



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Handroanthus impetiginosus*
(Mart. ex Dc.) Mattos (BIGNONIACEAE) E ESTUDO DA
INCIDÊNCIA DE OÍDIO (*Oidium* sp.) EM PLÂNTULAS OBTIDAS
*IN VITRO***

TALITA CRISTINA MAMEDES

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Leila Garcês de Araújo

GOIÂNIA, GO - Brasil

Abril - 2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

M264 Mamedes, Talita Cristina.
Estabelecimento *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex Dc.) Mattos. (Bignoniaceae) e estudo da incidência de oídio (*Oidium* sp.) em plântulas obtidas *in vitro* [manuscrito] / Talita Cristina Mamedes. - 2013.
xv, 88 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov;
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Garcês de Araújo;
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, 2013.

Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Apêndices.
1. Ipê roxo – Melhoramento genético 2. *Handroanthus impetiginosus* I Título.

CDU: 582.916.31



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES
E
DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	TALITA CRISTINA MAMEDES		
CPF:		E-mail:	talitamamedes@hotmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor			
Agência de fomento:			Sigla:
Pais:	UF:	CNPJ:	
Título:	ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex Dc.) Mattos (BIGNONIACEAE) E ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE OÍDIO (<i>Oidium</i> sp.) EM PLÂNTULAS OBTIDAS <i>IN VITRO</i>		
Palavras-chave: Ipê roxo, Cerrado, cultura de tecidos			
Título em outra língua:	<i>In vitro</i> ESTABLISHMENT OF <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos. (Bignoniaceae) AND STUDY OF INCIDENCE OF POWDERY MILDEW (<i>Oidium</i> sp.) IN <i>in vitro</i> SEEDLINGS		
Palavras-chave em outra língua: Ipê roxo, Cerrado, tissue culture.			
Área de concentração:	Conservação e Melhoramento de Espécies do Cerrado		
Data defesa: (dd/mm/aa)	02/04/13		
Programa de Pós-Graduação:	Genética e Melhoramento de Plantas		
Orientador(a):	Sérgio Tadeu Sibov		
CPF:		E-mail:	
Co-orientador(a):	Leila Garcês de Araújo		
CPF:		E-mail:	

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

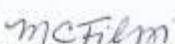
TALITA CRISTINA MAMEDES

TÍTULO: "Estabelecimento *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex Dc.) Mattos (Bignoniaceae) e estudo da incidência de oídio (*Oidium* sp.) em plântulas obtidas *in vitro*"

Dissertação DEFENDIDA em 02 de Abril de 2013, e APROVADA pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov
Orientador - ICB/UFG



Dr.ª Marta Cristina Gorski de Fillippi
Embrapa Arroz e Feijão



Prof.ª Dr.ª Letícia de Almeida Gonçalves
UFG - DBG/Botânica

UFG

Goiânia - Goiás
Brasil

TALITA CRISTINA MAMEDES

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Handroanthus impetiginosus*
(Mart. ex Dc.) Mattos (BIGNONIACEAE) E ESTUDO DA
INCIDÊNCIA DE OÍDIO (*Oidium* sp.) EM PLÂNTULAS OBTIDAS
*IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas. Área de concentração: Conservação e Melhoramento de Espécies do Cerrado.

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Leila Garcês de Araújo

GOIÂNIA, GO - Brasil

2013

Foi o tempo que perdeste com a tua rosa, que fez a tua rosa tão importante.

Antoine de Saint-Exupéry

Ao meu pai, Ramão Mamedes pelo exemplo de determinação, amor e fé.

A minha mãe, Maria de Fátima Mota Mamedes pelo seu amor, orações e companheirismo na minha vida.

A minha irmã e amiga Taisa Alissa Mota Mamedes por me incentivar.

DEDICO

As pessoas que marcam nossas vidas vão ajudando na construção de nossos projetos, e nos desafiam a construí-los. Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para a conquista de mais uma vitória.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, desde o princípio, por permitir a concretização desta importante etapa em minha vida. O meu Senhor sempre foi provedor, capacitador, encorajador e amor em minha vida. Muito obrigada meu Deus pelas vitórias alcançadas até agora.

A meu professor e orientador Dr. Sérgio Tadeu Sibov agradeço pela paciência em ensinar e direcionar, pelo seu dinamismo e a didática para transmitir conhecimentos.

Agradeço a minha coorientadora Leila Garcês Araújo, que me direcionou pelos novos caminhos que surgiram durante o caminho. Muito obrigada, pois sempre que precisei pude contar com sua orientação.

À Maria Tereza por ter contribuído de maneira maravilhosa em meu trabalho, e pela paciência em me ajudar. Maria Tereza a sua colaboração foi essencial neste trabalho.

À Dra Tatiane por nos receber e atender de maneira tão agradável no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic).

Sou grata à UFG pelas instalações, e ao REUNI, por financiar meus estudos e ampliação dos meus conhecimentos, bem como ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, a Coordenação, professores, funcionários e colegas pelo aprendizado e convivência.

Às seguranças Selma e Vaneide, pela amizade, boa companhia e conversas na frente do ICB.

Agradeço os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos. Tive o prazer de conviver com a Jacqueline, Aline, Stella, Carlos e Rejane e aos demais, muito obrigada.

Muito obrigada amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Paulo Faria, Luciano, Daniela, Fernanda Fernandes, aos Diegos, Marcela, Cris Hanny, Andréia, Fernanda Gomes, Níkolás, Raissa, José, Célia, Gabriel e a todos os que passaram pelo laboratório neste período. Vocês são companhias maravilhosas! Foi um prazer trabalhar ao lado de vocês.

Aos meus pais Ramão Mamedes e Maria de Fátima Mota Mamedes, e minha irmã Taisa Alissa Mamedes pelas palavras de afeto, pelo constante incentivo e

sacrifícios, não por natureza, mas por opção de amor. Sou privilegiada por tê-los em minha vida.

Agradeço ao Marcos, meu amor. Seus abraços, sorrisos, ânimo, bom humor, e determinação me fazem querer ser melhor, e o seu amor me enobrece. Obrigada meu bem.

Agradeço a meu grande amigo Elias, participamos da mesma caminhada, tagarelamos, sofremos e sorrimos juntos. Amigo de jornada e poeta de madrugada. Agradeço meu grande amigo de infância Mondrian, sua amizade é valiosa para mim.

Agradeço a minha amiga Analiany que foi um anjo em minha vida, desde que cheguei a Goiânia, começando uma nova vida. Agradeço também o apoio dos amigos da igreja Presbiteriana Graça e Vida, todos são uns amores.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Handroanthus impetiginosus</i> (MART. EX DC.) MATTOS	17
2.2 CULTURA DE TECIDOS	19
2.2.1 Propagação <i>in vitro</i> de lenhosas	20
2.2.2 Micropropagação e reguladores de crescimento	22
2.2.3 Assepsia na cultura de tecidos vegetais	24
2.3 ENDOFÍTICOS	25
2.3.1 Agente patogênico <i>Oidium</i>	27
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
3 ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos. (Bignoniaceae)	
RESUMO	40
ABSTRACT	41
3.1 INTRODUÇÃO.....	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.2.1 Condições de cultivo	43
3.2.2 Germinação <i>in vitro</i>	44
3.2.3 Avaliações anatômicas de folhas de plântulas de <i>H. Impetiginosus</i> obtidas <i>in vitro</i>	45
3.2.4 Multiplicação <i>in vitro</i>	46
3.2.5 Enraizamento <i>in vitro</i>	47
3.2.5.1 Enraizamento <i>in vitro</i> utilizando diferentes concentrações do meio MS, sacarose e ácido naftalenoacético	47
3.2.5.2 Enraizamento <i>in vitro</i> utilizando diferentes concentrações de ácido indolbutírico	48
3.2.6 Análises estatísticas	48

3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.3.1	Germinação <i>in vitro</i>	49
3.3.2	Avaliações anatômicas de folhas de plântulas de <i>H. Impetiginosus</i> obtidas <i>in vitro</i>	51
3.3.3	Multiplicação <i>in vitro</i>	55
3.3.4	Enraizamento <i>in vitro</i>	61
3.4	CONCLUSÕES.....	63
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
4	DETECÇÃO E CONTROLE DE OÍDIO EM <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos. (Bignoniaceae) <i>in vitro</i>	
	RESUMO.....	69
	ABSTRACT.....	70
4.1	INTRODUÇÃO	71
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	72
4.2.1	Controle de oídio <i>in vitro</i>	72
4.2.1.1	Experimento 1: Efeito do etanol e do hipoclorito de sódio no controle de oídio	72
4.2.1.2	Experimento 2: Efeito do Clorotalonil + Tiofanato Metílico, etanol e hipoclorito de sódio no controle de oídio	73
4.2.1.3	Experimento 3: Efeito do etanol, hipoclorito de sódio, Clorotalonil + Tiofanato Metílico e óleo de Neem no controle de oídio	74
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.3.1	Controle oídio <i>in vitro</i>	76
4.3.1.1	Experimento 1: Efeito do etanol e do hipoclorito de sódio no controle de oídio	76
4.3.1.2	Experimento 2: Efeito do Clorotalonil + Tiofanato Metílico, etanol e hipoclorito de sódio no controle de oídio	79
4.3.1.3	Experimento 3: Efeito do etanol, hipoclorito de sódio, Clorotalonil + Tiofanato Metílico e óleo de Neem no controle de oídio	81
4.4	CONCLUSÕES	85
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Tratamentos utilizados visando à descontaminação das sementes e germinação <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	44
Tabela 3.2	Tratamentos utilizados para indução de novos brotos em seguimentos nodais de <i>Handroanthus impetiginosus</i> obtidos de plântulas com 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS	47
Tabela 3.3	Tratamentos utilizados para indução raiz em brotos de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	48
Tabela 3.4	Tratamentos utilizados para indução raiz em brotos de <i>Handroanthus impetiginosus</i> obtidos de plântulas <i>in vitro</i> em meio MS acrescido de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB)	48
Tabela 3.5	Porcentagem de germinação e indivíduos contaminados por fungos e bactérias de <i>Handroanthus impetiginosus</i> submetidas a diferentes tratamentos de descontaminação após 30 dias de cultivo	49
Tabela 3.6	Taxas de multiplicação e porcentagem de explantes com brotos durante a micropropagação de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	56
Tabela 3.7	Porcentagens de explantes com calos e porcentagem de brotos com necrose em explantes durante a micropropagação de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	59
Tabela 3.8	Número médio de brotos e comprimento do maior broto em explantes durante a micropropagação de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	60
Tabela 3.9	Número folhas em brotos durante a micropropagação de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	60
Tabela 3.10	Indução raiz em brotos de <i>Handroanthus impetiginosus</i> obtidos de plântulas <i>in vitro</i> em meio MS sob de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) após 40 dias de cultivo	62
Tabela 4.1	Tratamentos constituídos por diferentes períodos de imersão (em minutos) das sementes de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em água destilada, etanol (70%) e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) ..	73
Tabela 4.2	Tratamentos constituídos por períodos de imersão (em minutos) das sementes de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em etanol 70%, Cerconil (Clorotalonil + Tiofanato Metílico) 1% e 2% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo)	74

Tabela 4.3	Escala de avaliação da severidade de oídio em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> obtidas por germinação <i>in vitro</i> . Escala modificada de Paz Lima et al. (2004)	75
Tabela 4.4	Tratamentos constituídos por períodos de imersão (em minutos) das sementes de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em etanol 70%, Cerconil WP (Clorotalonil + Tiofanato Metílico) 1% e 2%, hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e óleo de Neen (1,5%) visando sua descontaminação e posterior germinação <i>in vitro</i>	75
Tabela 4.5	Médias em porcentagem de incidência de oídio em plântulas de <i>H. impetiginosus</i> aos 20, 40 e 60 dias após o estabelecimento <i>in vitro</i> .	79
Tabela 4.6	Médias de severidade de oídio em plântulas de <i>H. impetiginosus</i> aos 60, 80 e 100 dias após estabelecimento <i>in vitro</i>	80
Tabela 4.7	Médias em porcentagem de incidência de oídio em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em oito avaliações*.....	83
Tabela 4.8	Severidade de oídio em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em oito avaliações*, e área abaixo da curva de progresso da severidade de oídio (AACPD)	83

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** Seleção e descontaminação de sementes de *Handroanthus impetiginosus*. Seleção de frutos (A), retirada das alas membranáceas das sementes (B), desinfestação das sementes utilizando de soluções de etanol 70% e Hipoclorito de sódio 2% (C), inoculação *in vitro* em meio MS (D). Barra = 1 cm 45
- Figura 3.2** Severidade e microscopia óptica de *Oidium* sp. em *Handroanthus impetiginosus*. A e B - Face inferior de folha de *H. impetiginosus* com *Oidium*, exibindo sintomas do patógeno. Barras: 1 cm. C e D - Corte transversal das folhas com micélio na região abaxial. E - Conidióforos e conídios em microscopia de luz. F - Detalhe do conídio (Barra: 50 µm: C, D, E, 30µm: F) 53
- Figura 3.3** Alterações anatômicas em tecidos de folhas provenientes do cultivo *in vitro* causadas pela presença do fungo *Oidium* sp. Cortes da região mediana da lâmina foliar indicando alterações na região abaxial da folha sob os estômatos (**es**) em (A) e com maior detalhe em (B). Presença do fungo (**fg**) *Oidium* sp. no interior da elevação que se forma abaixo dos estômatos corada com lactofenol (C). Denselvovimento externo de hifas (**hf**), micélio e diferenciação em codidióforos (D) 54
- Figura 3.4** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicando a colonizando por *Oidium* sp da região abaxial de folhas *Handroanthus impetiginosus* desenvolvidas *in vitro*. A) Conjunto de hifas e diferenciação em conídio (cn) a partir da região dos estômatos (es). B) Início formação conídio (cn). C) Elevação da região epidérmica sob os estômatos (es) e formação de conídio (cn). D) Presença de micélio e formação de vários conidióforos (cn). Barras: A: 100 µm; B, C e D: 500 µm 55
- Figura 3.5** Explantes submetidos à multiplicação de brotos. Segmento nodal com duas gemas axilares após 10 de cultivo (A); broto após 40 dias os tratamentos de indução a multiplicação de brotos (B); Indução de brotos (C, D); Indução de calos na região basal dos explantes (E); Calogênese e indução de brotos (F). Barras = 1 cm .. 58
- Figura 4.1** Porcentagem de incidência de oídio em plântulas de *H. impetiginosus* estabelecidas *in vitro* 30 dias após a inoculação de sementes em meio MS e que foram submetidas a diferentes tratamentos de descontaminação. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,5$). 77
- Figura 4.2** Sintomas de *Oidium* em *Handroanthus impetiginosus* *in vitro*. Enrolamento das folhas (A); encanoamento das folhas (B); necrose

do caule de excesso de brotação (C, D) 77

Figura 4.3

Curva do progresso da severidade do oídio em plântulas de *Handroanthus impetiginosus*. T1 – 2 min. álcool 70% e 10 min. NaOCl; T2 – 2 min. álcool 70%, 5 min. de Clorotalonil + Tiofanato Metílico, 10 min. NaOCl; T3 – 15 min. de Clorotalonil + Tiofanato Metílico; T4 – 10 min. Nim a 1,5%. Severidade: 0 - ausência de sintomas a 5 - infecção muito severa. Valores entre parênteses na legenda representam a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV = 15,96 % 84

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

% - Porcentagem

± - Variando entre

> - Maior

μL – Microlitro

°C – Graus Celsius

2,4-D – 2,4 ácido diclorofenoxiacético

AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença

ABA – Ácido abcísico

AIA – Ácido indolacético

AIB – Ácido Indol-Butírico

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – 6-Benzilaminopurina

BA – Benziladenina

cm – Centímetros

CO₂ – Dióxido de carbono

CV – Coeficiente de variação

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAA₇₀ – Formaldeído, ácido acético glacial e etanol a 70 %

g - Grama

GA₃ – Ácido giberélico

GL – Graus de liberdade

GO – Goiás

h – Horas

ha – hectares

ITTO – International Tropical Timber Organization (Organização Internacional de Madeira Tropical)

KIN - Cinetina

Km – Kilômetros

LCTV – Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais

m – Metros

mg.L⁻¹ – Miligrama por litro

min. – Minutos

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mmol m⁻² s⁻¹ – micromol por metro quadrado por segundo

MS – Meio Murashige & Skoog (1962)

MS^{1/2} – Meio Murashige & Skoog (1962) com redução à metade da concentração dos macronutrientes

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NaOCl – Hipoclorito de sódio

p – p valor

pH – Potencial hidrogeniônico

sin. – Sinonímia

sp. – Espécie

T – Tratamentos

TDZ - Thidiazuron

t – teste t

v/v – Volume por volume

WPM – Wood Plant Médium

RESUMO

MAMEDES, T. C. **Estabelecimento *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex Dc.) Mattos. (Bignoniaceae) e estudo da incidência de oídio (*Oidium* sp.) em plântulas obtidas *in vitro*.** 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.¹

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos é uma espécie arbórea de ampla distribuição no território brasileiro. Possui importância econômica por seu uso madeireiro, medicinal, ecológico e ornamental. Há grande variação na produção de frutos e sementes no decorrer dos anos, muitas das sementes produzidas são atacadas por fungos e insetos e, finalmente, as sementes que restam intactas perdem a viabilidade muito rapidamente. Técnicas de cultura de tecidos vegetais podem aumentar esta taxa de germinação em espécies arbóreas. O cultivo em meio nutritivo sob condições assépticas, proporciona grande produção de mudas em tempo e espaço reduzidos e em qualquer época do ano. Além disso, a propagação *in vitro* atua como ferramenta na identificação de microorganismos, estudando suas relações e interações com a planta hospedeira em níveis genético, celular e fisiológico. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* de *H. impetiginosus*, desenvolvido em três etapas: descontaminação e germinação das sementes, indução de novos brotos e enraizamento. O protocolo foi baseado na organogênese direta, utilizando material vegetal de plântulas germinadas *in vitro*. Na germinação *in vitro* a contaminação superficial das sementes foi controlada utilizando 2 min. em etanol 70% e 10 min. em hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo. A taxa de germinação foi de 99 % em meio MS. A indução e multiplicação de novos brotos foram realizadas com o auxílio dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) em diferentes combinações. Os resultados mostraram que, para explantes de *H. impetiginosus*, todas as quantidades testadas de BAP e de ANA possuem a capacidade de regenerar brotos, calos e raízes adventícias, sendo necessário aperfeiçoar o protocolo de regeneração para obter número maior de novas brotações. No enraizamento *in vitro*, estacas caulinares responderam de maneira positiva a 6,0 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), com 92% de enraizamento. Porém, os métodos de descontaminação de sementes não controlaram fungos do gênero *Oidium* sp. Com o objetivo de identificar o fungo e estudar a relação fungo-hospedeiro em *H. impetiginosus in vitro* foram feitos cortes anatômicos de fragmentos foliares analisados com microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. Após o aparecimento de *Oidium* sp. nas plântulas desenvolvidas *in vitro*, métodos de controle da doença em sementes foram testados para a germinação *in vitro* utilizando diferentes tempos e concentrações de etanol, hipoclorito de sódio, Clorotalonil + Tiofanato Metílico (fungicida sistêmico) e óleo de Nim avaliando a incidência e severidade desta doença em cada tratamento. Em nenhum tratamento houve o controle efetivo do oídio, indicando a necessidade de novos estudos. Porém, a redução da severidade foi observada em sementes tratadas com etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e imersão em óleo de Nim a 1,5% por 10 minutos.

Palavras-chave: Ipê roxo, Cerrado, cultura de tecidos.

¹ Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

ABSTRACT

MAMEDES, T. C. *In vitro* establishment of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. (Bignoniaceae) and study of incidence of powdery mildew (*Oidium* sp.) in *in vitro* seedlings. 2013. 88 f. Dissertation (Master in Agronomy: Genetic and Plant Breeding) – College of Agronomy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.¹

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos is widely distributed woody species in Brazil. It has economic importance for its use as wood, medicinal, ecological and ornamental tree. There is great variation in the production of fruits and seeds over the years, many of the seeds are attacked by fungi and insects, and finally, the remaining intact seeds lose viability very quickly. Techniques of plant tissue culture can increase the rate of germination in woody species. The cultivation in nutrient medium under aseptic conditions, provides great production of seedlings in reduced time and space and at any time of year. Furthermore, *in vitro* propagation acts as a tool in the identification of microorganisms, studying their relationships and interactions with the host plant at genetic, cellular and physiological levels. The aim of this study was to establish a protocol for *in vitro* propagation of *H. impetiginosus* developed in three steps: decontamination and seed germination, induction of new shoots and roots. The protocol was based on direct organogenesis using plant material from seedlings germinated *in vitro*. For *in vitro* germination, seed surface contamination was controlled using 2 min. in 70% ethanol and 10 min. sodium hypochlorite with 2 % active chlorine. The germination rate was 99 % on MS medium. Induction and multiplication of new shoots were carried out with the aid of growth regulators 6 - benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA) in different combinations. The results showed that for explants of *H. impetiginosus* all the tested amounts of BAP and NAA have the ability to regenerate shoots, callus and adventitious roots, it is necessary to improve the regeneration protocol to obtain greater number of new shoots. For *in vitro* rooting, cuttings responded positively to 6.0 mg L⁻¹ butyric acid (IBA), with 92 % rooting. However, the methods of decontamination of seeds did not control fungi of the genus *Oidium*. In order to identify the fungus and study the fungus - host relationship in *H. impetiginosus* cuts were made *in vitro* leaf fragments and the anatomical structure analyzed by optical microscope and scanning electron microscope. After the emergence of *Oidium* sp. on seedlings developed *in vitro*, methods of seeds disease control were tested for germination using different times and concentrations of ethanol, sodium hypochlorite, Chlorothalonil + tiophanate Methyl (systemic fungicide) and Neem oil assessing the incidence and severity of each disease treatment. No treatment was effective in the control of powdery mildew, indicating the need for further studies. However, reduction of severity was observed in seeds treated with 70 % ethanol and sodium hypochlorite (2% active chlorine) and Neem oil immersion to 1.5 % for 10 minutes.

