDRADE; LUZ; LACERDA, 2000).

TABELA 3: Porcentagem de calo (C%), de calos com a formação de brotações por organogênese indireta (CBR%) e de oxidação (O%) em microcepa de *Apuleia leiocarpa* mantidas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados durante em três coletas.

TABLE 3: Percentage of callus (C%), calluses with indirect organogenesis of shoots (CBR%) and oxidation (O%) of *Apuleia leiocarpa* micro-stumps grown in different culture media supplemented or not with activated carbon and evaluated three times.

Tratamentos	C (%)	CBR (%)	O (%)
Meio de cultura			
WPM	48,1 b	26,8	35,4
MS	48,3 b	29,4	29,8
½ MS	52,4 a	32,2	35,5
Carvão ativado			
0	97,6 a	58,4 a	67,1 a
1,5	1,6 b	0,8 b	0,0 b
Coletas			
1º (30 dias)	48,8	9,2 c	12,4 c
2º (60 dias)	50,0	32,2 b	38,3 b
3º (90 dias)	50,0	46,9 a	50,0 a
Média	49,6	29,4	33,6
CV (%)	12,9	48,6	37,8

Em que: Valores seguidos de letra diferente diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro.

Até 90 dias de cultivo não foi verificado efeito inibidor da oxidação, pois nos tratamentos sem uso de carvão ativado houve oxidação assim como a formação de calos e brotos. Contudo, após a terceira avaliação, as brotações formadas nos calos das raízes das microcepas apresentaram clorose severa, seguido da estagnação do crescimento e morte, sugerindo a necessidade de estudos que visem identificar a condição ideal para a manutenção *in vitro* dos calos e o adequado desenvolvimento dos brotos, para a produção de mudas de grávia via organogênese indireta. É possível que a transferência dos calos após 90 dias para meio de cultura suplementado com carvão ativado possa prolongar o período de cultivo, pois a adição de carvão ativado ao meio de cultura se justifica em espécies lenhosas cujo estabelecimento e crescimento *in vitro* são dificultados ou limitados pelas substâncias fenólicas e taninos eliminados pelo explante (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

As diferentes coletas não influenciaram significativamente a porcentagem de calo, sendo observada média de 49,6% ao final das avaliações (Tabela 3). Já para porcentagem de calos com a formação de brotos e para oxidação houve diferença significativa entre as coletas sucessivas. Ambas as variáveis apresentaram tendência crescente no decorrer das coletas sucessivas, com maiores respostas na terceira coleta.

Os resultados deste trabalho mostram claramente que a manutenção de microcepas por 30 dias em meio de cultura acrescido de 8,8 µM de BAP, com posterior subcultivo em meio de cultura isento de citocinina, favorece a indução de brotos nas microcepas. Além disso, o meio de cultura ½ MS aumenta a formação de brotações nas microcepas e de calo na raiz das microcepas, enquanto o WPM favorece o alongamento dos brotos. O uso do carvão ativado também favorece o alongamento dos brotos e o número de microestacas por broto e por microcepa, enquanto o meio de cultura sem suplementação de carvão ativado favorece a formação de calos e de brotações via organogênese indireta. As coletas sucessivas favorecem a formação dos brotos, entretanto resulta em redução do crescimento e da taxa de multiplicação.

Além disso, é muito importante ressaltar que o explante utilizado neste trabalho, denominado microcepa, seria eliminado durante o processo convencional de multiplicação *in vitro* e que apresenta potencial de fornecimento de explantes no mínimo por três coletas. Considerando o número de microestacas por microcepa, a manutenção *in vitro* de microcepas de grávia possibilita a obtenção de cerca de seis explantes por coleta, totalizando até 18 explantes por microcepa ao final das três coletas (90 dias), ao passo que, cada planta de grávia estabelecida *in vitro* forneceria em média apenas 1,8 explantes para a

multiplicação, aos 30 dias de cultivo (LENCINA et al., 2014). Sendo assim, a manutenção das microcepas *in vitro* aumenta a taxa de multiplicação em 10 vezes, demonstrando claramente seu potencial de utilização na micropropagação de grápias, pelo fornecimento de explantes que serão empregados no enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, bem como para a conservação de germoplasma. Estudos relacionados à avaliação da capacidade de produção das microcepas, do número de subcultivos, e da capacidade morfogênica indireta dessa espécie são relevantes, tanto para a conservação quanto para a multiplicação *in vitro* de grápias.

CONCLUSÕES

A indução e o crescimento de brotos nas microcepas de grápias são favorecidos nos cultivos em meio de cultura WPM ou ½ MS acrescido de 8,8 µM de BAP, com posterior subcultivo para meio de cultura isento de citocinina.

A suplementação do meio de cultura com 1,5 g L⁻¹ de carvão favorece a produção de microestacas por microcepa. O meio de cultura sem adição de carvão ativado promove a produção de calos e de brotos via organogênese indireta.

A manutenção de microcepas *in vitro* maximiza a taxa de multiplicação da grápias, constituindo-se de metodologia promissora para a produção de mudas por micropropagação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. et al. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, New York, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Bioteecnologia florestal**. Viçosa, MG: [s. n.], 2007. p. 93-121.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Mata Atlântica: as árvores e a paisagem**. Porto Alegre: Paisagem do Sul, 2004. 396 p.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1. 1039 p.
- DE MARCO, R. et al. Eficiência de diferentes métodos na superação da dormência de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 496-502, 2012.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.
- FARRAR, J. F. Sink strength: what is it and how we measure it? **Plant, Cell and Environment**, New York, v. 16, p. 1015-1016, 1993.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana Acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.
- FLORES, R. et al. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2007.
- GOMES, G. A. C. et al. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 1, p. 25-30, 2010.
- GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T. F.; CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP e NAA na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília. **Anais...**Brasília: EMBRAPA, 1987. p. 8.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1. p. 183-260.
- GUTIÉRREZ, I. E. M. de. et al. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 260-265, 2011.
- HENICKA, G. S. et al. Germinação de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel.) J.F. Macbr.: temperatura, fotoblastismo e estresse salino. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 4, n. 1, p. 37-46, 2006.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
- LENCINA, K. H. **Germinação e multiplicação *in vitro* de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- LENCINA, K. H. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, jun. 2014.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, [s. l.], v. 30, p. 421-327, 1980.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v.1. 384 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.
- RIBEIRO, J. M. et al. **Micropropagação de Goiabeira, Maracujazeiro, Bananeira e Videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012. 7 p. (Circular técnica Embrapa, 101).
- SARTOR, F. R. et al. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.
- SOARES, F. P. et al. Taxa de multiplicação e efeito resisula de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancoria speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- VIEITEZ, A. M. et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherland, v. 98, n. 2, p. 135-145, 2009.
- WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.
- XAVIER, A.; SILVA, R. L. da. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San José, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.