Key words: Ipê roxo, Cerrado, tissue culture.

¹ Adviser: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, conhecida popularmente como ipê roxo, pertence à família Bignoniaceae que engloba cerca de cento e vinte gêneros e oitocentas espécies (Grose & Olmstead, 2007a, b). A espécie é caducifólia ocorrendo tanto na mata pluvial atlântica como na floresta semidecídua (Lorenzi & Matos, 2002) abrangendo os domínios da Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Cerrado (Lohmann, 2012). As folhas são opostas digitadas e com cinco folíolos, possui flores grandes rosadas a lilás, tubulares, reunidas em panícula terminal. O fruto cilíndrico é deiscente com numerosas sementes. As sementes são cordiformes com presença de asa membranácea nas duas extremidades de cor marrom clara, sendo sua dispersão anemocórica (Reitz et al., 1988; Carvalho, 1994).

H. impetiginosus é uma arbórea amplamente utilizada para múltiplos fins, como madeira para serraria, mourões, usos medicinais, arborização e recuperação de áreas degradadas (Lorenzi & Matos, 2002; Gemaque et al., 2002). A espécie tem sido indicada para recuperação de matas ciliares, plantadas mais próximos aos leitos dos rios, sujeitas a inundações ou enchentes periódicas (Lima, 2004). Além disso, tem importante valor econômico considerando-se a durabilidade e a resistência de sua madeira utilizada em construções e confecções de vigas e assoalhos finos (Lorenzi, 2002; Paes et al., 2005).

A propagação via semente de *H. impetiginosus* possui dificuldades como produção irregular de frutos, característica comum para muitas espécies arbóreas do Cerrado (Högberg et al., 1998). As sementes apresentam baixa viabilidade e longevidade, não excedendo três meses (Maeda E Matthes, 1984; Lorenzi & Matos, 2002), e são atacadas por insetos e fungos antes e após a maturação fisiológica (Botelho et al., 2008), como também acontece em *Handroanthus serratifolius* (A.H.Gentry) S. Grose. Os maiores problemas ligados a doenças ocorrem durante a germinação e formação de mudas em viveiro e são geralmente causados por fungos (Vechiato, 2010).

Oidium sp. é um fungo patogênico, biotrófico, que causa a doença oídio em vários grupos de plantas. Além das espécies florestais, são encontradas em hortaliças,

plantas frutíferas e ornamentais (Grigoletti Junior et al., 2005). Oídios causam alterações fisiológicas no hospedeiro inibindo a fotossíntese e a transpiração com o aumento da infecção (Mignucci & Boyer, 1979). Estima-se que a diversidade de fungos desta família seja grande no Cerrado por possuir condições climáticas favoráveis de desenvolvimento. Porém, pesquisas sobre este grupo de fungos ainda são poucas. Alencastro Filho (2006) identificou espécies de oídios associados a várias arbóreas hospedeiras no Cerrado incluindo o gênero *Handroanthus*.

Em programas de domesticação e melhoramento genético, dominar a fase de propagação da espécie é muito importante. A propagação *in vitro* permite a produção de mudas com controle fitossanitário, em larga escala, em espaço reduzido e no menor tempo. Porém, para obter altas taxas de multiplicação é necessário o ajuste do respectivo protocolo (Schuch & Erig, 2005). A propagação *in vitro* vem se destacando como ferramenta para a implantação de florestas clonais, substituindo as práticas convencionais por técnicas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos (Bassan, 2006). Além disso, convém utilizar do controle das variáveis ambientais que a propagação *in vitro* proporciona como ferramenta no estudo das relações e interações de micro-organismos com a planta hospedeira em níveis genético, celular e fisiológico (Barrow et al., 2004).

Visando proporcionar melhor entendimento dos fatores de crescimento e desempenho de plantas sob condições *in vitro*, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* da espécie *H. impetiginosus*, além de contribuir para o melhor entendimento das interações desta espécie com micro-organismos nestas condições de cultivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos tem como sinonímia botânica *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.), *Tabebuia avellanadae* Lor, e *Tecoma impetiginosa* Mart. ex DC. É uma espécie arbórea da família bignoniaceae conhecida como pau d'arco, ipê roxo de bola, ipê una, casquinho e ipê roxo da mata (Gemaque et al., 2002). Suas plantas podem atingir de 8,0 m a 12,0 metros de altura, com tronco de 60 cm a 90 cm de diâmetro. Apresentam folhas compostas folioladas; folíolos coriáceos, pubescentes em ambas as faces, de 9,0 cm a 18,0 cm de comprimento por quatro a 10 cm de largura. As flores são infundibuliformes e numerosas, de coloração rósea ou arroxeadas, e despontam em volumosas inflorescências (Lorenzi & Matos, 2002). As sementes são cordiformes a oblongas planas com superfície lisa lustrosa de cor marrom-clara, com ala membranácea marrom clara transparente de até três centímetros de comprimento (Reitz et al., 1988; Carvalho, 1994).

Bignoniaceae é uma família de distribuição pantropical, com cerca de cento e vinte gêneros e oitocentas espécies. O gênero *Handroanthus* foi segregado do gênero *Tabebuia* Gomes ex DC, baseado em estudos de filogenia molecular. O gênero *Handroanthus* possui 30 espécies catalogadas até o momento e está distribuído por toda América Central e do Sul (Grose & Olmstead, 2007 a, b) e indivíduos destas espécies podem ser encontrados em habitats secos, úmidos e encharcados (Gentry, 1980).

Considerando as divergências taxonômicas acerca dos gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia* e a escassez de trabalhos anatômicos do grupo, há grande dificuldade de identificação das espécies em estado vegetativo. Grose & Olmstead (2007 a, b), utilizando estudos de filogenia molecular, segregaram gêneros polifiléticos da família Bignoniaceae. Silva et al. (2009) estudaram anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de *Handroanthus* e *Tabebuia* de ocorrência no Brasil e Lozano & Zapater (2009) realizaram

um levantamento de espécies nativas e exóticas de *Tabebuia* e *Handroanthus* na Argentina.

De acordo com Lorenzi & Matos (2002), *H. impetiginosus* cresce tanto na mata pluvial atlântica como na floresta semidecídua. Ocorre tanto no interior da floresta primária, como nas formações secundárias. É uma planta decídua durante a época da seca. A espécie possui origem nativa, porém não é endêmica do Brasil. Ocorre nos domínios geográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Sua distribuição geográfica é da região Norte (Pará, Tocantins), Nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) (Lohmann, 2012).

H. impetiginosus é utilizada para fabricação de móveis, mourões e assoalhos finos (Lorenzi & Matos, 2002). Sua floração é abundante, proporcionando efeito paisagístico admirável. Esta espécie foi intesamente explorada nas regiões de ocorrência natural, restando poucas árvores isoladas. Por esses fatos, tem sido utilizada em trabalhos de restauração de ecossistemas florestais e de paisagismo. Assim, a utilização de sementes nestes processos é de grande importância, visto que sua propagação se dá prioritariamente por via sexuada (Gemaque et al., 2002).

Estudos relacionados à germinação de *H. impetiginosus* já foram realizados referentes à maturidade fisiológica das sementes (Gemaque et al., 2002), influência da temperatura e controle das giberelinas endógenas (Silva et al., 2004), temperatura e regime de luz na germinação (Oliveira et al., 2005) e cor e tamanho das sementes que influenciam seu potencial fisiológico e sua viabilidade (Amaral et al., 2011). Todos estes trabalhos indicaram melhores formas de armazenamento, utilização e manutenção da viabilidade das sementes.

A respeito da demanda nutricional da espécie, alguns trabalhos já foram realizados. Souza et al. (2006) constataram que a sequência de exigência nutricional de *H. impetiginosus* sin. *T. impetiginosa* é P> N> S> B> Zn> Mg> Ca> K. Em ambiente contaminado com vários metais pesados. Marques et al. (2000) verificaram que *H. impetiginosus* foi uma das espécies menos afetadas pela contaminação. Complementando estes resultados, Paiva et al. (2002) estudaram o índice de translocação de nutrientes em mudas de *H. impetiginosus* submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. Os autores concluíram que a aplicação de cádmio e níquel aumentam o índice de translocação

de P, K, Ca, Mg, S e Zn nas mudas. E o chumbo não interfere na translocação de K, Ca, Mg e Mn, mas diminui a translocação de P, S, Cu, Fe e Zn. Estes resultados indicam para que tipo de áreas em recuperação *H. impetiginosus* pode ser utilizado.

Resultados de análises fitoquímicas de *H. impetiginosus* registraram como componentes da madeira: naftoquinonas, principalmente o lapachol, a lapachona e alguns de seus derivados (alfa-lapachol, beta-lapachol, dihidro-lapachol), além do lapachenol; furanonaftoquinona, antraquinona, flavonóide (quercetina) e o ácido hidroxibenzóico (Almeida 1993; Lorenzi & Matos 2002). As análises também indicam a existência de outros compostos: taninos; resinas; minerais; saponinas e cumarinas (Panizza, 1997).

O lapachol é uma naftoquinona encontrada em várias espécies de plantas da família Bignoniáceas. Conhecido por suas propriedades anticancerígenas possui ainda propriedades anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária antitripanossoma, e antiulcerogênica (Araújo et al., 2008).

O extrato da casca de *H. impetiginosus* mostrou forte atividade antifúngica observada *in vitro* para o tratamento de doenças da pele causada por fungos filamentosos e leveduras (Portillo et al., 2001), antioxidante dos compostos voláteis (Park et al., 2003), inibição de bactérias intestinal humana (Park et al., 2005), antiplaquetária e antiproliferativa em ratos e coelhos (Son et al., 2006) e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* em ratos (Byeon et al., 2008). Silva (2006) avaliou a atividade anti-inflamatória e concluiu que os extratos hidroalcoólicos da casca e das folhas de *H. impetiginosus* apresentaram atividade antiedematogênica. Na avaliação dos extratos de flor e folha, o autor indicou potente efeito analgésico, mesmo quando as concentrações foram reduzidas.

2.2 CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos, propagação *in vitro* ou micropropagação detém as técnicas por meio das quais pequenos fragmentos de tecido vegetal, designados explantes, ou embriões de sementes, são cultivados em meio nutritivo que sustente o seu crescimento sob condições assépticas (Torres et al., 1998; Rezende, 2005). As vantagens potenciais em relação à propagação por métodos convencionais são: pequena quantidade de explantes necessária para iniciar a cultura, propagação em qualquer época do ano com mudas uniformes, sadias, produzidas em escala comercial em pouco espaço e tempo reduzido. Além disso, técnicas de cultivo *in vitro* possibilitam realizar pesquisas de apoio às

diferentes áreas da biologia como genética, fitopatologia e a fisiologia vegetal (Litz et al., 1984; Cid & Teixeira, 2010).

A cultura de tecidos vegetais teve grande impulso nas últimas décadas, sendo sua utilização rotineira em muitas empresas do ramo florestal. O principal motivo deste avanço é a constatação de ser uma ferramenta tecnológica viável para a produção de mudas de alto padrão genético, fisiológico e sanitário. A propagação vegetativa *in vitro* vem-se destacando, como ferramenta para a implantação de florestas clonais, substituindo as práticas convencionais por técnicas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos (Bassan, 2006).

O sucesso da propagação *in vitro* baseia-se na capacidade que as células vegetais possuem de redefinir seu padrão de desenvolvimento e diferenciação, podendo originar novos órgãos ou mesmo todo o indivíduo (totipotência). Esta redefinição da morfogênese é influenciada por vários fatores como tipo de material vegetal utilizado no início da cultura (explante), componentes nutricionais, reguladores de crescimento e condições de incubação (Giri et al., 2004). Além disso, também é importante a disponibilidade de material, nível de contaminação com micro-organismos, juvenildade do tecido e estação do ano no momento da coleta do material vegetal (Cid & Teixeira, 2010).

A taxa de germinação de sementes de algumas espécies pode ser aumentada quando são utilizados métodos de cultura de tecidos, principalmente, quando as sementes apresentam dormência, endosperma reduzido ou grande infestação por micro-organismos (Pasqual, 2001). A germinação *in vitro* oferece uma alternativa para a propagação de espécies do Cerrado. Como exemplos, a obtenção de mudas de pequi, araticum e buriti. Nestas espécies, as sementes germinam de maneira irregular e podem demorar meses na sementeira (Rizzi, 1973). Utilizando meios de cultura estéreis e a adição de reguladores de crescimento, como giberelinas, as taxas de germinação podem ser maiores e a germinação mais uniforme.

2.2.1 Propagação *in vitro* de lenhosas

De acordo com a *International Tropical Timber Organization* - Organização Internacional de Madeira Tropical (ITTO) os países são classificados em relação as seus recursos florestais. Um país é considerado produtor quando é dotado de recursos florestais tropicais e/ou exportador líquido de madeiras tropicais em termos de volume. Atualmente

existem 33 países produtores, com o Brasil ocupando o segundo lugar entre os produtores da América Latina (ITTO, 2012). As espécies mais plantadas no Brasil são eucaliptos com 81,2 %, pinus 18,4 % e outras 0,4 (Bracelpa - Associação Brasileira de Celulose e Papel, 2011).

A cultura de tecidos vegetais pode ser utilizada para a multiplicação de genótipos de interesse e armazenamento de exemplares em bancos de germoplasma. Barreiras metodológicas que dificultam o melhoramento genético das arbóreas florestais como seu grande porte e longos ciclos de desenvolvimento, podem ser contornadas pela aplicação de técnicas de cultivo *in vitro*. No entanto, outras características inerentes à biologia de certas espécies florestais (por exemplo, o grande genoma dos pinheiros e a recalcitrância de tecidos de árvores adultas para manipulação *in vitro*) continuam a apresentar desafios para os pesquisadores (Merkle & Dean, 2000).

Técnicas de propagação *in vitro* estão colaborando também para a manutenção de espécies como *Tabebuia donnell-smithii* (Bignoniaceae), que ainda não é domesticada, mas que possui um forte apelo econômico e indisponibilidade de sementes para suprir a demanda. *Tabebuia donnell-smithii* é uma importante arbórea tropical e produtora de madeira para colheita florestal. Devido aos benefícios ambientais e econômicos que possui, sua madeira está em alta demanda, chegando a até três vezes o preço da madeira de espécies de Pinus. A clonagem desta espécie tem sido feita via gemas axilares de árvores adultas, com alta taxa de brotos por explante (González-Rodríguez et al., 2010).

Nunes et al. (2002) desenvolveram um protocolo de micropropagação para *Cedrela fissilis* (Meliaceae) utilizando segmentos nodais de origem juvenil para proliferação de gemas axilares. A proliferação e multiplicação de ramos foram realizadas utilizando o regulador de crescimento 6-benziladenina (BAP) e a adição de ácido naftalenoacético (ANA) para enraizamento das plantas regeneradas. Vila et al. (2009) também trabalhando com *Cedrela fissilis*, obtiveram plântulas através do processo de embriogênese somática. A partir de embriões zigóticos e com auxílio dos reguladores de crescimento 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e BAP, os autores obtiveram calos embriogênicos e conversão em plantas. A micropropagação otimizada e protocolos de cultivos de calos, oferecem a possibilidade de uso para propagação vegetativa, criopreservação e estudos sobre o metabolismo secundário (Nunes et al., 2002).

Caesalpinia echinata Lam. (pau-brasil) tem sido estudada visando o controle da calogênese com os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP em meio de cultura

(Werner et al., 2009). Os autores utilizaram folíolos juvenis cultivados e diferenciados em calos embriogênicos. A partir destes calos, obtiveram embriões somáticos na fase globular e codiforme. De maneira geral, os calos apresentaram aspectos friáveis, não embriogênicos, com acúmulo de fenóis e presença de áreas meristemáticas. A regulação da calogênese é o primeiro passo para a embriogênese somática indireta *in vitro* (Werner et al., 2009).

2.2.2 Micropropagação e reguladores de crescimento

O estabelecimento *in vitro* de explantes corresponde à primeira etapa de um sistema de micropropagação, com início na seleção dos explantes mais adequados para posterior multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998). O sucesso de um protocolo de micropropagação depende da etapa de estabelecimento *in vitro*. As próximas etapas de multiplicação e futura transferência para condições *ex vitro* só podem ser realizadas após o estabelecimento de culturas assépticas e com bom vigor vegetativo (George & Debergh, 2008). O tipo de explante deve ser selecionado de acordo com a sua capacidade para se adequar às condições *in vitro*, sendo recomendados os que possuam maior proporção de tecido meristemático por apresentarem uma maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia & Machado, 1998).

Os hormônios vegetais são biomoléculas produzidas pelas plantas com o objetivo de induzir respostas fisiológicas, tais como indução de raízes, indução de brotos, alongamento de entrenós entre outros (Cid & Teixeira, 2010). Uma das características da micropropagação é a capacidade do maior controle das diferentes fases do crescimento dos explantes *in vitro*. Isso não seria possível, sem adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, que são substâncias sintéticas aplicadas externamente nos explantes, que possuem ações similares às dos grupos de hormônios vegetais naturalmente produzidos pelas plantas (citocininas, giberelinas, auxinas e etileno) (Vieira & Castro, 2002).

Entre os reguladores de crescimento mais utilizados na propagação *in vitro* e que desempenham importante papel na regeneração de plantas em várias espécies vegetais estão as citocininas e as auxinas. A disponibilidade e a interação desses dois reguladores de crescimento podem modular a formação de raízes e parte aérea (Skoog & Miller, 1957). O controle da organogênese nas plantas pode trazer um grande impacto para agricultura e

setor florestal, sobretudo com direcionamento seletivo da produção de raízes, brotos, flores e frutos (Lemos, 2010).

A adição exógena de reguladores de crescimento ao meio de cultura desencadeia uma alteração do balanço hormonal endógeno dos tecidos dos explantes. A adição de citocininas, por exemplo, interfere no balanço interno das citocininas endógenas e desencadeiam uma resposta de indução de novos meristemas de brotos (Lemos, 2010).

No processo de regeneração direta *in vitro*, a utilização de segmentos nodais é feita, baseada na indução do crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas. Os segmentos nodais contendo as gemas são isolados e inoculados *in vitro*, sendo estas estimuladas ao crescimento, dando origem a brotos (Grattapaglia & Machado, 1998).

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares provenientes de plântulas, assim como de material adulto, tem sido uma das mais utilizadas, com sucesso em várias espécies vegetais, inclusive em espécies lenhosas, como *Eucalyptus*. No entanto, entre os principais problemas neste método de micropropagação, aparece a recalitrância (falta de resposta morfogenética) de várias espécies ao cultivo *in vitro* e a contaminação do material por micro-organismos (Xavier et al., 2009). Nos últimos anos, muitas arbóreas foram propagadas *in vitro* via segmentos nodais obtendo taxas significativas de multiplicação como para *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Horbach et al., 2011), *Caesalpinia echinata* Lam. (Aragão et al., 2011), *Cedrela odorata* L. (García-González et al., 2011), *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith (Fermino Junior & Scherwinski-Pereira, 2012), *Eugenia involucrata* DC. (Golle et al., 2012), *Bowdichia virgilioides* Kunth (Moura et al., 2012) entre outras.

Uma das etapas que pode dificultar o estabelecimento de um protocolo de micropropagação é o enraizamento. O desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *ex vitro* é um processo complexo envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente esclarecidos (Souza & Pereira, 2007).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as auxinas estão presentes em 80% dos meios de enraizamento podendo ser adicionadas sozinhas ou em combinação. As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares (Três & Ziegler, 1991). As auxinas mais comuns empregadas nos meios de enraizamento são o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido

indolacético (AIA). A diferença entre elas, além da parte estrutural da molécula, é a estabilidade que decresce respectivamente. Sendo assim, a maior parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, utilizam as auxinas ANA e AIB (Souza & Pereira, 2007).

Espécies com dificuldade de enraizamento, como as lenhosas, produzem e metabolizam mais rapidamente o AIA endógeno, se comparadas às espécies com facilidade de enraizamento (Ford et al., 2001). Este fato indica uma baixa concentração de AIA livre para ser transportado para a base das estacas onde ocorrerá o enraizamento. Quando algumas espécies são expostas a ação de reguladores de crescimento, o nível de AIA endógeno é elevado, porém decresce antes da formação das raízes, o que dificulta ou impossibilita o enraizamento (Ford et al., 2001).

Além dos níveis de auxina endógenos, outros fatores também contribuem para existência da dificuldade de enraizamento em lenhosas como: as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade e genótipo, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, compostos fenólicos, condições de cultivo das plântulas, dentre outros (Souza & Pereira, 2007).

A bibliografia sobre estudos *in vitro* do gênero *Handroanthus* é relativamente pequena quando comparada a outras espécies florestais. Porém, alguns trabalhos já foram feitos com *H. impetiginosus* por Jausoro et al. (2010) que observou alterações anatômicas em brotos e raízes ocasionadas pelo cultivo *in vitro*. Larraburu et al. (2011) utilizaram diferentes concentrações de BAP e ácido indol butírico (IBA) e obtiveram ótima taxa de multiplicação em meio WPM (*Wood Plant Medium* - Lloyd & Mccown, 1980). O enraizamento com IBA em ½ MSG (Murashige & Skoog suplementado com vitaminas de Gamborg et al., 1968) produziu 83% de enraizamento com 3,2 raízes por brotos. Martins et al. (2011) pesquisando a aclimatização de *H. impetiginosus* germinadas *in vitro* constataram que a concentração 75% do meio MS foi a mais eficiente na manutenção do vigor de mudas.

2.2.3 Assepsia na cultura de tecidos vegetais

A desinfestação, ou seja, a remoção de contaminantes existentes na superfície do explante oriundo de material do campo ou de casa de vegetação é um passo inevitável na propagação *in vitro*. A contaminação é constituída por fungos, bactérias ou mesmo

pequenos insetos. Contaminações por vírus já são mais difíceis de diagnosticar (Cid & Teixeira, 2010).

A micropropagação de plantas possibilita a propagação em grande escala de genótipos selecionados. No entanto, a contaminação por micro-organismos continua sendo um dos grandes problemas para a aplicação dessa técnica podendo chegar a ser um fator limitante para o estabelecimento *in vitro* de certos explantes (Ribas et al., 2003). Mesmo tomando todas as precauções de uma assepsia rotineira, às vezes não é possível contornar totalmente a contaminação por esta ter base endógena (Cid & Teixeira, 2010).

Segundo Ferreira (1989), a contaminação fúngica na germinação de sementes de *H. impetiginosus* sin. *Tabebuia impetiginosa* é um dos principais problemas, especialmente em testes realizados em incubadoras ou germinadores que dão condições ideais para o desenvolvimento e a disseminação de alguns fungos associados às sementes. Estes podem causar o apodrecimento das sementes e dificultar o diagnóstico correto da qualidade fisiológica do lote reduzindo o número de plantas emergidas. Tal fato demonstra a necessidade de utilização de produtos que visam à eliminação destes patógenos.

Em teste de sanidade em sementes florestais nativas, submetidas à assepsia Botelho et al. (2004) constataram que a maior parte dos fungos associados às sementes encontrava-se na superfície. Fungos externos, por estarem mais expostos aos agentes desinfestantes, são erradicados com maior eficiência em relação àqueles que vivem internamente aos tecidos. Estes podem sobreviver por mais tempo e ter maior probabilidade de causar problemas na planta *in vitro*. Porém, mesmo utilizando compostos antifúngicos e antibacterianos de amplo espectro, frequentemente estes produtos falham em eliminar todos os micro-organismos alvos, além de apresentarem efeitos colaterais negativos no crescimento e/ou enraizamento de explantes em culturas de tecidos vegetais (Costa et al., 2010).

2.3 ENDOFÍTICOS

Embora o entendimento sobre a identidade, fontes e epidemiologia dos diferentes contaminantes microbianos tenha avançado nos últimos anos, a detecção de contaminantes bacterianos latentes e a eliminação da contaminação fúngica de culturas estabelecidas *in vitro* permanecem à espera de desenvolvimento de novas estratégias (Costa et al., 2010).

Autores divergem em relação às definições de micro-organismos endofíticos. Esses micro-organismos foram definidos, por Hallmann et al. (1997), como micro-organismos isolados de tecidos vegetais apenas desinfestados superficialmente ou isolados de partes internas das plantas, e que não causam danos ao hospedeiro incluindo relações neutras e simbióticas. Johnston-Monje & Raizada (2011) definem os endofíticos como, micro-organismos não patogênicos que vivem no interior das plantas e Melo (2007, 2013) define endofíticos como micro-organismos associados às plantas que vivem sistematicamente no seu interior sem causar aparentemente danos a seus hospedeiros.

Para Azevedo et al. (2000) todos os organismos que habitam, pelo menos durante um período de seus ciclos de vida no interior de um vegetal podem ser considerados endofíticos. Os fungos epifíticos são aqueles que vivem na superfície das plantas e os fungos patogênicos são os que causam moléstias em plantas. O autor comenta que a distinção destes micro-organismos é de cunho didático, não sendo possível ainda definir limites entre as três categorias. Azevedo (1999) indica que fungos endofíticos, podem tornar-se patógenos conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos. Um micro-organismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por certo período, causando ou não danos à mesma (Cassells, 1991; Azevedo, 1999).

Partida-Martínez & Heil (2011) utiliza o termo endofítico para todos os micro-organismos que se desenvolvem dentro de tecidos vivos da planta como sugere a etimologia da palavra. Para o autor é impossível avaliar as formas de interações de micro-organismos em todos os conjuntos possíveis de condições ambientais. Existem endofíticos cuja presença em certas condições provoca efeitos negativos, tornando-se patogênicos. Enquanto micro-organismos com efeitos neutros ou positivos sobre o hospedeiro representam os "clássicos" endofíticos.

A atividade de alguns fungos endofíticos em seus hospedeiros já foi relatada na literatura. Já foram identificados alguns endofíticos em lenhosas como em *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham (Souza et al., 2004), *Anacardium occidentale* (Bezerra et al., 2009), *Pinus taeda* L. (Pimentel et al., 2010), *Piper aduncum* L. (Piperaceae) (Silva et al., 2010) e *Luehea divaricata* Martius (Targa et al., 2011).

Muitos fungos endofíticos são transmitidos através das sementes, ou seja, verticalmente à própria descendência (Johnston-Monje & Raizada, 2011). Barros et al. (2000) comentam que fungos do gênero *Oidium* podem ser transportados pela semente,

mas esta tem pouca importância como agente de dispersão para a cultura do feijão. Outros endofíticos têm a capacidade de colonizar tecidos vegetais, uma vez que existe em uma planta e contaminam plantas saudáveis. São transmitidos por contato durante a germinação, ou em estágios mais avançados de desenvolvimento, sendo denominado de transmissão horizontal (Partida-Martínez & Heil, 2011).

2.3.1 Agente patogênico *Oidium*

As doenças em plantas conhecidas como oídios são causadas por fungos parasitas obrigatórios, que dependem do hospedeiro vivo para seu crescimento e reprodução. Apresentam uma forma bem evoluída de parasitismo, pois podem conviver com o hospedeiro durante todo o ciclo de vida, sem levá-los à morte. Esta especificidade é demonstrada pela ocorrência de raças fisiológicas do patógeno, capazes de atacar determinadas espécies de plantas e variedades de uma mesma espécie vegetal respectivamente (Bedendo, 2011).

Fungos que causam o oídio colonizam as células da parte superior da folha (epiderme) por meio da emissão de haustórios, permanecendo o resto da hifa na parte externa da planta (Stadnik, 2000, Barbosa et al., 2010). Apesar do fungo poder se desenvolver em ambas as faces da folha predomina na face inferior, a menos que a área esteja sombreada propiciando o crescimento do patógeno também na face superior da folha. Isto ocorre em função da sensibilidade do fungo à radiação solar. As folhas infectadas também podem se tornar subdesenvolvidas, retorcidas e murchas (Barbosa et al., 2010). Infecções também podem ocorrer em caules, flores ou frutas. Células de absorção especializadas, denominadas haustórios, se estendem para as células da epiderme da planta para obter a nutrição. Enquanto a maioria dos fungos que causam oídio produz micélio epifítico, alguns gêneros produzem hifas que estão dentro do tecido foliar, o que é conhecido como crescimento endofítico (Heffer et al., 2006).

Os agentes causais de oídios são fungos pertencentes à ordem Erysiphales (Stadnik, 2000), classe dos ascomicetos, com vários gêneros associados à oídios como: *Erysiphe*, *Blumeria*, *Uncinula*, *Sawadaea* entre outros. A fase imperfeita ou assexuada corresponde aos gêneros *Oidiopsis*, *Ovopulariopsis*, *Streptopodium* e *Oidium* (Bedendo, 2011).

O oídio de *H. impetiginosus*, causado pelo fungo do gênero *Erysiphe*, embora apresente distribuição mundial, é considerada uma doença de importância secundária (Sartorato et al., 1996). A forma assexuada deste fungo é o agente causal da doença e está amplamente distribuída entre as plantas cultivadas e silvestres, servindo-se de hospedeiros alternativos (Silva et al., 2001) entre eles: feijão (Sannazzaro et al., 2003), eucalipto (Ferreira, 1989; Silva et al., 2001) e ipês do gênero *Handroanthus* sp. sin. *Tecoma* sp. (Viegas, 1994).

Os fungos que causam oídio necessitam de tecido vivo para seu desenvolvimento e reprodução. A sobrevivência do patógeno ocorre através do micélio e conídios produzidos nas plantas hospedeiras e hospedeiros alternativos. A disseminação é realizada principalmente pelo vento, que distribui os conídios por longas distâncias, a água também atua como agente de disseminação em forma de respingos. Quando os conídios atingem a superfície da folha, podem iniciar o processo de infecção. Para a germinação dos conídios a umidade relativa deve estar próxima a 95%. O conídio dá origem ao tubo germinativo, e na extremidade forma-se o apressório que adere a superfície da folha, a partir daí forma-se uma hifa que rompe a epiderme foliar. No interior da célula a hifa se dilata formando o haustório que se mantém na célula do citoplasma retirando nutrientes para o patógeno. A colonização é a emissão de haustórios para o interior das células do hospedeiro. Após a penetração, as hifas situadas na superfície das folhas começam a se ramificar. Com o desenvolvimento do micélio, os conídios começam a se reproduzir em grandes quantidades, caracterizando a fase de reprodução do patógeno, que é responsável pelos sintomas típicos de eflorescência branca pulverulenta nos órgãos atacados (Bedendo, 2011).

As principais medidas de controle de oídios utilizadas estão restritas ao emprego de variedades resistentes e ao uso de produtos químicos. A resistência genética do hospedeiro é a forma mais efetiva de controle, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental. A resistência de um genótipo é mais bem caracterizada quando o mesmo é submetido aos agentes fúngicos causadores de oídio nos estádios de plântula (quando são mobilizados genes maiores, a chamada “resistência completa”) e de planta adulta (para testar genes de menor efeito, responsáveis pela resistência parcial ou “de campo”) (Costamilan & Minella, 2009). Sendo possível o uso para seleção *in vitro* de genótipos de *H. impetiginosus* resistentes a oídio.

Em relação aos produtos químicos, os mais indicados são os fungicidas sistêmicos, pois além da capacidade de translocação na planta, a atuação sistêmica implica na diminuição da fitotoxidade para o hospedeiro. O controle de oídios é feito pelos benzimidazóis. O amplo espectro de ação valoriza muito este grupo de fungicidas, porque abrange outras doenças que ocasionam grandes prejuízos, em várias culturas como as antracnoses, cercosporioses, sarnas, mofos cinzentos e bolores. Os benzimidazóis constituem os fungicidas sistêmicos utilizados comercialmente, incluindo carbendazim, tiofanato-metílico e tiabendazol (Kimati, 2011).

Estudos têm demonstrado que óleos e extratos de folhas de algumas espécies vegetais são eficientes no controle de doenças de plantas, seja pela ação fungitóxica direta ou pelo aumento no nível de resistência às doenças da cultura tratada (Martinez, 2001). Os extratos de Nim são mundialmente aprovados para uso em cultivos orgânicos. Possui ação repelente, como inibidor alimentar, reguladora de crescimento e inseticida, além de acaricida, nematocida e fungicida (Martinez, 2008).

O Nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) é utilizado como controle alternativo para fungos, e tem sua eficácia comprovada. Carneiro (2008) testou o efeito do Nim sobre oídio no feijoeiro e tomateiro. O óleo de Nim emulsionável a 0,25% e 0,5% controlou o oídio do tomateiro e a 0,5% controlou o oídio do feijoeiro, sem provocar fitotoxicidade. Os extratos de Nim também são eficientes para o controle de outros fungos. Foi utilizado o extrato aquoso das folhas de Nim em Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) uma espécie arbórea. O extrato de Nim reduziu 62% da incidência de *Penicillium* sp. em relação à testemunha, e 46% a incidência de *Aspergillus flavus* comparada com a testemunha em sementes de angico.

São escassos os relatos na literatura de *Oidium* sp. *in vitro*. Porém, recentemente, Tu et al. (2012) conseguiram estabelecer um método de cultivar *Oidium heveae* a partir de folhas isoladas de *Hevea brasiliensis in vitro*. Para obtenção do método as avaliações passaram por três etapas: seleção de nutrientes para as folhas com fungo, preparação do meio de cultura e inoculação do fungo. Este método contribuirá para o melhoramento da resistência de *Hevea brasiliensis* e, conseqüentemente, melhoria na produção de borracha. Além disso, servirá como modelo para estudos futuros de resistência, seleção manutenção de endofíticos *in vitro*.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCASTRO FILHO, T. R. **Fungos da Erysiphales encontrados em hospedeiros nativos do bioma cerrado**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 1993. 341p.
- AMARAL, J. B.; MARTINS, L.; FORTI, V. A.; CÍCERO, S. M.; MARCOS FILHO, J. Teste de raios x para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 601-607, 2011.
- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Revista Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 12, supl., p. 57-59, 2002.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 1, cap. 3, p. 57-93.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.
- BALBINO, L. C.; CORDEIRO, L. A. M.; PORFIRIO-DA-SILVA, V.; MORAES, A.; MARTINEZ, G. B.; ALVARENGA, R. C.; KICHEL, A. N.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P.; FRANCHINI, J. C.; GALERANI, P. R. Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 10, p.1-12, 2011.
- BARBOSA, M. A. G.; CASTRO, J. M. C.; TERAPO, D.; LIMA, M. F.; BATISTA, D. C.; TAVARES, S. C. C. H. **Cultivo da Videira**, Embrapa Semiárido Sistemas de Produção, 2010. Disponível em: < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/doencas.html>. Acesso em: 14 fev. 2013.
- BARROS, B.C.; OLIVEIRA, S. H. F.; LEITE, L.G.; ITO, M.F.; CAMPOS, T.B. E; OLIVEIRA, C.M.G. DE; SANNAZZARO, A. M. B.; CASTRO, J. L.; PINZAN, N. R.(Ed.). **Manejo integrado de pragas e doenças do feijoeiro**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2000. 90 p.
- BARROW, J.R.; OSUNA-AVILA, P.; REYES-VERA, I. Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regene-rated from native *Bouteloua Eriopoda* Torr. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Bartimor, v. 40, n. 1, p. 608-612, 2004.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R.S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. P. R.; FLORES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BEDENDO, I. P. Oídios. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronomica Ceres, 2011. v. 1, cap. 27, p. 473-477.

BYEON, S. E.; CHUNG, J. Y.; LEE, Y. G.; KIM, B. H.; KIM, K. H.; CHO, J. Y. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of ethnopharmacology**, Irlanda, v. 119, n. 1, p. 45-152, 2008.

BOTELHO, L. S; MORAES; M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plantulas. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BRACELPA, **Associação Brasileira de Celulose e Papel**. Disponível em: <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/public/RA02-RelatorioFlorestal_2010.pdf>. Acesso em: 15 abril 2013.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. F. Ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. Micro-organismos assintomaticos do cultivo *in vitro*: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: SCHERRWINSKI- PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgão de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. v. 1, cap. 5, p. 221-260.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. **Efeito do Nim (*Azadirachta indica*) sobre Oídio e Antracnose**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2008. 12 p.

CASSELLS, A. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropagation: technology and application**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 31-44.

CHENNA, P. H; DOCTOROVICH, V.; BAGGIO, R. F; GARLAND, M. T; BURTON, G. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono (arylimino) Derivatives of â-Lapachone. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 44, p. 2486-2489, 2001.

CLAEYS, M.; GRAHAM, B.; VAS, G.; WANG, W.; VERMEYLEN, R.; PAHYNSKA, V.; CAFMEYER, J.; GUYON, P.; ANDREAE, M. O.; ARTAXO, P. E.; MAENHAUT, W. Formation of secondary organic aerosols through photooxidation of isoprene. **Revista Science**, New York, v. 303, n. 1, p. 1173-1176, 2004.

COSTAMILAN, L. M.; MINELLA, E. **Comportamento de genótipos de cevada quanto à severidade de oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*), na safra 2007**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 11p. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co209.htm. Acesso em: 13 fev. de 2013.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. v. 1, cap 1, p.1-43.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminação microbiana na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. v. 1, cap 1, p 1-17.

DANTAS, A. C. M.; NESI, A. N.; MACHADO, L. B.; HAERTER, J.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.1, p.19-23, 2002.

DURIGAN, G. Os (invisíveis) serviços ambientais do Cerrado brasileiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 58., 2007. São Paulo. **Resumos...** São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil, 2007. p. 324-327.

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.

FERREIRA, R. A.; BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. D.; MALAVASI, M. M. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.3, p.303-309, 2001.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais. 1989, 570 p.

FORD, Y.Y.; BONHAM, E.C.; CAMERON, R.W.F.; BLAKE, P.S.; JUDD, H.L.; HARRISON-MURRAY R.S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult to root plant. **Journal of Plant Growth Regulation**, Verona, v.10, n. 1, p.1-11, 2001.

GARCÍA-GONZÁLES, R.; DELGADO, M.; GONZÁLEZ, Y.; GONZÁLEZ, A.; GARRIGA, M.; CALIGARI, P. D. S CARRASCO, B.; QUIROZ, K. *In vitro* Propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, Chile, v.71, n.3, p. 376-382, 2011.

GEMAQUE, R. C. R.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R. Indicadores de maturidade fisiológica de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Revista Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 84-91, 2002.

GENTRY, A. H. **Bignoniaceae**. Part I (Crescentiae and Tourrettieae). Flora Neotropica, New York, 1980. v. 25, p.1-130.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G. J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, cap. 2, p. 29-64.

GIRI, C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, Berlin, Germany, 18, n. 2, p. 115-135, 2004.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L.R.S.; CURTI, A.R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *eugenia involucrata* Dc.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo *in vitro*. **Ciência. Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, 2012.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. A., RAMÍREZ-GARDUZA, F., ROBERT, M. L., O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; PEÑA-RAMÍREZ, Y. J. Adventitious shoot induction from adult tissues of the tropical timber tree yellow Ipé primavera (*Tabebuia donnell-smithii* rose [Bignoniaceae]). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Bartimor, v. 46, n. 5, p. 411-421, 2010.

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, DF: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 183-260.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; BIZI, R. M.; AUER, C. G. Oidium sp. em Mudanças de Eucalipto. Disponível em: <
<http://w3.ufsm.br/fitoflorestal/antigos/admin/textos/pdf/24108.pdf>>. Acesso em: 13 maio de 2013.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. (a). Evolution of a charismatic neotropical tree: Molecular phylogeny of *Tabebuia* s. l. and allied genera (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, Washington, v. 32, n. 1, p. 650-665, 2007.

GROSE S. O.; OLMSTEAD. R. G.(b) Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, Washington, v. 32, n. 3, p. 660-670. 2007.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 895-914, 1997.

HEFFER, V., K. B. JOHNSON, M. L. POWELSON.; N. SHISHKOFF. Identification of Powdery Mildew Fungi anno 2006. The Plant Health Instructor. Disponível em:<
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/Pages/PowderyMildew.aspx>>. Acesso em: 15 abril 2013.

HERNANDES, J. L.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; BARDIN, L. Variação estacional da radiação solar em ambiente externo e no interior de floresta semidecídua. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 167-172, 2004.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, K. M.; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 41, n. 1, p. 113-119, 2011.

HÖGBERG, K. A.; EKBERG, I.; NORELL, L.; VON ARNOLD, S. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding program: a case study with *Picea abies*. **Canadian Journal of Forest Research**, Canada, v. 28, p. 1536-1545, 1998.

JAUSORO, V.; LLORENTE, B. E.; APÓSTOLO, N. M. Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos (Bignoniaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holonda, v. 101, n. 2, p. 183-191, 2010.

JOHNSTON-MONJE, D. J.; RAIZADA, M. N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. **PLoS ONE**, San Francisco-USA, v. 6, n. 6, p.1-22. 2011.

KIMATI, H. Controle Químico. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Beramim Filho, A, (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba, SP: Agronomica Ceres, 2011. v. 1, cap. 16, p. 343-365.

LARRABURU, E. E.; APOSTOLO, N. M.; LLORENTE, B. E. *In Vitro* Propagation of Pink Lapacho: Response Surface Methodology and Factorial Analysis for Optimisation of Medium Components. **International Journal of Forestry Research**, Hindawi, v.1, n.1, p. 1-9, 2012.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v. 1, cap. 4, p.103-127.

LIMA, P. C. F. Áreas degradadas: métodos de recuperação no semi-árido brasileiro. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 27., 2004, Petrolina, PE. [**Anais...**]. Petrolina: SBB; Embrapa Semi-Árido; UNEB, 2004.

LITZ, R.E. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic *Mangifera indica* L. **Revista HortScience**, Alexandria, v. 19, n.5, p. 715-717, 1984.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc**, Carlisle, v.30, p.421-327, 1981.

LOHMANN, L.G.2012. *Bignoniaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB114086>>.Acesso em: 14 fev. 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 512 p.

LOZANO, E. C.; ZAPATER, M. A. Delimitación y estatus de *Handroanthus heptaphyllus* y *H. Impetiginosus*. (Bignoniaceae, Tecomeae). **American Journal of Botany**, St. Louis, USA, v. 96, n. 9, p.1731-1743, 2009.

ITTO (International Tropical Timber Organization). **Definitions of "producer countries" and "consumer countries"**.2013. Disponível em:<http://www.itto.int/group_definitions/>. Acesso em: 2 fev. 2013.

MAGALHÃES, L. M. S.; CRISPIM, A. A. Vale a pena plantar e manter árvores e florestas na cidade? **Revista Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 193, p. 64-85, 2003.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 121-132, 2000.

MARTINS, J. P. R.; SANTOS, B. R.; BARBOSA, S.; MÁXIMO, W. P. F.; BEIJO, L. A.; PAIVA, R. Crescimento e aspectos sintomatológicos na aclimatização de ipê-roxo. **Revista Cerne**, Lavras, v. 17, n. 4, 435-442, 2011.

MARTINEZ, S. S. **O Nim-*Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), 2002. 142 p.

MARTINEZ, S.S. **O Nim-*Azadirachta indica* - um Inseticida Natural**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). 2008. p. 5.

MELO, I. S. **Microrganismos Endofíticos**. Jornal do endofítico: Embrapa meio ambiente. 2013. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/resumo.html>. Acesso: 07 mar. 2013.

MELO, I. S. **Endofíticos**. Agencia de informação Embrapa: Agricultura e meio ambiente.2013. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agriculturaemeio_ambiente/arvore/CONTAG01_72_410200710545.html> Acesso em: 7 mar. 2013.

MERKLE, S. A.; DEAN, J. F. D. Forest biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 11, n. 3, p. 298-302, 2000.

MOURA, L. C.; TITON, M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTANA, R. C.; OLIVEIRA, M. L. R. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.47, n. 12, p. 1691-1698, 2012.

MIGNUCCI, J. S.; BOYER, J. S. Inhibition of photosynthesis and transpiration in soybean infected by *Microsphaera diffusa* Powdery mildew. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 227-230, 1979

NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SILDARRIAGA, M.; OSORIO, R. G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; DÍAZ, A.; QUINTANA, J. C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of

plants used by healers in Colombia. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 7, p. 969-977, 2004.

NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Ribeirão Preto, v. 70, n. 1, p. 259-268, 2002.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; SILVA, T. T. A.; BORGES, D. I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex AP de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich-Bignoniaceae. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 642-648, 2005.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido Brasileiro a fungos causadores da podridão-mole. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n.3, p. 365-371, 2005

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove espécies de madeiras do semi-árido brasileiro a cupins subterrâneos em ensaio de preferência alimentar. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 72, p. 59-69, 2001.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G. C.; SIQUEIRA, J. O.; MIRANDA, J. R. P.; FERNANDES, A. R. Absorção de nutrientes por mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) em solução nutritiva contaminada por cádmio. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 189-197, 2004

PANIZZA, S. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Jacaranda caroba* (Velloso) DC. Bignoniaceae. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica de São Paulo**, São Paulo, v. 5, p. 93-106. 1967.

PARK, B. S.; LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T.; LEE, S. E.; TAKEOKA, G. R. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 1, p. 295-300, 2003.

PARK, B. S.; KIM, J. R.; LEE, S. E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 1, p. 1152-1157, 2005.

PASQUAL, M. (2001). **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Meios de cultura. Lavras: Universidade Federal de Lavras/FAEPE, 2001. 74 p

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação e domesticação de plantas nativas do cerrado com potencial econômico. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v.19, n. 1, 2001. Suplemento. CD-ROM.

PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P.; HEIL, M. The microbe-free plant: fact or artifact? **Frontiers in plant science**, Lausanne-Switzerland, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2011.

PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C, G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda, v.76, n. 1, p.93-98, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. 2001. **Biologia Vegetal**, 6. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: HBR/SUDESUL/SAA-DRNR, 1988. 525p.

REZENDE, J. C. **Desenvolvimento de embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. oriunda de embriogênese somática direta**. 2005. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

RIZZI, C.T. Dormancy in seeds of *Anona crassiflora* Mart. J. **Journal of Experimental Botany**, Oxford-Reino Unido, v. 24 n.78, p.117-123, 1973.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polineurom*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n. 1, p.115-122, 2003.

SARTORATO, A.; RAVA, A.C.; RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAUJO, R.; RAVA, C.A.; STONE, L.F. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba, POTAFOS, 1996.v. 1, cap. 5, p.684-685.

SANNAZZARO, A. M.; OLIVEIRA, S. H. F.; WUTKE, E. B.; MARTINS A. L. M.; BORTOLETTO, N.; PEREIRA J. V. N. A.; CASTRO J. L.; SANTOS R. R., DORNELLES C.R.F. Severidade de oídio (*Erysiphe polygoni* DC) em cultivares de feijoeiro no estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 331-336, 2003

SANTANA, D. P. **Manejo Integrado de Bacias Hidrográficas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003, 63p. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2003/documento/Doc_30.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2013.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. 1 ed. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005, v. 1, cap. 8, p.155-173.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. New York, v. 11, n. 1, p. 118–131, 1957.

SILVA, I. E. F. **Obtenção e avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de extratos hidroalcoólicos de casca, folhas e flores de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC) ipê roxo**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) Universidade de Franca, Franca, 2006.

SILVA SOUZA, A; LEDO, C. A. S; SILVEIRA, D. G; SOUZA, F. V. D; FARIA, G. A; NETO, H. P. S; SANTOS SEREJO, J. S; SILVA, K. M; COSTA, M. A. P. C; SOARES, T. L; JUNGHANS, T. G; ALMEIDA, W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006.v. 1, n. 1, p. 111-151.

SILVA, G. H.; HERIQUES, I. G. N.; SOUZA, P. F.; CAMPELO, G. J. Influência do extrato de Nim em fungos incidentes sobre sementes de angico no município de patos, Paraíba. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 3, p. 315-324, 2011.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES H. L.; BOLZANI, V.S.; ARAUJO, A, R. CITOCALASINAS PRODUZIDAS POR *Xylaria sp.*, UM FUNGO ENDOFÍTICO DE *Piper aduncum* (PIPERACEAE). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, 2038-2041, 2010.

SILVA, A. M. L.; COSTA, M. F. B.; LEITE, V. G.; REZENDE, A. A.; TEIXEIRA, S. P. Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 329-33, 2009.

SILVA, M. D. D.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; ZAUZA, E. A. V. Etiologia do oídio do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p.201-205, 2001.

SON, D. J.; LIM, Y.; PARK, Y. H.; CHANG, S. K.; YUN, Y. P.; HONG, J. T.; TAKEOKA, G. R.; LEE, K. G.; LEE, S. E.; KIM, M. R. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda, v. 108, n. 1, p. 148-151. 2006

SOUZA, P. A. VENTURIN, N.; MACEDO, R. L.G. Adubação mineral de Ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa*). **Ciência florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 261-270. 2006.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Revista Acta Amazônica**, v. 5, n. 2, p. 185-195, 2004

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 26, n. 1, p. 175-177, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City California: 1991. cap. 16, p. 398-424.

TARGA, S. E. M.; ORLANDELL, R. C.; BERNARDI-WENZEL, J.; PAMPHILE, J. A. Influence of crude extracts of endophytes from *Luehea divaricata* (Malvales; Tiliaceae) on the *in vitro* development of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae) larvae. **Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 6, n. 3, p. 1-7, 2011.

TORRES A. C, CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa, v.1, 1998. 864p.

TU, M.; CAI, H.; YUWEI, Y.; SUN, A.; HUANG, H. *In vitro* culture method of powdery mildew (*Oidium heveae* Steinmann) of *Hevea brasiliensis*. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, Lagos, v.11, n. 68, p. 13167-13172, 2012.

VECHIATO, M. H. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. Disponível em : < http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=136. Acesso em 13 de maio 2013.

VIEGAS, A. P. Alguns fungos do Brasil: II. Ascomycetos. **Bragantia**, Campinas, v. 4, n.1, p. 5-392. 1994.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de Stimulate no desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Piracicaba: USP, Departamento de Ciências Biológicas, 2002. 3 p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272 p.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P. ROGER, J. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

3 ESTABELECIMENTO *in vitro* DE *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. (Bignoniaceae)

RESUMO

A espécie *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, conhecida popularmente como ipê-roxo, é economicamente importante pois sua madeira é utilizada para múltiplos fins. A utilização econômica da espécie ainda se dá exclusivamente por extrativismo. Para qualquer programa de domesticação e melhoramento genético, dominar a fase de propagação da espécie de interesse é fundamental. A propagação *in vitro* se propõe a produzir grande quantidade de plantas, em espaço reduzido e no menor espaço de tempo. Ajustes são necessários nos protocolos de descontaminação de sementes e nas fases posteriores de multiplicação e enraizamento para que se obtenha sucesso no estabelecimento *in vitro*. Os objetivos deste trabalho foram obter um protocolo de descontaminação de sementes de *H. impetiginosus* para germinação *in vitro* visando à posterior indução de multiplicação de novos brotos e enraizamento de estacas caulinares, estabelecendo assim, um protocolo de propagação *in vitro* da espécie. Além de identificar e estudar as relações micro-organismos e planta em *H. impetiginosus in vitro*. Foram testados diferentes períodos de imersão das sementes de *H. impetiginosus* em etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) visando sua descontaminação e posterior germinação *in vitro*. Todos os tratamentos foram eficientes para o controle de fungos superficiais e bactérias. Porém, os mesmos métodos não controlaram contaminações de fungos do gênero *Oidium*, identificado através de cortes anatômicos de fragmentos foliares e analisados em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Visando a multiplicação via segmentos nodais foram utilizadas somente plântulas sadias oriundas do estabelecimento *in vitro*. Testaram-se tratamentos com a interação dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). Na média, a indução de novos brotos foi baixa. Porém, houve valores atípicos em que um explante chegou a produzir nove brotos. Nestes tratamentos, a produção de calos e necrose foi elevada, de ocorrência comum em lenhosas, porém indesejável na fase de multiplicação. Foram realizados dois experimentos visando indução do enraizamento em estacas caulinares. No primeiro experimento, os tratamentos variaram as concentrações do meio MS, sacarose e da auxina ácido naftalenoacético (ANA). O segundo experimento variou apenas as concentrações do regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) em meio MSG. A formação de raízes adventícias com ANA foi baixa, sendo necessários mais estudos. Com o uso de MSG e AIB foram altas as taxas de enraizamento e boa qualidade das raízes formadas. O melhor tratamento utilizou 6,0 mg.L⁻¹ de AIB, com 92% de enraizamento após 40 dias.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, ipê roxo, organogênese.

¹ Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

ABSTRACT

IN VITRO ESTABLISHMENT OF *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos.
(Bignoniaceae)

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos, popularly known as ipê-roxo, is economically important because its wood, medicinal and ornamental uses. The economic utilization of the species still occurs exclusively by extraction. For any program of domestication and genetic improvement, dominate the propagation of the species of interest is fundamental. *In vitro* propagation is proposed to produce large quantity of plants in a small space and in the shortest time. Adjustments are necessary in decontaminating protocols for seeds and in the further multiplication and rooting protocols to obtain successful *in vitro* establishment. The goals of this study were to obtain a protocol for seeds decontamination of *H. impetiginosus* for *in vitro* germination in order to further multiplication of new shoots and rooting of stem cuttings, thereby establishing a protocol for *in vitro* propagation of the species. We tested different periods of soaking of *H. impetiginosus* seeds in 70% ethanol and sodium hypochlorite (2% active chlorine) aiming decontamination and subsequent *in vitro* germination. All treatments were effective for the control of fungal and bacterial on the seed surface. However, those methods do not control the fungi of the genus *Oidium*, that was identified by anatomical cuts of leaf fragments and examined under optical microscope and scanning electron microscopy. Only nodal segments derived from healthy seedlings were used for *in vitro* establishment. Multiplications of new shoots from nodal segments, were tested with the interaction of growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA). On average, the induction of new shoots was low. However, there were outliers in which an explant reached nine new shoots. In these treatments, tissue necrosis and the callus production were high, a common occurrence in wood plants, but undesirable in the multiplication phase. Two experiments were conducted in order to induce rooting in stem cuttings. In the first experiment, treatments varied concentrations of MS medium, sucrose and auxin naphthalene acetic acid (NAA). The second experiment varied the concentrations of growth regulator IBA (IBA) and MSG medium. The formation of adventitious roots with ANA was low, indicating that more research is needed. With the use of MSG medium and AIB were obtained high rates of rooting and good quality of roots formed. The best treatment used 6.0 mg.L⁻¹ IBA, with 92% rooting after 40 days.

Key words: Ipê roxo, tissue culture, organogenesis

3.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, conhecida popularmente como ipê-roxo, possui importância por sua utilização madeireira, medicinal e ornamental (Lorenzi & Matos, 2002; Gemaque et al., 2002). Porém, a exploração deste

recurso vegetal ainda se faz de maneira extrativista e predatória, colocando a espécie em risco (Gemaque et al., 2002).

A propagação via semente de *H. impetiginosus* possui algumas dificuldades como baixa viabilidade e longevidade das sementes (Maeda E Matthes, 1984; Lorenzi & Matos, 2002), sementes atacadas por insetos e fungos antes e após a maturação fisiológica (Botelho et al., 2008) e produção irregular de frutos e sementes, fato comum para muitas espécies arbóreas do Cerrado (Högberg et al., 1998).

Em qualquer programa de domesticação e melhoramento genético, dominar a fase de propagação da espécie é fundamental. Uma das técnicas empregadas é a propagação *in vitro*, ou micropropagação, que propõem-se a produzir grande quantidade de plantas, em espaço reduzido e no menor espaço de tempo. Porém, para obter altas taxas de multiplicação é necessário o ajuste do respectivo protocolo (Schuch & Erig, 2005).

O estabelecimento *in vitro* é uma etapa determinante no processo de micropropagação, principalmente, se os explantes são oriundos de plantas no campo, em função de altas taxas de contaminação dos tecidos (Alfenas et al., 2004). O sucesso da técnica tem como seu ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e com maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes (Fermino Junior et al., 2009).

Por demandar cultivo asséptico, contaminações causadas principalmente por fungos e bactérias na cultura de tecidos de plantas constituem a principal causa de perda de material vegetal *in vitro* (Dantas et al., 2002). O meio de cultura proporciona um ambiente favorável para o crescimento de fungos, bactérias e leveduras (Dantas et al., 2002), podendo alcançar valores de 3% a 15% a cada subcultivo (Pereira et al., 2003).

A multiplicação é a segunda fase da propagação *in vitro* de plantas. Nesta etapa os explantes já possuem um crescimento uniforme e adequado, seguindo com o propósito de multiplicação das gemas ou das microestacas, para posterior enraizamento. As plantas desenvolvidas a partir desses explantes, por possuírem gemas antecedentes, geralmente são fiéis na reprodução do genótipo da planta matriz (Hartmann et al., 2002).

Segmentos nodais foram também utilizados para a micropropagação de várias espécies, como em *Eucalyptus spp* (Dutra et al., 2009), *Caesalpinia echinata* Lam. (Aragão et al, 2011) e *H. impetiginosus* (Larraburu et al., 2011). Normalmente haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, pois possuem maior competência

organogenética. Explantes que contém tecidos meristemáticos são preferidos e eles são encontrados em gemas caulinares, apicais e axilares (Peres, 2002). Os segmentos nodais contendo as gemas são isolados e inoculados *in vitro*, estas são incitadas ao crescimento, dando origem a brotos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Outra fase importante do cultivo *in vitro* é o enraizamento das microestacas obtidas. Este é o resultado final da micropropagação, e consiste na formação de raízes adventícias na base das microestacas (Eitzke et al., 2009). Hartmann et al. (1997) relatam que as auxinas são essenciais para indução do enraizamento adventício e uniformização da formação de raízes, inclusive, influenciam na qualidade das raízes formadas (Schmidt et al., 2010).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de descontaminação de sementes de *Handroanthus impetiginosus* para germinação *in vitro* visando à posterior indução de multiplicação de novos brotos e enraizamento de estacas caulinares, estabelecendo assim, um protocolo de propagação *in vitro* da espécie. Além de identificar e estudar as relações micro-organismos e planta em *H. impetiginosus in vitro*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, em Goiânia, Goiás. Foram utilizadas sementes de *H. impetiginosus*, oriunda de uma matriz localizada no parque municipal Leolídio di Ramos Caiado, em Goiânia, GO. Os frutos foram colhidos quando se tornaram visíveis sua deiscência e o início da queda das sementes.

3.2.1 Condições de cultivo

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com inositol a 100 mg.L^{-1} , sacarose a 30 g.L^{-1} e solidificado com ágar a 7 g.L^{-1} . O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 120°C , por 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h na luz e 8 h no escuro e irradiância de $36 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.2.2 Germinação *in vitro*

Foram selecionadas para o experimento, as maiores sementes de coloração amarelo-amarronzado claro. Em seguida, as alas membráceas foram retiradas para evitar a retenção de água e auxiliar o processo de descontaminação. As sementes foram submetidas a diferentes tempos de imersão em soluções de etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), acrescida de uma gota de detergente neutro para cada 100 mL de solução (Tabela 3.1). Após o tratamento com hipoclorito de sódio, e em câmara de fluxo laminar, as sementes foram enxaguadas por três vezes com água deionizada e autoclavada, e inoculadas em frascos de 300 mL com 30 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Tabela 3.1 Tratamentos utilizados visando à descontaminação das sementes e germinação *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*.

Tratamentos	Água*	Etanol (70%)*	Hipoclorito de sódio (2%)*
T1	0	2	10
T2	0	5	20
T3	0	7	30
T4	30	2	10
T5	30	5	20
T6	30	7	30

*Tempo de imersão em minutos

Foram avaliados diariamente os parâmetros: presença ou ausência de contaminação fúngica ou bacteriana, sementes oxidadas, emissão de parte aérea, emissão de radícula, desenvolvimento normal da plântula. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinquenta repetições, e uma semente por frasco.

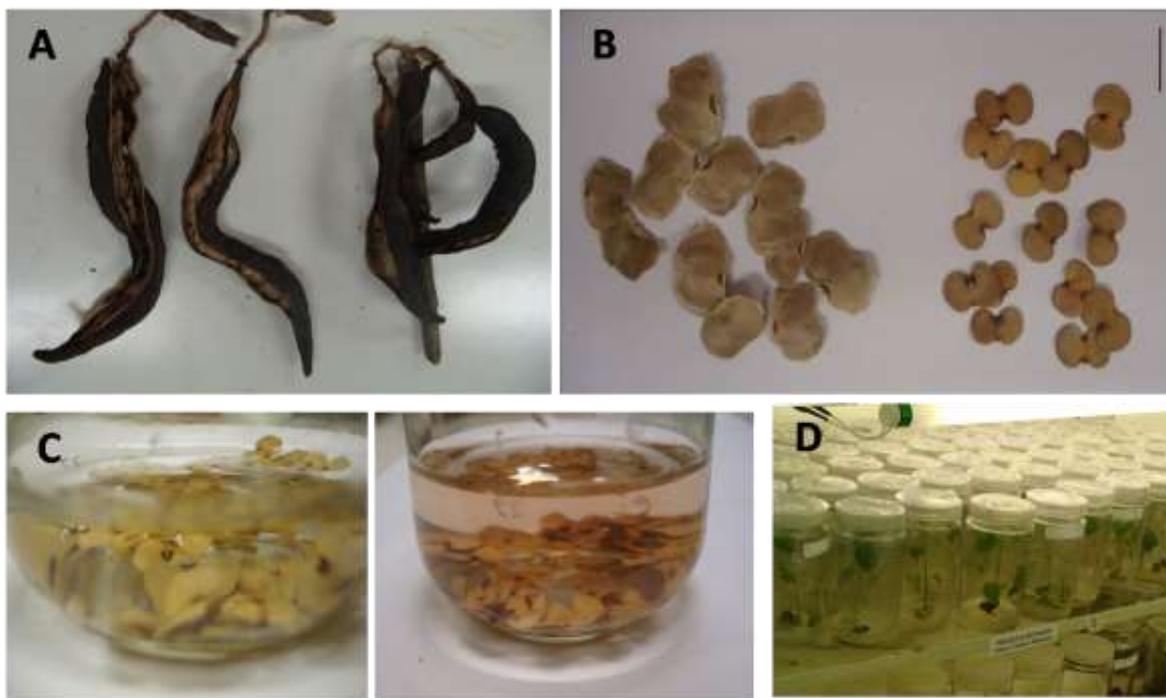


Figura 3.1 Seleção e descontaminação de sementes de *Handroanthus impetiginosus*. Seleção de frutos (A), retirada das alas membranáceas das sementes (B), desinfestação das sementes utilizando de soluções de etanol 70% e Hipoclorito de sódio 2% (C), inoculação *in vitro* em meio MS (D). Barra = 1 cm.

3.2.3 Avaliações anatômicas de folhas de plântulas de *H. Impetiginosus* obtidas *in vitro*

Para a caracterização anatômica foram utilizadas folhas de plântulas de *H. impetiginosus* desenvolvidas durante dois meses *in vitro*. No total, doze folhas foram selecionadas apresentando diferentes graus de infecção pelo fungo. Para cada folha foram feitos cinco cortes, fragmentos da região mediana da lâmina foliar (próxima à nervura central). As amostras foram fixadas em FAA₇₀ (etanol 70%, ácido acético e formol) por um período de 24 horas e posteriormente armazenadas em etanol 70%. A confecção das lâminas histológicas foi realizada a partir de secções transversais da lâmina foliar. Os cortes foram realizados a mão livre. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 6%, lavadas em água destilada e em seguida submetidas à dupla coloração com fucsina básica 0,1% e azul de astra 0,3% na proporção 1:3 (em média 3 min.), desidratadas em série etílica, diafanizadas em acetato de butila e montadas em resina sintética (Paiva et

al., 2006). Para complementar a análise anatômica, foi utilizado em alguns cortes transversais o reagente lactofenol (contendo azul de metileno). O reagente lactofenol é composto de 20,0 g de fenol, 20,0 g de ácido láctico, 40,0 g de glicina, 0,05 g de azul de metileno (ou azul de algodão), 20,0 mL de água destilada. As fotomicrografias das secções transversais foram obtidas com auxílio do microscópio Leica DM 500.

Para a observação em MEV (microscopia eletrônica de varredura) alguns fragmentos foliares, previamente fixados em FAA₇₀ e armazenados em etanol 70%, foram seccionados nos sentidos transversal e longitudinal em amostras com aproximadamente um cm de comprimento. As amostras passaram por desidratação em série alcoólica (etanol a 70, 80, 90 e 99,1%) por 15 minutos cada. Em seguida, foram submetidas ao sistema de secagem durante quarenta minutos por ponto crítico de CO₂ – aparelho Autosamdri[®], 815, Série A. Logo após, as amostras foram coladas em *stubs*, e metalizadas com ouro. A deposição do filme de ouro ocorreu por dois minutos, mas a metalização durou em torno de vinte minutos, feita com o aparelho Detin Vacuum. Em seguida as amostras foram observadas o MEV.

3.2.4 Multiplicação *in vitro*

Para verificar a resposta morfogênica, segmentos nodais de plantas germinadas *in vitro* com 60 dias de idade foram seccionados transversalmente com auxílio de um bisturi deixando a base em bisel. Os explantes com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, continham duas gemas axilares. Estes foram cultivados em tubos de ensaio, contendo 20 mL de meio de cultura MS, na presença de diferentes concentrações do 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) (Tabela 3.2). Após 40 dias, avaliaram-se o número de brotos por explante, número de folhas emitidas e comprimento maior de gemas, calogênese e necrose (morte total ou parcial dos explantes). Também foi avaliada a taxa de multiplicação, dividindo-se o número de gemas no final de cada período, pelo número inicial de gemas do explante, no estabelecimento do experimento (duas gemas) segundo metodologia descrita por Erig & Schuch (2002). Foram realizados mais dois subcultivos, com avaliações cada 30 dias. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 23 repetições, e um segmento nodal por tubo de ensaio.

Tabela 3.2 Tratamentos utilizados para indução de novos brotos em seguimentos nodais de *Handroanthus impetiginosus* obtidos de plântulas com 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS.

Tratamentos	BAP (citocinina) mg.L ⁻¹	ANA (auxina) mg.L ⁻¹
T1	0.0	0.0
T2	2.5	0.1
T3	1.0	0.5
T4	2.5	0.5
T5	4.0	0.5
T6	2.5	1.0

3.2.5 Enraizamento *in vitro*

Broto de *H. impetiginosus* oriundos do experimento de multiplicação foram submetidos a dois experimentos para indução de raiz. Em ambos os experimentos, explantes com aproximadamente 4,0 cm de comprimento, foram cultivados em frascos de 300 mL com 30 mL meio de cultura. Após 40 dias, avaliaram-se a presença de raiz, número de brotos, tamanho do broto maior e o tamanho da maior raiz.

3.2.5.1 Enraizamento *in vitro* utilizando diferentes concentrações do meio MS, sacarose e ácido naftalenoacético

Os tratamentos utilizados neste experimento estão descritos na (Tabela 3.3). Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições, e um explante por frasco. Após a primeira avaliação, realizada 40 dias após a inoculação, foi realizado um subcultivo transferindo os explantes para novos meios, porém, nos mesmos tratamentos. Nova avaliação foi realizada após 30 dias.

Tabela 3.3 Tratamentos utilizados para indução raiz em brotos de *Handroanthus impetiginosus*

Tratamento	Meio de Cultura	Sacarose g.L ⁻¹	ANA (auxina) mg.L ⁻¹
T1	½ MS	30.0	0.0
T2	½ MS	30.0	1.0
T3	½ MS	45.0	1.0
T4	MS	30.0	0.0
T5	MS	30.0	1.0
T6	MS	45.0	1.0

3.2.5.2 Enraizamento *in vitro* utilizando diferentes concentrações de ácido indolbutírico

Os tratamentos utilizados neste experimento estão descritos na (Tabela 3.4) e foram baseados no trabalho de Larraburu et al. (2012) para *H. impetiginosus*. Os explantes foram cultivados em frascos de 300 mL com 30 mL de meio de cultura MSG (meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com vitaminas B5 (Gamborg et al. 1968). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 30 repetições, e um explante por frasco.

Tabela 3.4 Tratamentos utilizados para indução raiz em brotos de *Handroanthus impetiginosus* obtidos de plântulas *in vitro* em meio MS acrescido de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

Tratamento	AIB (auxina) mg.L ⁻¹
T1	0.0
T2	2.0
T3	4.0
T4	6.0
T5	8.0
T6	10.0

3.2.6 Análises estatísticas

A normalidade dos dados obtidos para os tratamentos foi testada pelo teste de Lilliefors. Os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste Tukey quando paramétricos ou por análise de variância pelo teste não-

paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes de comparações múltiplas (Teste de Dunn) na ausência de normalidade ou homogeneidade de variâncias. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio do software Biostat 5.0 (Ayres et al., 2007).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Germinação *in vitro*

Para as variáveis contaminações fúngicas e bacterianas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, observando-se reduzidas médias gerais (3,0% e 0,5% respectivamente) (Tabela 3.5). Pode-se inferir que o etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), foram eficientes em controlar estes micro-organismos associados superficialmente às sementes de *H. impetiginosus*. Botelho et al. (2008) utilizaram para desinfestação de oito amostras de sementes de *H. impetiginosus* a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos. No trabalho de Botelho et al. (2008), a assepsia proporcionou redução drástica na incidência fúngica, com taxa média de 90%, podendo-se concluir que a maioria dos fungos estava contaminando a superfície das sementes.

Tabela 3.5. Porcentagem de germinação e indivíduos contaminados por fungos e bactérias de *Handroanthus impetiginosus* submetidas a diferentes tratamentos de descontaminação após 30 dias de cultivo.

Tratamentos	Germinação (%)	Fungos (%)	Bactérias (%)
T1	99 a	0 a	0 a
T2	93 a	2 a	0 a
T3	100 a	0 a	0 a
T4	98 a	4 a	6 a
T5	88 a	6 a	0 a
T6	89 a	6 a	0 a
Média	94,5	3,0	0,5
CV* (%)	5,55	-	-

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,5$) (% germinação e pelo teste de Dunn ($p > 0,5$) (porcentagem de indivíduos contaminados por fungos e bactérias). T1) 2 min. em etanol 70% e 10 min. em NaOCl 2%; T2) 5 min. em etanol 70% e 20 min. em NaOCl 2%; T3) 07 min. em etanol 70% e 30 min. em NaOCl 2%; T4) 30 min. ddH₂O, 02 min. em etanol 70% e 10 min. em NaOCl 2%; T5) 30 min. ddH₂O, 05 min. em etanol 70% e 20 min. em NaOCl 2%; T6) 30 min. ddH₂O, 07 min. em etanol 70% e 30 min. em NaOCl 2%.

Na micropropagação *in vitro* o aparecimento de agentes contaminantes, ainda que em baixas proporções são indesejáveis. Pois, qualquer micro-organismo que entrar em contato com o meio terá condições de se desenvolver e, como consequência, inviabilizará a cultura. Os micro-organismos competem com os explantes em espaço, carboidratos (fonte de energia), nutrientes e outros compostos podendo liberar no meio de cultivo substâncias tóxicas e prejudiciais ao crescimento do material vegetal *in vitro* (Pascoal et al., 2010).

Em todos os tratamentos, todas as sementes oxidaram. Em cultura de tecidos vegetais, durante o processo de manipulação do material vegetal, explantes podem liberar substâncias como taninos e fenóis que, em contato com o ar, oxidam e causam escurecimento no tecido (Andrade et al., 2000). Esta liberação é desencadeada a partir de ferimentos decorrentes dos cortes ou injúrias que envolvem os processos de extração, limpeza e repicagem dos explantes (Paiva & Aloufa, 2009). Muitas vezes, a oxidação também pode inibir o desenvolvimento do explante (Grattapaglia & Machado, 1998). Porém, não foi o que ocorreu com as sementes de *H. impetiginosus*. A porcentagem de germinação *in vitro* não foi afetada pelos tratamentos de desinfestação utilizados e também não foi afetada pela oxidação que ocorreu com as sementes *in vitro* (Tabela 3.5). Pereira et al. (2011) trabalhando com clones de bananeira verificaram que o tratamento com hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo apresentou 90% de oxidação, porém sem provocar a perda dos explantes.

Vários trabalhos têm usado hipoclorito de sódio para desinfestação de explantes de *H. impetiginosus* obtendo bons resultados como Gemaque et al. (2002), Silva et al. (2004) e Botelho et al. (2008). Porém, a utilização de etanol (70%) junto a hipoclorito de sódio tem alcançado melhores resultados como em *Tabebuia chrysotricha* (Wielewski, 2001), *Eucalyptus grandis* (Titon et al., 2007) e *Tabebuia serratifolia* (Nery et al., 2008). O álcool atua desnaturando proteínas das células microbianas, e possui também ação detergente que provoca a remoção mecânica dos micro-organismos. E o hipoclorito de sódio além de inativar reações enzimáticas dos organismos, degrada lipídios e ácidos graxos (Pascal et al, 2010).

Os frutos de *H. impetiginosus* neste trabalho foram coletados de acordo com Gemaque (2002) que, analisando em conjunto os parâmetros físicos e fisiológicos de frutos e sementes, sugeriu que a colheita de sementes deveria ser realizada no início do processo de deiscência dos frutos e dispersão das sementes. Em trabalho anterior, Degan et al.

(2001) verificaram que sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith) recém-colhidas no estágio maduro, apresentaram germinação máxima de 56,7%.

Nesse estudo, não foi observada nenhuma deficiência nutricional em relação ao meio MS e seu ajustamento às exigências nutricionais das plântulas de *H. impetiginosus*. Nery et al. (2008) trabalhando com *Tabebuia serratifolia* Vahl Nichols para germinação *in vitro*, indicaram que os meios de cultura MS e WPM (*Woody Plant Medium* - Lloyd & McCown, 1980) proporcionaram o mesmo resultado na germinação *in vitro* de sementes desta espécie.

Vinte dias após o início do experimento *in vitro*, houve o aparecimento de pequenas estruturas esbranquiçadas, alongadas, em pequenos pontos na região abaxial das folhas primárias nas plântulas de *H. impetiginosus*. Este sintoma surgiu igualmente distribuído em todos os tratamentos. As análises morfológicas das folhas com estes sintomas e as lâminas com cortes histológicos permitiram concluir que se tratava de contaminação por um fungo do gênero *Oidium*. Caracterizado por causar aspecto esbranquiçado na região abaxial das folhas e esporulação branca, clorose e encarquilhamento das folhas, este fungo pode provocar diferentes graus de severidade. Os sintomas foram semelhantes aos encontrados por Paz Lima et al. (2004), em *Capsicum sp.* que adaptou para a espécie em estudo, escalas de notas do índice de esporulação e índice de folhagem infectada.

Embora este tipo de contaminação prejudique os passos seguintes no estabelecimento de plântulas *in vitro*, estes resultados abrem a possibilidade do estudo mais detalhado da relação fungo-hospedeiro nesta espécie e de possíveis formas para seu controle. As plântulas que não apresentaram contaminação por *Oidium* foram utilizadas nos experimentos seguintes de multiplicação *in vitro*, enraizamento e calogênese.

3.3.2 Avaliações anatômicas de folhas de plântulas de *H. Impetiginosus* obtidas *in vitro*

Após análises morfológicas das folhas com sintomas e as lâminas com cortes histológicos, o fungo encontrado nas folhas de *H. Impetiginosus* obtidas *in vitro* foi identificado como *Oidium* Sacc. utilizando a chave de classificação de Barnett & Hunter

(1998). Este é o primeiro relato de *Oidium* sp. causando oídio na espécie *H. impetiginosus* *in vitro*.

A contaminação por *Oidium* em *H. impetiginosus* em campo já foi relatada por Alencastro Filho (2006) e Melo (2011). Alencastro (2006) ainda comenta que os estudos são poucos e isolados, havendo a necessidade de pesquisas mais aprofundadas para este grupo de fungos. Botelho et al. (2008) complementa indicando que a importância dos patógenos associados às sementes é evidente. Porém, são escassas as informações a respeito da qualidade sanitária das sementes de espécies florestais nativas utilizadas, especificamente *H. impetiginosus*.

Geralmente o micélio de *Oidium* sp. não é espalhado por toda a superfície abaxial das folhas (Figura 4.4 A e B). Amorim & Pascholati (2011) relatam que fungos parasitas biotróficos necessitam de tecido vivo, então colonizam porções limitadas do hospedeiro para rapidamente produzir suas estruturas reprodutivas. Um longo período de tempo sem se reproduzir, pode ser desvantajoso para o fungo, pois cedo ou tarde as células parasitadas irão se exaurir.

Nas lâminas preparadas não foram observadas estruturas da fase sexuada, apenas a presença de micélio na superfície abaxial das folhas (Figura 4.4 C, D) e estruturas formadas a partir de ramificações das hifas, conídios e conidióforos, visualizados na forma hialina, sem a presença de pigmentos (Figura 4.4 E e F). A partir dos conidióforos se formarão esporos assexuais denominados conídios, o modo mais comum de reprodução assexuada em fungos.

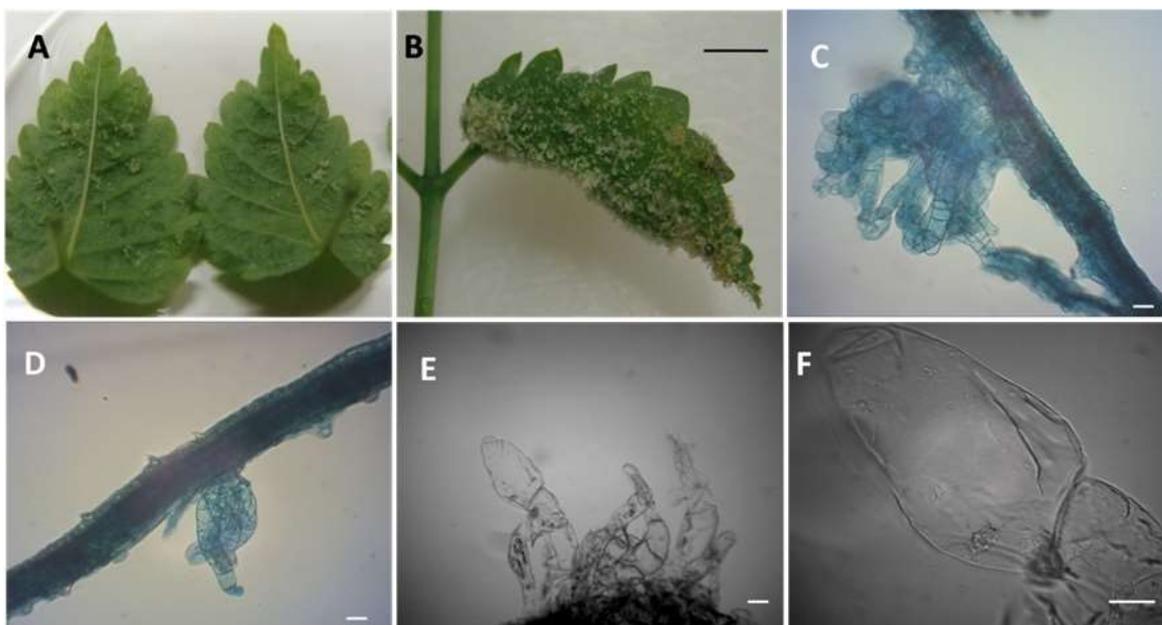


Figura 3.2 Severidade e microscopia óptica de *Oidium* sp. em *Handroanthus impetiginosus*. A e B - Face inferior de folha de *H. impetiginosus* com *Oidium*, exibindo sintomas do patógeno. Barras: 1 cm. C e D - Corte transversal das folhas com micélio na região abaxial. E - Conidióforos e conídios em microscopia de luz. F - Detalhe do conídio (Barra: 50 μ m: C, D, E, 30 μ m: F).

Na Figura 3.3 estão indicadas as fases iniciais do desenvolvimento do fungo e surgimento de micélio, conidióforos e conídios sobre a epiderme da face abaxial das folhas cultivadas *in vitro*. Em um primeiro momento, ocorre a elevação da epiderme e a deformação da região sob os estômatos (Figura 3.3 A), que pode ser vista em detalhe na Figura 3.3 B. A presença de hifas do fungo nestas elevações foi observada em lamina coradas com lactofenol e está indicada na Figura 3.3 C. Após o surgimento das primeiras hifas pela região do estômato das folhas, o fungo continua seu desenvolvimento e inicia a diferenciação em conidióforos (Figura 3.3 D).

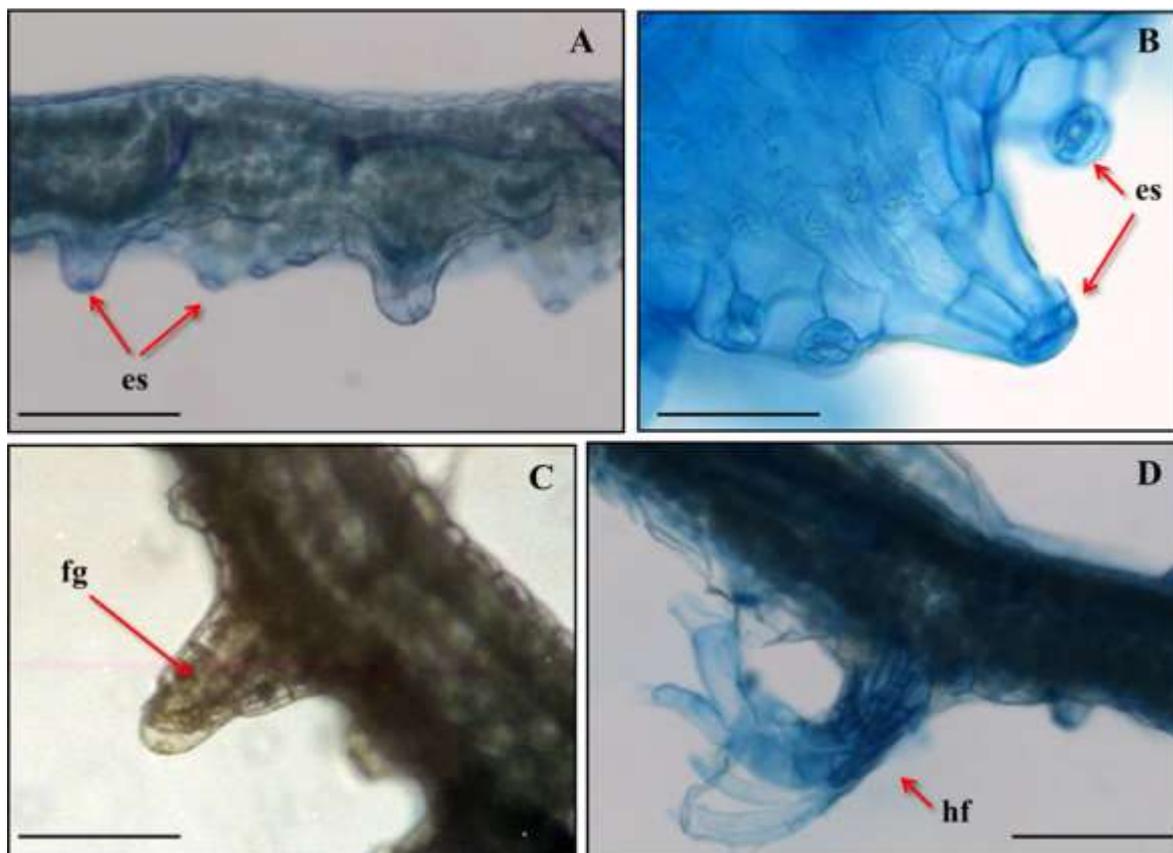


Figura 3.3 Alterações anatômicas em tecidos de folhas provenientes do cultivo *in vitro* causadas pela presença do fungo *Oidium* sp. Cortes da região mediana da lâmina foliar indicando alterações na região abaxial da folha sob os estômatos (**es**) em (A) e com maior detalhe em (B). Presença do fungo (**fg**) *Oidium* sp. no interior da elevação que se forma abaixo dos estômatos corada com lactofenol (C). Denselovimento externo de hifas (**hf**), micélio e diferenciação em codidióforos (D).

Com o auxílio da microscopia de varredura (Figura 4.7) este padrão de desenvolvimento pode ser melhor visualizados. Nas fotos, além da deformação da região sob os estômatos (Figura 4.7 A e B) e da elevação da epiderme (Figura 4.7 C), também ficou nítida a formação dos conidióforos a partir da diferenciação de hifas que surgem em regiões próximas aos estômatos (Figura 4.7 A; C e D). Os apressórios apresentaram-se indistintos, caracterizados apenas por leve dilatação da hifa. Estruturas na fase sexuada não foram encontradas.

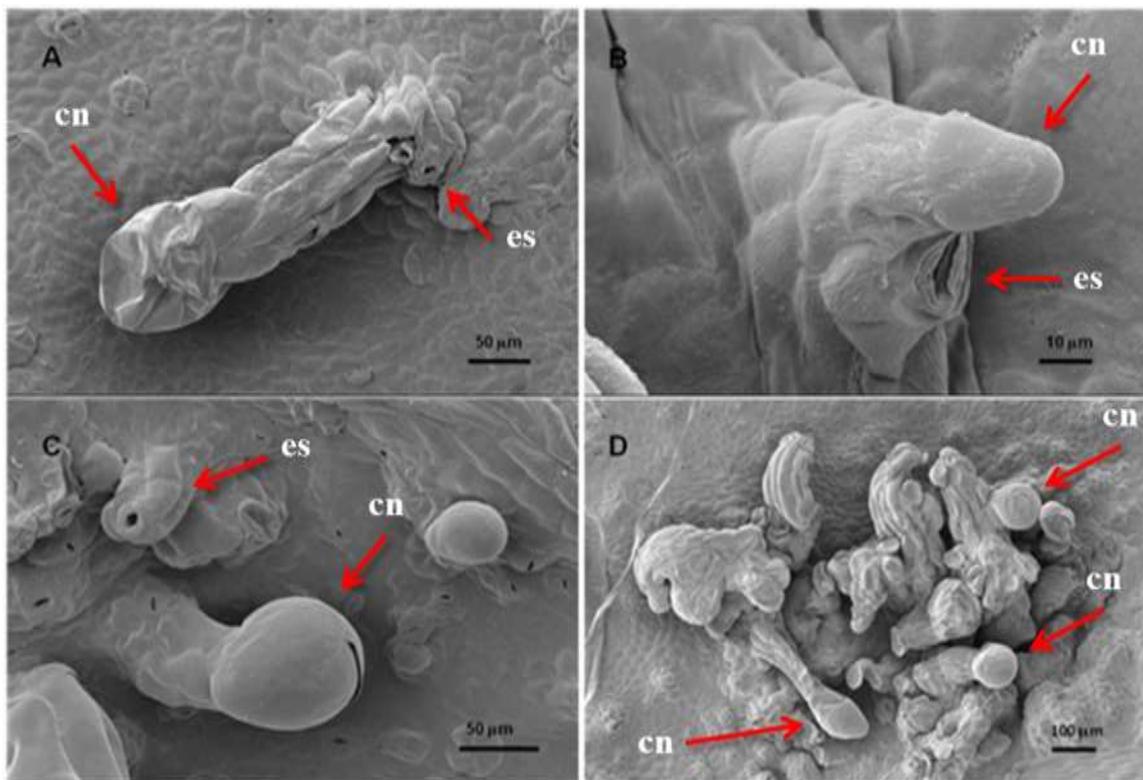


Figura 3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicando a colonizando por *Oidium* sp da região abaxial de folhas *Handroanthus impetiginosus* desenvolvidas *in vitro*. A) Conjunto de hifas e diferenciação em conídio (cn) a partir da região dos estômatos (es). B) Início formação conídio (cn). C) Elevação da região epidérmica sob os estômatos (es) e formação de conídio (cn). D) Presença de micélio e formação de vários conidióforos (cn). Barras: A: 100 μm; B, C e D: 500 μm.

Os estudos *in vitro* realizados com *H. impetiginosus* permitem conhecer mais sobre a interação deste patossistema. A infecção de sementes florestais já tem sido muito relatada na literatura. Porém, com poucas soluções de controle até o momento. Testar diferentes metodologias de controle incluindo métodos alternativos para o controle de *Oidium* em *H. impetiginosus*, será importante para extrapolar para o controle de patógenos em nível de gênero e família.

3.3.3 Multiplicação *in vitro*

As respostas fisiológicas na multiplicação *in vitro* de brotos com o uso de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) a partir de segmentos nodais (Tabela 3.6) favoreceram o desenvolvimento de uma pequena

taxa de multiplicação de 0,55 novos brotos por explante (Figura 3.5 A, B). Não houve diferença significativa para taxa de multiplicação entre os tratamentos utilizados e os subcultivos.

Tabela 3.6 Taxas de multiplicação e porcentagem de explantes com brotos durante a micropropagação de *Handroanthus impetiginosus*

Tratamentos	Taxa de multiplicação			Explantes com brotos %		
	Início (40 dias)	Subcultivo (70 dias)	Subcultivo (100 dias)	Início (40 dias)	Subcultivo (70 dias)	Subcultivo (100 dias)
T1	0,24 a	0,54 a	0,54 a	64,0 a	70,83 a	76,0 a
T2	0,86 a	0,43 a	0,54 a	47,82 a	81,82 a	39,13 a
T3	0,36 a	0,54 a	0,46 a	52,0 a	58,33 a	44,0 a
T4	0,52 a	0,59 a	0,61 a	68,0 a	70,83 a	44,0 a
T5	0,40 a	0,38 a	0,41 a	44,0 a	58,33 a	40,0 a
T6	0,76 a	0,55 a	0,72 a	70,83 a	82,61 a	45,83 a
Média (%)	0,51	0,51	0,55	57,78	70,46	48,16
CV* (%)	52,40	16,18	19,97	19,52	15,17	28,82

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). *CV = coeficiente de variação. T1- 0,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T2- 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T3 - 1,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T4 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T5- 4,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T6 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 1,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético.

Porém, uso de baixas concentrações de BAP e ANA no meio de cultura tem sido indicado como eficiente na multiplicação de brotos para espécies arbóreas como aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) (Andrade et al., 2000), louro-pardo (*Cordia trichotom* (Vellozo) Arrabi da ex Steudel) (Mantovani et al., 2001), pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) (Jardim et al., 2010) o clone de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* (Oliveira, et al., 2011).

Os explantes responderam positivamente a BAP e ANA em relação à produção de brotos no início e primeiro cultivo (Tabela 3.6), ocorrendo uma diminuição no segundo subcultivo. A presença constante ou excessiva de citocininas e de auxinas no meio de indução ou multiplicação de brotos pode desequilibrar o balanço hormonal endógeno dos explantes, além de inibir as respostas desejadas. A indução de brotos em explantes nodais de *Pterocarpus marsupium*, uma leguminosa arbórea somente foi possível por meio da utilização de meio de cultura com 0,4 uM de Thidiazuron (TDZ). Contudo, a presença contínua de TDZ após a indução inibiu o alongamento dos brotos, sendo necessária a transferência dos explantes para outro meio com 5,0 uM de BAP (Husain et al., 2007).

A produção de calos em todos os tratamentos foi alta, chegando a média geral de 91% de explantes com calos no segundo subcultivo (Tabela 3.7). Os calos formados foram friáveis, com coloração creme a marrom de tamanho variado (Figura 3.5 E, F). A formação de calos na base do explante, seja este do tipo segmento nodal, ápice, caulinar ou brotação, é comum em espécies lenhosas, sendo considerada indesejável na micropropagação (Bassan et al., 2006). De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), quantidades excessivas de auxina e sacarose podem causar a formação de calos na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea.

A necrose dos explantes foi maior no primeiro subcultivo com média geral de 47% (Tabela 3.7). Andrade et al. (2000) trabalhando com aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All), em relação às combinações de ANA com cinetina (CIN) e BAP, verificaram que os segmentos nodais e apicais tiveram pouca formação de brotos, pois os explantes tornavam-se necróticos e morriam. Essa pequena regeneração ocorreu em função da alta relação entre auxina e citocinina, o que normalmente leva à maior formação de raízes em detrimento à formação de parte aérea. Os autores também observaram tendência de escurecimento nos explantes, evidenciando a oxidação de compostos fenólicos, principalmente no início do estabelecimento da cultura. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), esse problema é sério, no que se refere ao isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina.

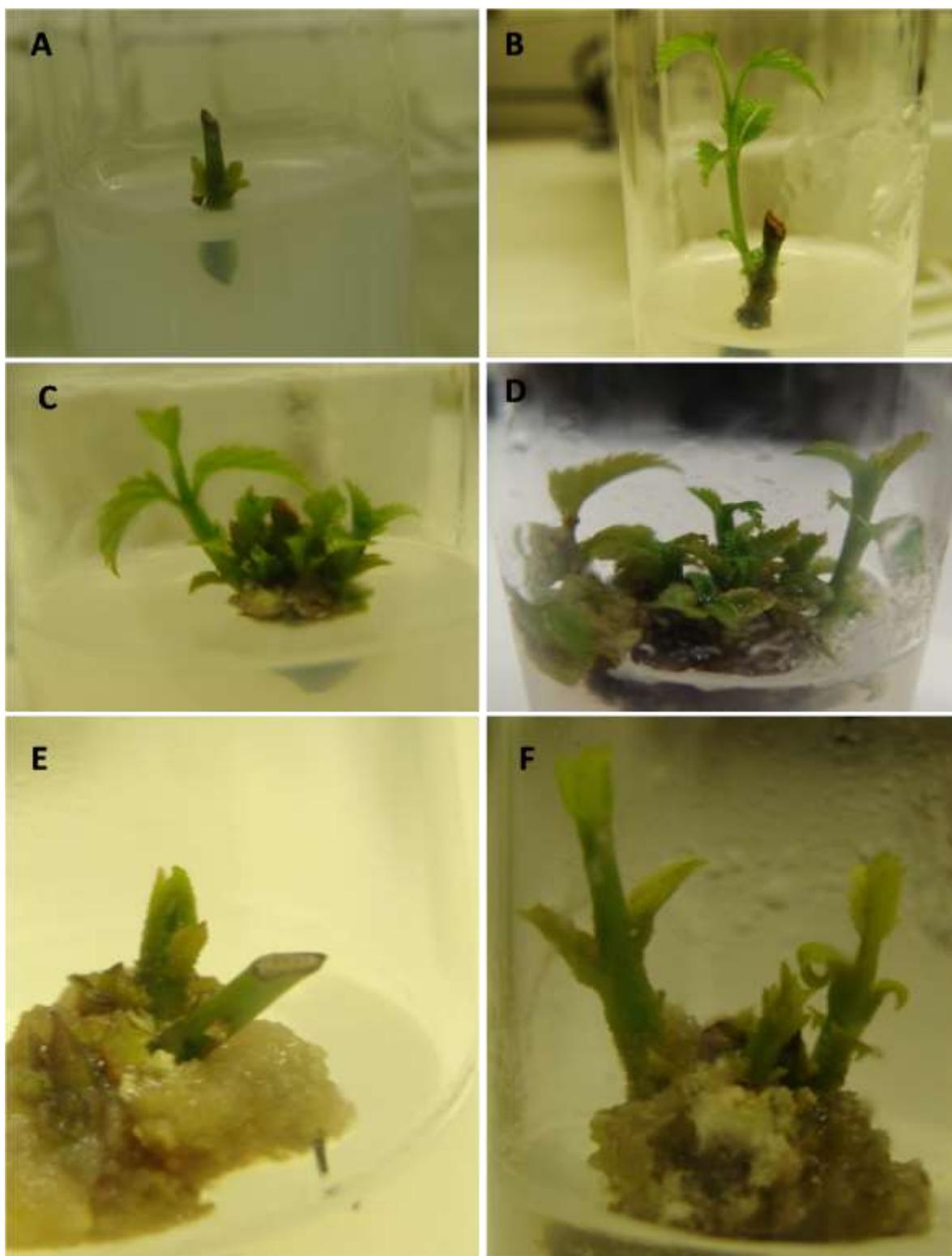


Figura 3.5 Explantes submetidos à multiplicação de brotos. Segmento nodal com duas gemas axilares após 10 de cultivo (A); broto após 40 dias os tratamentos de indução a multiplicação de brotos (B); Indução de brotos (C, D); Indução de calos na região basal dos explantes (E); Calogênese e indução de brotos (F). Barras = 1 cm.

Tabela 3.7 Porcentagens de explantes com calos e porcentagem de brotos com necrose em explantes durante a micropropagação de *Handroanthus impetiginosus*

Tratamentos	Explantes com calos (%)			Brotos com necrose (%)		
	Início (40 dias)	Subcultivo (70 dias)	Subcultivo (100 dias)	Início (40 dias)	Subcultivo (70 dias)	Subcultivo (100 dias)
T1	20,0 b	32,0 b	72,0 a	0,0 a	52,0 a	28,0 a
T2	100,0 a	100,0 a	100,0 a	21,74 a	30,43 a	56,5 a
T3	100,0 a	100,0 a	96,0 a	12,0 a	48,0 a	40,0 a
T4	100,0 a	100,0 a	95,83 a	24,0 a	40,0 a	44,0 a
T5	100,0 a	100,0 a	92,0 a	8,0 a	60,0 a	24,0 a
T6	100,0 a	100,0 a	95,83 a	12,5 a	52,0 a	28,0 a
Média (%)	86,0	88,0	91,0	12,83	47,0	36,67
CV (%)	37,68	31,31	10,98	37,68	31,31	10,98

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). *CV = coeficiente de variação. T1- 0,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T2- 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T3 - 1,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T4 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T5- 4,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T6 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 1,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético.

Os brotos tiveram um baixo vigor e pequeno número de brotações produzidos na fase de estabelecimento *in vitro*. O número de brotações emitidas por explante não variou em função dos tratamentos testados e os consecutivos subcultivos, apresentando valor médio entre 1,25 e 1,74 brotos/explante (Tabela 3.8). Com relação ao número de brotos, a maior média com 1,48 brotos por explante foi encontrada com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA (T3). Porém, houve tratamentos onde explantes obtiveram um número maior de brotos como em T2 com nove brotos por explante, e em T5 e T6, ambos com oito brotos por explantes (Figura 3.5 C, D). Em relação ao comprimento dos brotos, os resultados também apresentaram pequena variação não significativa. As maiores médias foram encontradas em T1 e T6 (Tabela 3.8).

Para a variável número de folhas, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados e o períodos de subcultivo (Tabela 3.9). Houve formação de raízes somente em dois explantes do tratamento T1 (0,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,0 mg.L⁻¹ de ANA). De acordo com Souza & Pereira (2007), cada órgão vegetal necessita de demandas distintas de concentrações de auxina. Concentrações de ANA acima do ótimo podem induzir a síntese de outro regulador de crescimento, o etileno, por exemplo, propiciando senescência.

Tabela 3.8 Número médio de brotos e comprimento do maior broto em explantes durante a micropropagação de *Handroanthus impetiginosus*

Tratamentos	Número de brotações			Comprimento dos brotos		
	Início (40 dias)	Subcultivo (70 dias)	Subcultivo (100 dias)	Início (40 dias)	Subcultivo (70 dias)	Subcultivo (100 dias)
T1	0,84 a	1,20 a	1,36 a	0,24 a	0,29 a	0,52 a
T2	1,47 a	2,26 a	1,65 a	0,13 a	0,31 a	0,26 a
T3	1,04 a	1,48 a	1,20 a	0,19 a	0,41 a	0,34 a
T4	1,60 a	1,92 a	1,08 a	0,20 a	0,37 a	0,46 a
T5	0,96 a	1,32 a	1,16 a	0,20 a	0,3 a	0,38 a
T6	1,58 a	2,29 a	1,08 a	0,31 a	0,53 a	0,46 a
Média	1,25	1,74	1,25	0,21	0,36	0,40
CV* (%)	27,29	27,40	17,32	27,75	25,08	23,27

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Kruskal-Walls ($p < 0.05$). *CV = coeficiente de variação. T1- 0,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T2- 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T3 - 1,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T4 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T5- 4,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T6 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 1,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético.

Tabela 3.9 Número folhas em brotos durante a micropropagação de *Handranthus impetiginosus*.

Tratamentos	Número de folhas		
	Início (40 dias)	Subcultivo (70 dias)	Subcultivo (100 dias)
T1	2,6 a	3,16 a	4,44 a
T2	3,86 a	5,65 a	5,0 a
T3	2,96 a	4,6 a	4,08 a
T4	4,48 a	5,84 a	4,26 a
T5	3,12 a	4,44 a	5,36 a
T6	4,75 a	8,12 a	4,41 a
Média	3,62	5,30	4,59
CV* (%)	24,03	31,79	10,57

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Kruskal-Walls ($p < 0.05$). *CV = coeficiente de variação. T1- 0,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T2- 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T3 - 1,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T4 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T5- 4,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético; T6 - 2,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 1,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético.

3.3.4 Enraizamento *in vitro*

Explantos submetidos a diferentes concentrações de sacarose e ácido naftalenoacético (ANA) tiveram uma baixa resposta ao enraizamento *in vitro*. Quarenta dias após a inoculação não havia nenhuma formação de raiz. Os explantes foram inoculados em novos meios. Porém, 30 dias após a troca dos meios, não houve a formação de raízes além de ocorrer oxidação e formação de calos nas bases dos explantes.

Em mogno (*Swietenia macrophylla* King), auxina ANA na concentração de 2,0 e 5,0 mg.L⁻¹ foi eficiente para indução do enraizamento, com percentual acima de 70%, tanto em ápice quanto em brotações (Lopes et al., 2001). Esta auxina deve ser melhor estudada em relação à indução de enraizamento de *H. impetiginosus*, em relação à quantidade a ser utilizada, acompanhando ou não por outros reguladores de crescimento.

No segundo experimento, a taxa de enraizamento induzida pela presença de ácido indolbutírico (AIB) foi alta (acima de 65%) não havendo uma diferença significativa na porcentagem de enraizamento nos tratamentos que continham esta auxina (Tabela 3.10). Souza & Pereira (2007), dizem que diferenças no potencial de enraizamento podem ser observadas dentro de indivíduos da mesma espécie. Tofanelli et al. (2002) estudaram o enraizamento de onze cultivares de pessegueiro e observaram que a concentração ótima de AIB versus porcentagem de enraizamento variou de acordo com cada cultivar utilizada.

No trabalho de Larraburu et al. (2012) trabalhando com *H. impetiginosus*, com o meio MSG e AIB, as maiores porcentagens de enraizamento observadas foram em concentrações de 6,0 e 10,0 mg.L⁻¹ de AIB com 88% e 83% respectivamente. No tratamento sem adição de AIB a porcentagem de enraizamento foi de 25-43%. Calos apareceram esporadicamente. Já em nosso trabalho, utilizando as mesmas condições, as maiores porcentagens de enraizamento (92 e 87%) também foram observadas nas miniestacas tratadas com 6 e 10 mg.L⁻¹ de AIB, respectivamente (Tabela 3.10). O menor percentual de enraizamento (65%) foi obtido com 2 mg.L⁻¹ de AIB. Porém, miniestacas que não receberam AIB apresentaram enraizamento de 57%, porcentagem maior do que no trabalho de Larraburu et al. (2012). O comprimento das raízes variou de 2,8 a 3,6 cm sem haver, no entanto, diferenças significativas entre as concentrações de AIB utilizadas.

A formação de calos ocorreu em todos os tratamentos, inclusive no tratamento sem adição de AIB, com 24% dos explantes com calos (Tabela 3.10). Acredita-se que os níveis endógenos de auxinas nos explantes de *H. impetiginosus* eram altos, por isso houve

a formação de calos. Todos explantes tratados com 10 mg.L^{-1} de AIB, tiveram a formação de calos. Grattapaglia & Machado (1998), ressaltam que a formação de raízes grossas e/ou calos é indesejável durante esta etapa, visto que podem interferir na funcionalidade do sistema radicular, comprometendo assim a aclimatização das plântulas. A formação de calos na base das estacas e a indução de raízes mais grossas tem sido mais frequentemente observada quando estas crescem em meios de cultura suplementado com a auxina ANA, embora o AIA e AIB também possam promovê-los (Grattapaglia & Machado, 1998)

Tabela 3.10 Indução raiz em brotos de *Handroanthus impetiginosus* obtidos de plântulas *in vitro* em meio MS sob de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) após 40 dias de cultivo.

Tratamentos (mg.L^{-1} de AIB)	Enraizamento (%)	Comprimento das raízes (cm)	Calos (%)	Brotos	Tamanho dos brotos (cm)
T1	57 b	3,61 a	24 b	1,14	3,70 a
T2	65 ab	3,04 a	84 a	1,1 a	2,65 a
T3	80 ab	3,28 a	84 a	1,0 a	2,76 a
T4	92 a	3,26 a	84 a	1,2 a	2,54 a
T5	87 ab	2,80 a	91 a	1,0 a	2,54 a
T6	85 ab	2,85 a	100 a	1,0 a	2,72 a
Média	78	2,66	77	1,0	2,16
CV(%)	17,65%	19,36%	34,84%	0,0	18,84%

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). *CV = coeficiente de variação. T1- 0 mg.L^{-1} de de ácido indolbutírico (AIB); T2 - 2 mg.L^{-1} de de ácido indolbutírico (AIB); T3 - 4 mg.L^{-1} de de ácido indolbutírico (AIB); T4 - 6 mg.L^{-1} de de ácido indolbutírico (AIB); T5 - 8 mg.L^{-1} de de ácido indolbutírico (AIB); T6 - 10 mg.L^{-1} de de ácido indolbutírico (AIB).

As brotações e o tamanho dos brotos não diferiram estatisticamente entre os tratamentos, a média obtida em relação a números de brotos foi 1,0 e tamanho de brotos 2,16 cm (Tabela 3.10). Botelho et al. (2005) trabalhando com estacas de Videira '43-43' (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*), observou que os tratamentos com AIB apresentaram tendência de redução da porcentagem de brotação de estacas herbáceas. Em mogno (*Swietenia macrophylla* King), AIB apresentou pior desempenho, tanto para a porcentagem de enraizamento quanto para o número médio de raízes, em ápices e brotações, comparados aos resultados de ANA (Lopes et al., 2001).

3.4 CONCLUSÕES

- Tratamentos para a descontaminação de sementes de *H. impetiginosus* baseados no uso de pré-lavagens em água, e diferentes tempos de imersão em etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) propiciam baixos índices de contaminação exógena, por fungos e bactérias, e alta taxa de germinação *in vitro*. Porém, os mesmos métodos não controlam a contaminação o fungo do gênero *Oidium*.
- Cortes anatômicos comprovam a infecção de *H. impetiginosus in vitro* por *Oidium*, tanto nos cortes analisados por microscopia óptica quanto os analisados por microscopia de varredura. Também fica demonstrada a forma de desenvolvimento do fungo no tecido foliar com a desuniformização da face abaxial foliar, elevação e deformação da região sob os estômatos, desenvolvimento de hifas na parte superficial da epiderme e diferenciação em conidióforos.
- Segmentos nodais de plântulas de *H. impetiginosus* quando cultivados *in vitro* na presença de BAP e ANA possuem a capacidade de regenerar brotos, calos e raízes adventícias. A maneira complexa com que auxinas, citocininas e células interagem *in vitro*, revela a necessidade de novos estudos sobre concentrações e combinações de reguladores de crescimento visando aperfeiçoar o protocolo de regeneração e aumentar a multiplicação *in vitro* desta espécie.
- O enraizamento *in vitro* de *H. impetiginosus* é induzido com sucesso com a utilização de AIB, porém existe a necessidade de ajuste do protocolo devido á formação de calo na base do explante. A auxina ANA para a indução de novas raízes em *H. impetiginosus in vitro* deve ser melhor estudada em relação à quantidade a ser utilizada, acompanhada ou não por outros reguladores de crescimento.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCASTRO FILHO, T. R. **Fungos da Erysiphales encontrados em hospedeiros nativos do bioma cerrado**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

- AMARAL, J. B.; MARTINS, L.; FORTI, V. A.; CÍCERO, S. M.; MARCOS FILHO, J. Teste de raios x para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina-PR, v. 33, n. 4, p. 601-607, 2011.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E. A. V., MAFIA, R. G., ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500 p.
- ANDRADE, M. W; LUZ, J. M. Q; LACERDA, A. S; MELO P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v. 24, n. 1, p.174-180, 2000.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. 2007. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/ MCT-CNPq, 364 p.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. P. R.; FLORES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BOTELHO, L. S; MORAES; M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plantulas. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.
- BOTELHO, R. V.; MAIA, A. J.; PIRES, E. J. P.; TERRA, M. M.; SCHUCK, E. Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira '43-43' (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal v. 27, n. 1, p. 6-8, 2005.
- COSTA, N. M. S., ALOUFA, M. A. I. Influência da luz na germinação *in vitro* de sementes de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, vol.34, n.spe, p. 1630-1633. 2010.
- COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.
- DEGAN, P.; AGUIAR, I. B.; SADER, R.; PERECIN, D.; PINTO, L. R. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de ipê- branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.5, n.3, p.492-496, 2001.

DUTRA, L. F.; IVAR WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p.49-59, 2009.

EITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.spe, p 1959-1966, 2009.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. R. Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* BORKH.) CVS. Galaxy e Mastergala . **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 151-155, 2006.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O; SCHERWINSKI-PEREIRA, J E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures os soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GEMAQUE, R. C. R.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R. Indicadores de maturidade fisiológica de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (mart.) standl.). **Revista Cerne**, Lavras-MG, v. 8, n. 2, p. 84-91, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

HUSSAIN, M. K.; ANIS, M.; SHAHZAD, A. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. Baltimor, v. 43, n. 1, p. 59-64. 2007

JARDIM, L. S.; SAMPAIO, P. T. B.; COSTA, S. S.; GONÇALVES, C.Q.B.; BRANDÃO, H. L. M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Revista acta amazonica**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 275-279, 2010

JAUSORO, V.; LLORENTE, B. E.; APÓSTOLO, N. M. Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC)

Mattos (Bignoniaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 101, n. 2, p. 183-191, 2010.

LARRABURU, E. E.; APOSTOLO, N. M.; LLORENTE, B. E. *In Vitro* Propagation of Pink Lapacho: Response Surface Methodology and Factorial Analysis for Optimisation of Medium Components . **International Journal of Forestry Research**, Hindawi, v. 2012, n.1, p. 1-9, 2012.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I. M. T.; CEREDA, M. P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv mcol 22) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 2, p. 107-110, 2002.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 512 p.

MAEDA, J. A.; MATTHES, L. A. F. Conservação de sementes de ipê. **Bragantia**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 51 – 61, 1984.

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

MELO, N. M. F. **Incidência de Oídio (*Oidium* sp.) em folhas de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*)**. Disponível em: <<http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2011/05/incidencia-de-oidio-oidium-sp-em-folhas.html>>. Acesso em: 14 de set. 2012

MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; SANTOS, F. M. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.3, p.458-463, 2012.

MORAIS, J. P. S.; JUCÁ, H. L.; CARVALHO, A. C. P. P.; CAMPOS, F. A. P. Desinfestação superficial de frutos-sementes de aroeira-do-sertão para germinação *in vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.5, n.2, p. 140-144, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M.; NERY, F. C.; SILVA, D. G. GERMINAÇÃO *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Revista Cerne**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2008.

OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R. M.; OTONI, W. C.; TEIXEIRA, J. T. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. Urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011.

PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.11, n.3, p.300-304, 2009.

PASCOAL, M.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, A. G.; PEREIRA, A. R. Prevenção de contaminação microbiana na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. 1. ed. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa informação Tecnológica, 2010.v.1, cap. 2, p. 61-162.

PAZ LIMA, M. L.; I, C. A.; CAFÉ FILHO, A. C. Estabilidade da resistência de *Capsicum* spp. ao Oídio em Telado e Casa de Vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 519-525, 2004.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande Naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 222-226, 2011.

PERES, E. P. L. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, p. 44-48, 2002.

REDDY, J. M., BOPAIAH, A. K. Studies on the initiation of callusing and regeneration of plantlets in three different basal media with varied plant growth regulators for the micropropagation of *Anthurium scherzeriaum* using leaf and spathe as explants. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 23, p. 6259-6268, 2012.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, Viçosa, v.55, n. 1, p.160-7, 2008.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. 1 ed. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. v.1 cap.8, p.155-173.

SILVA SOUZA, A; LEDO, C. A. S; SILVEIRA, D. G; SOUZA, F. V. D; FARIA, G. A; NETO, H. P. S; SANTOS SEREJO, J. S; SILVA, K. M; COSTA, M. A. P.C; SOARES, T. L; JUNGHANS, T. G; ALMEIDA. W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 151p.

SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; MELO, D. L. B.; ABREU, G. B. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. seeds. **Revista Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2004.

SCHMILDT, E. R., AMARAL, J. A. T. D., SCHMILDT, O., COELHO, R. I., RABELLO, W. S., & MARTINS FILHO, S. Indole butyric acid (IBA) levels in the *in vitro* rooting of microcuttings of papaya tree 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringa, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, CAMPOS, W.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n.3, p. 417-426. . 2007

TOFANELLI, M. B. D.; CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A.; CHALFUN JR., A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de ramos semi lenhosos de pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 939-944, 2002.

WIELEWSKI, P. **Patologias em *Tabebuia chrysostricha* (mart ex dc.) standl (ipê-amarelo) Bignoniaceae em Curitiba-PR**. 2001. 44 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

4 DETECÇÃO E CONTROLE DE OÍDIO EM *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. (Bignoniaceae) *in vitro*

RESUMO

A espécie *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos tem sido estudada pela qualidade da madeira, uso medicinal e utilização para recuperação de ambientes degradados. Após o estabelecimento desta espécie *in vitro*, foram observados sintomas da doença foliar oídio, causado pelo fungo do gênero *Oidium* sp. Informações sobre micro-organismos associados a sementes florestais ainda são escassas na literatura. O surgimento de oídio em plântulas de *H. impetiginosus in vitro* também é uma novidade. Assim, o aparecimento dos sintomas da doença nas condições de propagação *in vitro*, torna-se interessante modelo para o estudo sobre o controle de patógenos em sementes. Os objetivos do trabalho foram avaliar a eficiência do etanol (70%), hipoclorito de sódio, fungicida sistêmico e de contato Cerconil WP (Clorotalonil + Tiofanato Metílico) e óleo de Nim (1,5%) em plântulas de *H. impetiginosus in vitro* e sugerir métodos de controle da doença oídio nestas condições de cultivo. Foram realizados três experimentos que apresentaram alta incidência, porém variações na severidade da doença. No primeiro experimento, a desinfestação superficial das sementes foi feita com diferentes períodos de imersão das sementes de *H. impetiginosus* em etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), com seis tratamentos. A contaminação por outros fungos foi baixa, mas a presença do oídio apresentou sintomas severos. No segundo experimento, além do etanol e do hipoclorito de sódio, Clorotalonil + Tiofanato Metílico, com seis tratamentos. Períodos maiores de exposição das sementes ao fungicida apresentam plântulas com maior incidência e severidade da doença, ou seja, sementes mais fragilizadas com o período dos agentes desinfestantes obtiveram maior incidência e severidade. No terceiro experimento, o objetivo foi testar separadamente os agentes desinfestantes utilizados e acrescentar o óleo de Nim (1,5%) como representante de controle alternativo para oídio. O tratamento T4 (10 min. em Nim 1,5%) demonstrou à menor AACPD, porém, não houve diferença estatística dos demais tratamentos que utilizaram etanol 70% e hipoclorito de sódio. Entre os tratamentos utilizados houve diferença somente entre T4 (10 min. em Nim 1,5%) e T3 (15 min. de Clorotalonil + Tiofanato Metílico) com maior AACPD.

Palavras-chave: *Oidium* sp., Cerrado, propagação *in vitro*.

¹ Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

ABSTRACT

DETECTION AND CONTROL OF POWDERY MILDEW FUNGUS IN *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) *in vitro*

The species *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos has been studied by the quality of the wood, medicine and recovery degraded environments. After the establishment of this species *in vitro*, were observed foliar symptoms of powdery mildew disease, caused by the fungus of the genus *Oidium* sp. Information about microorganisms associated with tree seeds are scarce in the literature. The appearance of mildew in seedlings of *H. impetiginosus in vitro* is also a novelty. Thus, the emergence of the disease in propagation *in vitro* conditions, it becomes interesting model for the study of the control of pathogens in seeds. The objectives were to evaluate the incidence and severity of powdery mildew on seedlings of *H. impetiginosus* obtained *in vitro* and obtain methods of disease control in these culture conditions. Three experiments were conducted to presented high incidence, but variations in disease severity. In the first experiment, the seeds surface disinfection was done with different periods of soaking seeds of *H. impetiginosus* in 70% ethanol and sodium hypochlorite (2% active chlorine). The contamination by other fungi were very low, but the plantlets presented severe symptoms of powdery mildew. In the second experiment, besides the use of ethanol and sodium hypochlorite, was also used a contact and systemic fungicide: Cerconil WP (Chlorothalonil + Thiophanate Methyl). This fungicide is indicated for various cultures in the control of powdery mildew. Major periods of exposure to the fungicide seed seedlings have a higher incidence and severity of the disease, ie, more fragile seeds with disinfectants agent period had higher incidence and severity. In the third experiment, the goal was to test disinfectants agent used separately and add the Neem oil (1.5%) as alternative control of powdery mildew. The T4 (10 min. Nim at 1.5%) showed lower AUDPC, however, no difference between treatments of 70% ethanol and sodium hypochlorite. Among the treatments used only difference between T4 (10 min. Nim at 1.5%) and T3 (15 min. Chlorotalonil Thiophanate Methyl) with higher AUDPC. For identification and analysis of development of the fungus anatomical fragments of leaves, near the midrib, were analysed. The sections were examined under an optical microscope and scanning electron microscopy (SEM). Morphological analysis of the fungus have identified as *Oidium* sp. On the slides and SEM images were observed irregularities in abaxial epidermis of leaves developed *in vitro*, elevation and deformation of the stomata region and development of conidiophores.

Keywords: *Oidium* sp., Cerrado, *in vitro* propagation.

4.1 INTRODUÇÃO

Interações micro-organismos e plantas são comuns na natureza. As plantas estão ameaçadas por patógenos, mas em sua maioria estão envolvidas em interações neutras ou mutualísticas com os micro-organismos, por exemplo: associação subterrânea de plantas e fungos micorrízicos, os rizóbios; promoção do crescimento das plantas por meio de bactérias da rizosfera. Em partes da planta acima do solo são colonizados por bactérias e fungos (endófitos) que vivem internamente em seus tecidos e por micro-organismos da filosfera (epifíticos) (Partida-Martínez, 2011).

A propagação *in vitro* de vegetais é uma importante ferramenta com grande utilização para diversas finalidades. E o termo plantas axênicas tem sido difundido como um ideal a ser alcançado, havendo a busca de métodos que eliminem de forma eficaz todo e qualquer micro-organismo que possa crescer no meio de cultura. Porém, observa-se que a concepção de contaminação dentro da cultura de tecidos de plantas deve ser revista, assim como o conceito de planta axênica, pois muitos trabalhos mostram que mesmo em material vegetal assintomático *in vitro*, e considerado axênico, existe uma comunidade endofítica presente em sua grande maioria (Esposito-Polesi, 2011).

O oídio se situa entre as principais doenças fúngicas, ocorrendo em todas as regiões do mundo e na maioria das espécies vegetais cultivadas (Stadnik & Rivera, 2001). Também é amplamente distribuída entre as plantas silvestres, servindo de hospedeiros alternativos. Uma mesma espécie causadora de oídio pode infectar vários hospedeiros e um mesmo hospedeiro pode ser infectado por mais de uma espécie do patógeno (Silva et al., 2001). A posição taxonômica do causador da doença oídio em *H. impetiginosus* é *Oidium* sp. [Teleomorfo: *Erysiphe*] pertencente à família Erysiphaceae, ordem Erysiphales, classe Leotiomycetes, filo Ascomycota (Speciesfungorum, 2013).

Informações sobre micro-organismos associados a sementes florestais são escassas, o que torna necessário analisar o efeito de diferentes tratamentos no controle de patógenos em sementes (Silva et al., 2011). O controle de fungos biotróficos como *Oidium*, pode ser feito via sementes com auxílio de fungicidas de ação sistêmica para que o controle ocorra em órgãos aéreos (Reis et al, 2008). Outra via são os métodos de controle alternativos de doenças de plantas, oferecendo alternativas para reduzir a dependência dos agrotóxicos e contribuir com as exigências de qualidade ambiental (Bettiol, 2013).

Trabalhos relatando a incidência da doença oídio são escassos e pouco estudados para *H. impetiginosus*, além disso, os relacionados à incidência *in vitro* não foram descritos até o momento. Logo, o objetivo do trabalho foi testar eficiência do etanol (70%), hipoclorito de sódio, fungicida sistêmico e de contato Cerconil WP (Clorotalonil + Tiofanato Metílico) e óleo de Nim (1,5%) em plântulas de *H. impetiginosus in vitro*, através de avaliações da incidência e severidade e sugerir métodos de controle da doença oídio nestas condições de cultivo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, localizada em Goiânia, Goiás. Foram utilizadas plântulas de *H. impetiginosus* germinadas *in vitro*, oriundas de sementes de árvores localizadas no parque municipal Leolídio di Ramos Caiado, em Goiânia, GO.

4.2.1 Controle de oídio *in vitro*

Três experimentos foram realizados com plântulas de *H. impetiginosus* obtidas de sementes germinadas *in vitro*. Para todos os experimentos, foram selecionadas as maiores sementes de coloração amarelo-amarronzado claro. Em seguida, as alas membranáceas foram retiradas para evitar a retenção de água e auxiliar o processo de descontaminação. O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com inositol a 100 mg.L^{-1} , sacarose a 30 g.L^{-1} e solidificado com ágar a 7 g.L^{-1} . O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada a 120°C , por 20 minutos. As plântulas de *H. impetiginosus* foram mantidas *in vitro* em frascos de 300 mL com 30 mL de meio de cultura. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h na luz e 8 h no escuro e irradiância de $36 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.2.1.1 Experimento 1: Eficiência do etanol e do hipoclorito de sódio no controle de oídio

Sementes de *H. impetiginosus* foram submetidas a diferentes períodos de imersão em solução de etanol 70% e em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) acrescida de uma gota de detergente neutro para cada 100 mL de solução (Tabela 4.1). Após os tratamentos com hipoclorito de sódio, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram enxaguadas por três vezes com água destilada e autoclavada, e inoculadas em frascos com meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

Tabela 4.1 Tratamentos constituídos por diferentes períodos de imersão (em minutos) das sementes de *Handroanthus impetiginosus* em água destilada, etanol (70%) e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo).

Tratamentos	Água	Etanol (70%)	Hipoclorito de sódio (2%)*
T1	0	2	10
T2	0	5	20
T3	0	7	30
T4	30	2	10
T5	30	5	20
T6	30	7	30

* Acrescida de uma gota de detergente neutro para cada 100 mL de solução.

Avaliou-se a incidência fúngica de oídio entre os tratamentos realizados e a incidência total aos 30, 50 e 70 dias após o estabelecimento *in vitro*. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinquenta repetições e uma semente por parcela experimental. Os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste Tukey. Os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio do Software R.

4.2.1.2 Experimento 2: Eficiência do Clorotalonil + Tiofanato Metílico, etanol e hipoclorito de sódio no controle de oídio

Após a seleção, as sementes foram submetidas aos tratamentos (Tabela 4.2.) realizados em câmara de fluxo laminar, as sementes foram enxaguadas por três vezes com água destilada e autoclavada, e inoculadas em frascos com meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Tabela 4.2 Tratamentos constituídos por períodos de imersão (em minutos) das sementes de *Handroanthus impetiginosus* em etanol 70%, Cerconil (Clorotalonil + Tiofanato Metílico) 1% e 2% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo).

Tratamentos	Etanol 70%	Clorotalonil + Tiofanato Metílico 1%	Clorotalonil + Tiofanato Metílico 2%	Hipoclorito de sódio *
T1	2	5	-	10
T2	2	10	-	10
T3	2	15	-	10
T4	2	-	5	10
T5	2	-	10	10
T6	2	-	15	10

* Acrescida de uma gota de detergente neutro para cada 100 mL de solução.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com vinte e quatro repetições, e uma semente por parcela experimental. Foram realizadas três avaliações da severidade de oídio, a primeira após 30 dias da inoculação e as seguintes a cada 20 dias usando uma escala de severidade (Tabela 4.3), que variava de 0 (ausência de sintomas) a 5 (infecção muito severa). Os dados foram transformados utilizando-se $\arcsin \sqrt{x/100}$, submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o Software R.

4.2.1.3 Experimento 3: Eficiência do etanol, hipoclorito de sódio, Clorotalonil + Tiofanato Metílico e óleo de Nim no controle de oídio

Após a seleção, as sementes foram submetidas aos tratamentos indicados na Tabela 4.4. Em seguida os tratamentos realizados em câmara de fluxo laminar, as sementes foram enxaguadas por três vezes com água destilada e autoclavada, e inoculadas em frascos com meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quarenta e quatro repetições, e uma semente por parcela experimental. As avaliações foram realizadas aos 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 dias após estabelecimento *in vitro*, totalizando-se oito avaliações. As avaliações foram feitas na escala de severidade citada, no experimento anterior. Foi calculada a variável área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Shaner & Finney, 1977), através da fórmula: $AACPD = \sum [((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)]$, onde y_1 e y_2 são duas avaliações

consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente. Os dados foram transformados utilizando-se $\arcsin \sqrt{x/100}$, submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o Software R.

Tabela 4.3 Escala de avaliação da severidade de oídio em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* obtidas por germinação *in vitro*. Escala modificada de Paz Lima et al. (2004).

Notas	Infecção	Descrição
0	SEM SINTOMAS	Foias sem sinais de lesões
1	LEVE	Esporulação com menos de 25% de área foliar afetada, sem deformação, sem necrose, e quedas das folhas primárias.
2	MÉDIA	Esporulação com menos de 25% de área foliar afetada, com deformação, com ou sem necrose, e quedas das folhas primárias.
3	MODERADA	Esporulação com mais de 25% e menos de 50% de área foliar afetada, com deformação, com necrose, enrolamento e quedas das folhas primárias.
4	SEVERA	Esporulação com mais de 50% de área foliar afetada, com deformação, com necrose, enrolamento e quedas das folhas primárias.
5	MUITO SEVERA	Cobertura total da área foliar afetada, com deformação, com necrose, enrolamento e quedas das folhas primárias.

Tabela 4.4 Tratamentos constituídos por períodos de imersão (em minutos) das sementes de *Handroanthus impetiginosus* em etanol 70%, Cerconil WP (Clorotalonil + Tiofanato Metílico) 1% e 2%, hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e óleo de Neen (1,5%) visando sua descontaminação e posterior germinação *in vitro*.

Tratamentos	Etanol 70%	Clorotalonil + Tiofanato Metílico 1%	Hipoclorito de sódio*	Nim
T0	-	-	-	-
T1	2	-	10	-
T2	2	5	10	-
T3		15		
T4				10

* Acrescida de uma gota de detergente neutro para cada 100 mL de solução.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Controle de oídio *in vitro*

4.3.1.1 Experimento 1: Eficiência do etanol e do hipoclorito de sódio no controle de oídio

Após vinte dias, plântulas de *H. impetiginosus* mantidas *in vitro*, em todos os tratamentos, começaram a apresentar os sintomas típicos da doença com o desenvolvimento de micélio branco cobrindo a região abaxial da folha, criando um aspecto pulverulento. Nos fungos causadores de oídio, todo o processo de colonização ocorre externamente ao hospedeiro. O micélio do patógeno desenvolve-se na superfície das folhas, emitindo haustórios unicamente para as células da epiderme da planta (Amorim & Pascholati, 2011).

Após a primeira avaliação, realizada 30 dias após a inoculação das sementes, constatou-se que o tratamento T6 apresentou menor incidência de oídio em relação aos demais (32%). Porém, T6 não diferiu estatisticamente dos tratamentos T3 (59%), T4 (58%) e T5 (38%). Os tratamentos T1 e T2 apresentaram 64% e 66% de incidência respectivamente (Figura 4.1). Infelizmente, este controle não se mostrou efetivo ao longo do tempo. Após 30 dias do estabelecimento *in vitro*, 55% das plantas utilizadas no Experimento 1, em todos os tratamentos, apresentavam sintomas de oídio. Após 50 dias este percentual subiu para 73% e este número manteve-se após a última avaliação feita 70 dias após o início do experimento.

Sementes utilizadas para o estabelecimento *in vitro* de *H. impetiginosus* foram obtidas de uma matriz com grande quantidade de frutos, dos quais foram selecionados àqueles com menor incidência de ataques de insetos e sinais de doenças. Entretanto, mesmo os frutos estando sadios, fungos superficiais às sementes irão ocorrer. Botelho et al. (2008) relatam que *Alternaria alternata*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Phoma sp.* e *Phomopsis sp.* são fungos que frequentemente estão presentes em sementes de *H. impetiginosus* sin. *T. impetiginosa*. Silva et al. (2011) relataram que a presença do fungo do gênero *Aspergillus* foi inibida, tanto pelos fungicidas Captan e Tiram como também pelo hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) em sementes de *Tabebuia heptaphylla* (Vell. Tol.) e *Tabebuia chysotricha* Mart. ex. DC. Stand, indicando se tratar de infestação superficial

deste patógeno. Logo, a utilização de etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) poderiam controlar a população fúngica presente no lote de sementes.

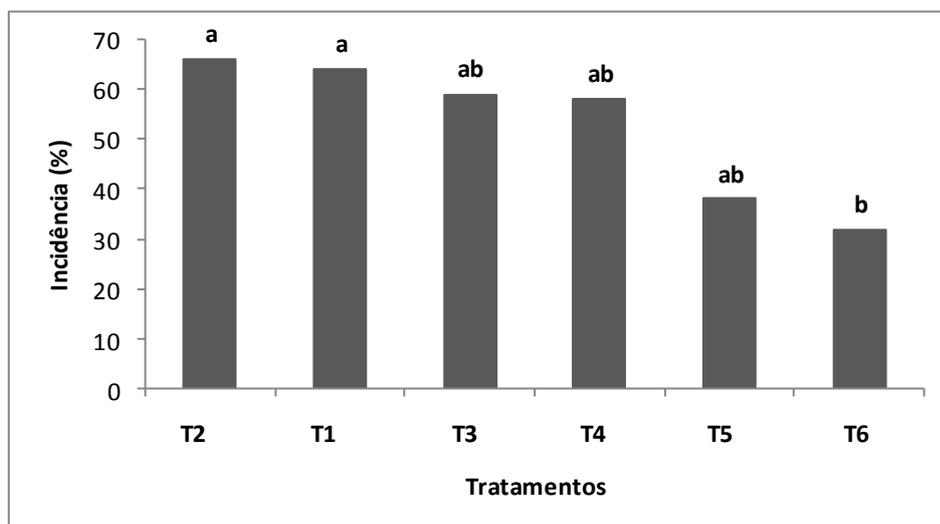


Figura 4.1 Porcentagem de incidência de oídio em plântulas de *H. impetiginosus* estabelecidas *in vitro* 30 dias após a inoculação de sementes em meio MS e que foram submetidas a diferentes tratamentos de descontaminação. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,5$).

Embora os tratamentos com etanol e hipoclorito tenham sido efetivos no controle de outros fungos, não tiveram a mesma eficácia com o fungo causador do oídio. As colônias e fungo iniciavam-se nas folhas mais jovens e, com o crescimento, observou-se a colonização com grande quantidade de micélio, quando se tornam completamente expandidas. Algumas folhas colonizadas pelo patógeno ficaram enroladas ou em forma de canoa. Outros sintomas também ocorreram como a necrose em brotos, gemas e caule, superbrotação levando a perda da dominância apical das plântulas, e queda das folhas quando a colonização já estava avançada (Figura 4.2).

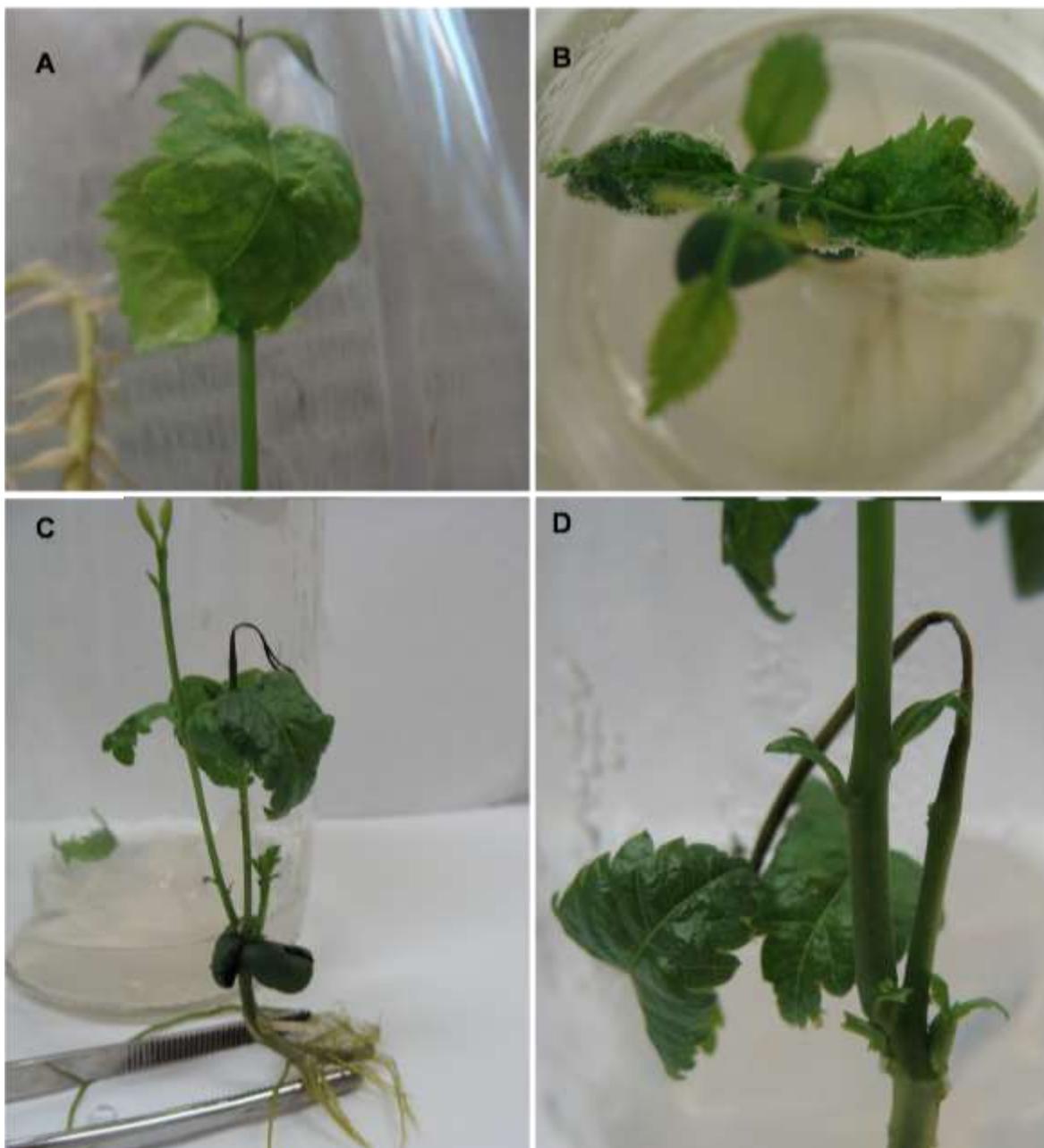


Figura 4.2 Sintomas de *Oidium* em *Handroanthus impetiginosus* *in vitro*. Enrolamento das folhas (A); encanoamento das folhas (B); necrose do caule de excesso de brotação (C, D).

4.3.1.2 Experimento 2: Eficiência do Clorotalonil + Tiofanato Metílico, etanol e hipoclorito de sódio no controle de oídio

No Experimento 2, além do etanol e do hipoclorito de sódio, os tratamentos também incluíram um fungicida sistêmico e de contato Cerconil WP (clorotalonil +

tiofanato metfílico), o qual é recomendado para o controle em campo de várias culturas como feijão, melão, melancia e rosas no controle de oídio (Ihara, 2013). O Cerconil WP (Clorotalonil + Tiofanato Metfílico) pertence ao grupo químico dos benzimidazois, precursor de tiofanato-metfílico e isoftalonitrila clorotalonil (Mapa, 2013).

Neste experimento, os sintomas da doença começam a aparecer assim que as plântulas apresentaram o primeiro par de folhas, aproximadamente 20 dias após a inoculação. Após 40 dias, a maioria das plântulas já possuía parte aérea, e a incidência média de 77,17%. Aos 60 dias 81% das plântulas apresentaram os sintomas (Tabela 4.5.)

Tabela 4.5 Médias em porcentagem de incidência de oídio em plântulas de *H. impetiginosus* aos 20, 40 e 60 dias após o estabelecimento *in vitro*.

Tratamentos	Incidência (%)			
	20 dias	40 dias	60 dias	Média
T1	9 b	61 a	61 a	43 b
T2	54 a	92 a	92 a	79 a
T3	34 ab	92 a	92 a	72 a
T4	20 ab	68 a	72 a	54 ab
T5	14 b	81 a	86 a	60 ab
T6	39 ab	69 a	83 a	64 ab
Média	28,33	77,17	81,00	63
CV(%)	60,17	17,06	15,14	20,68

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a de 5 % de significância. **T1**- 2 minutos em etanol 70%, 5 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico 1% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T2** - 2 minutos em etanol 70%, 10 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico 1% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T3** - 2 minutos em etanol 70%, 15 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico 1% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T4** - 2 minutos em etanol 70%, 5 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico 2% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T5** - 2 minutos em etanol 70%, 10 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico 2% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T6** - 2 minutos em etanol 70%, 15 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico 2% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio.

O objetivo de quantificar a doença em *H. impetiginosus* foi realizado através da avaliação dos sintomas causados pelo agente patogênico e da proporção de tecido doente. A variável incidência é um processo quantitativo de medição da doença, sendo obtido pela contagem de plantas doentes, sem levar em consideração a quantidade de doença em cada planta ou órgão individualmente. E a severidade, também um método quantitativo e qualitativo, busca determinar a porcentagem da área de tecido doente (sintomas e/ou sinais visíveis), para a medição direta da área afetada, com chaves descritivas, diagramáticas, medição automática e sensores remotos e computadores (Moraes, 2007).

No Experimento 2 foi adotado um padrão para estabelecer o grau de severidade da doença. Moraes (2007) assegura que a medição da severidade expressa com mais precisão os danos reais causados pelos patógenos; caracteriza melhor o nível de resistência a um patógeno e expressa com mais exatidão a intensidade da doença.

A severidade encontrada nas plantas em T3 foi maior em todas as avaliações, diferindo apenas de T4 em duas avaliações e T1 na última avaliação (Tabela 4.6). A severidade média apresentou comportamento leve (nota 1) a moderado (nota 3). Costamilan (2001) comenta que escalas para medição de avaliação quantitativa de doença foliar dificilmente serão interpretadas da mesma forma por todos avaliadores. Por isso, é importante a realização de várias leituras de cada severidade antes da avaliação final visando, principalmente, à identificação de reações de resistência e de suscetibilidade entre genótipos.

Tabela 4.6 Médias de severidade de oídio em plântulas de *H. impetiginosus* aos 60, 80 e 100 dias após estabelecimento *in vitro*.

Tratamentos	60 dias	80 dias	100 dias	Média
T1	1,57 ab	1,57 ab	1,65 b	1,56 a
T2	2,75 ab	2,75 ab	2,95 ab	2,75 ab
T3	2,92 a	2,92 a	3,15a	2,92 b
T4	1,56 b	1,56 b	1,88 ab	1,57 ab
T5	2,43 ab	2,48 ab	2,76 ab	2,48 ab
T6	2,26 ab	2,30 ab	2,52 ab	2,30 ab
Média	2,24	2,26	2,48	1,66
CV(%)	25,70	25,70	23,95	30,98

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a de 5 % de significância. **T1**- 2 minutos em etanol 70%, 5 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metílico 1% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T2** - 2 minutos em etanol 70%, 10 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metílico 1% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T3** - 2 minutos em etanol 70%, 15 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metílico 1% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T4** - 2 minutos em etanol 70%, 5 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metílico 2% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T5** - 2 minutos em etanol 70%, 10 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metílico 2% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio; **T6** - 2 minutos em etanol 70%, 15 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metílico 2% e 10 minutos em Hipoclorito de sódio.

As maiores taxas de incidência e severidade em T2 e T3 podem estar relacionadas aos efeitos tóxicos dos agentes desinfestantes utilizados ou ao tempo de exposição à estes agentes (Tabela 4.5 e 4.6). Provavelmente, tratamentos que utilizaram o fungicida Clorotalonil + Tiofanato Metílico por mais tempo fragilizaram o tecido das

sementes, tornando-as mais frágeis e susceptíveis a infecção do oídio. O fungo, provavelmente, pouco sofreu com a aplicação do fungicida nas concentrações utilizadas.

Os tratamentos T1 e T4 foram os que apresentaram menores incidências e severidades (Tabela 4.5 e 4.6). Supostamente, o menor tempo em Clorotalonil + Tiofanato Metílico degradou menos os tecidos das sementes levando, portanto, a menores alterações fisiológicas. Sementes menos fragilizadas com o tempo de exposição aos agentes desinfestantes obtiveram menor incidência e severidade.

Analisando a ação do etanol 70% e hipoclorito de sódio neste experimento, eles contribuíram para o controle de fungos superficiais e também na deterioração da membrana celular das sementes. Pasqual et al. (2010) comenta que os alcoóis além de germicidas também removem as ceras superficiais dos tecidos das plantas. A imersão dos explantes em etanol permite que os tecidos de plantas possam ser mais efetivamente molhados e penetrados por germicidas. O hipoclorito de sódio causa alterações biossintéticas no metabolismo celular e destruição dos fosfolipídios formando cloraminas (NH_2Cl) que interferem no metabolismo celular tanto nos micro-organismos quanto dos tecidos dos explantes (Pasqual et al., 2010). Como em todos os tratamentos o período de imersão em etanol 70% e em hipoclorito de sódio foi o mesmo, as variações na incidência e severidade podem ser decorrência dos períodos que as sementes foram tratadas com o fungicida Clorotalonil + Tiofanato Metílico.

Costa et al. (2008) comentam que para manter a funcionalidade metabólica dos tecidos das sementes é necessário que as membranas apresentem-se estruturalmente e fisiologicamente íntegras. Alterações fisiológicas estão ligadas com a integridade das membranas celulares, as quais dependem da variedade de enzimas e proteínas estruturais de cada espécie. Além disso, estas alterações nem sempre podem ser avaliadas por testes de germinação e vigor (Vieira, 1996).

4.3.1.3 Experimento 3: Eficiência do etanol , hipoclorito de sódio, Clorotalonil + Tiofanato Metílico e óleo de Nim no controle de oídio

No Experimento 3, além do etanol, hipoclorito de sódio e Clorotalonil + Tiofanato Metílico, os tratamentos incluíram o óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) para testar o controle do oídio nas plântulas de *H. impetiginosus in vitro*. No tratamento (T0), controle, após sete dias de estabelecimento *in vitro*, 100% dos explantes

apresentavam incidência fúngica e bacteriana. As sementes não germinaram, inviabilizando as avaliações futuras de incidência e severidade.

A incidência de oídio foi avaliada desde o aparecimento dos primeiros sintomas até o final do período de avaliação (14 a 28 dias após o estabelecimento *in vitro*). Embora tenham ocorrido diferenças significativas nas primeiras avaliações, todos os tratamentos apresentaram altas taxas de incidência a partir da sexta avaliação (24 dias após estabelecimento *in vitro*) (Tabela 4.7).

Após o início da doença (14 dias após estabelecimento *in vitro*), a média da severidade inicial foi de 0,24, mantendo-se em níveis inferiores a nota 1 por mais quatro dias (Tabela 4.8). Neste experimento, a severidade máxima foi alcançada em alguns indivíduos após 18 dias de estabelecimento *in vitro*, demonstrando a velocidade do progresso da doença.

No tratamento T4 (10 min. em Nim a 1,5%) a severidade de oídio foi significativamente inferior aos demais tratamentos nas quatro primeiras avaliações, indicando que o produto afetou o desenvolvimento inicial da doença (Tabela 4.8). O óleo de Nim já havia sido testado no controle de oídio causado pelo fungo *Erysiphe polygoni* no feijoeiro em casa de vegetação e obteve êxito, reduzindo o número de manchas nas folhas em 97% na média, quando tratado com concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5% de óleo de Nim emulsionável (Carneiro, 2007).

Óleo de Nim (2%) também foi testado *in vitro* para o controle de outros fungos, promovendo entre os tratamentos utilizados o maior efeito negativo sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vaill inibindo a germinação, crescimento de colônias e conidiogênese (Hirose et al., 2001).

Por outro lado, nestas mesmas condições o óleo de Nim não conseguiu suprimir o crescimento de fungos de *Aspergillus flavus*. A pesquisa enfatizou que o óleo de Nim não foi fungistática ou fungicida, mas exibiu atividade antiaflatoxina, ou seja, inibiu a produção de substâncias químicas tóxicas do fungo (Costa et al., 2010).

Após 20 dias do estabelecimento *in vitro*, o tratamento T1 já havia atingido 100% de incidência, e a média geral desta avaliação foi de 89% de incidência. Para a variável severidade a média geral foi de 2,05 (severidade média).

Para a maioria das doenças foliares, a relação entre a incidência e a severidade é menos evidente, podendo levar a conclusões equivocadas (Moares, 2007; Amorim &

Bergamim Filho, 2011). Quando a incidência já é elevada, a evolução da doença se dá pelo aumento da severidade (Amorim & Bergamim Filho, 2011)

Tabela 4.7 Médias em porcentagem de incidência de oídio em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* em oito avaliações*.

Tratamentos	14 dias	16 dias	18 dias	20 dias	22 dias	24 dias	26 dias	28 dias
T1	17 b	45 ab	95 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
T2	7 b	56 ab	90 a	97 a	100 a	100 a	100 a	100 a
T3	54 a	62 a	79 a	87 ab	87 ab	95 a	95 a	100 a
T4	14 b	27 b	48 b	72 b	82 b	93 a	93 a	97 a
Médias	23.00	47.50	78.00	89.00	92.25	97.00	97.00	99.25
CV(%)	91.68	32.36	27.03	14.18	9.95	3.67	3.67	1.51

* Avaliações realizadas com intervalos de dois dias. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a de 5 % de significância. **T1**- 2 minutos em etanol 70%, 10 minutos em NaOCl 2%; **T2**- 2 minutos em etanol 70%, 5 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico, 10 minutos em NaOCl 2%; **T3**- 15 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico ; **T4**- 10 minutos em Neen a 1,5%.

Tabela 4.8 Severidade de oídio em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* em oito avaliações*, e área abaixo da curva de progresso da severidade de oídio (AACPD).

Trat.	14 dias	16 dias	18 dias	20 dias	22 dias	24 dias	26 dias	28 dias	Média	AACPD
T1	0.17 b	0.67 b	2.14 a	2.26 a	2,36 a	2,58 a	2,78 a	3,0 a	1.99 ab	8,90 ab
T2	0.07 b	0.66 b	1.63 ab	1,98 ab	2,05 a	2,41 a	2,54 a	2.90 a	1.78 ab	5,58 ab
T3	0.54 a	1.41 a	2.13 a	2.34 a	2,50 a	2,88 a	3,04 a	3.50 a	2.29 a	3,16 a
T4	0.18 b	0.44 b	1.14 b	1,62 b	1,93 a	2,37 a	2,59 a	2.89 a	1,64b	3,37 b
CV(%)	85,86	3,27	27,10	5,88	1,99	9,06	8,28	9,42	4,68	5,36

* Avaliações realizadas com intervalos de dois dias. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a de 5 % de significância. **T1**- 2 minutos em etanol 70%, 10 minutos em NaOCl 2%; **T2**- 2 minutos em etanol 70%, 5 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico, 10 minutos em NaOCl 2%; **T3**- 15 minutos em Clorotalonil + Tiofanato Metfílico ; **T4**- 10 minutos em Neen a 1,5%.

Com os dados da curva de progresso da doença verifica-se quanto a doença aumenta por unidade de tempo (por dia, semana ou ano) na população considerada (Figura 4.3). Na AACPD de oídio em plântulas de *H. impetiginosus in vitro* (Tabela 4.8), observou-se interação significativa entre os fatores explantes e tratamento. O tratamento T4 (10 min. em Nim 1,5%) demonstrou AACPD inferior, porém, não houve diferença entre os tratamentos que utilizaram etanol 70% e hipoclorito de sódio. T3 foi o tratamento com maior AACPD.

Pode-se ainda deduzir que há uma tendência à persistência prolongada dos tratamentos uma vez que houve curvas com menor inclinação em T4 durante o período de avaliação. Diferenças quantitativas quanto à severidade de oídio podem ser observadas tanto em estágio de plântula quanto no estágio de planta adulta, sendo que essas reações nem sempre correspondem. Em plântulas, resistência do tipo quantitativa pode ser eficientemente detectada desde que se estabeleçam certas condições para a avaliação. Por exemplo, as avaliações de resistência de plântulas de trigo ou de cevada sempre são realizadas em casa de vegetação (Costamilan, 2001).

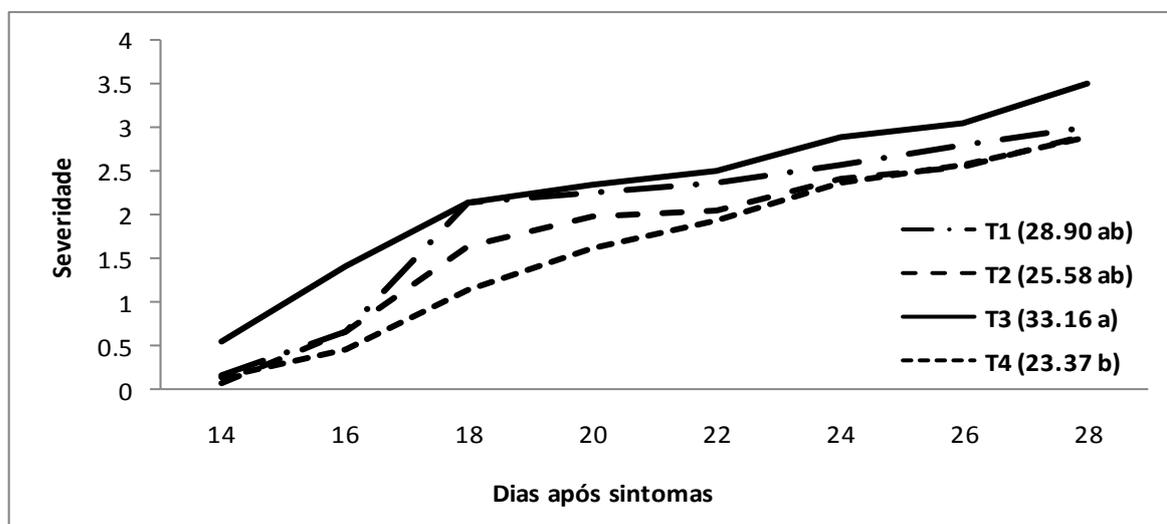


Figura 4.3 Curva do progresso da severidade do oídio em plântulas de *Handroanthus impetiginosus*. T1 – 2 min. álcool 70% e 10 min. NaOCl; T2 – 2 min. álcool 70%, 5 min. de Clorotalonil + Tiofanato Metílico, 10 min. NaOCl; T3 – 15 min. de Clorotalonil + Tiofanato Metílico; T4 – 10 min. Nim a 1,5%. Severidade: 0 - ausência de sintomas a 5 - infecção muito severa. Valores entre parênteses na legenda representam a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV = 15,96 %.

Amorim & Pascholati (2011) relataram que a umidade influencia na reprodução de espécies do gênero *Oidium*. Existem diferenças quanto à preferência por níveis de umidade relativa (baixa, alta ou intermediária) entre as diferentes espécies deste gênero. Outras variáveis também exercem influência na produção de esporos, como temperatura, luz e o estado nutricional do hospedeiro. Para parasitas biotróficos, a esporulação é maior quando as condições favoráveis a fotossíntese (fotoperíodos longos, intensidade luminosa elevada, amplo espectro de luz) ocorrem no período de colonização, o teor de açúcar nos tecidos dos hospedeiros também tem sido associado ao comportamento dos patógenos. Todas essas vantagens para reprodução e desenvolvimento do fungo são encontradas *in vitro*.

Nestes três experimentos foi avaliado o comportamento de *Oidium in vitro*. A descrição dos sintomas a campo é muito semelhante aos que foram observados *in vitro*. Os métodos de controle da doença utilizados reduziram os níveis de severidade, porém não houve o controle da doença. Este patossistema merece atenção, pois em todos os experimentos atingiu níveis altos de incidência com variação nos níveis de severidade. O comportamento desta doença para *H. impetiginosus* em geral é colonização rápida e severa, causando deformações nas plântulas e grande prejuízo para produção de mudas.

4.4 CONCLUSÕES

- Redução da severidade foi observada em sementes tratadas com etanol 70% e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e imersão em óleo de Neen a 1,5% por 10 minutos. Porém, nenhum dos tratamentos testados foi efetivo para o controle do oídio em plântulas de *H. impetiginosus* desenvolvidos *in vitro*. São necessários mais estudos sobre o controle do oídio *in vitro* com cada forma de assepsia isoladamente.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L.; PASCHOLATI S. Ciclo e relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piraciba - SP: agronômica Ceres, 2011, v. 1, cap. 4, p 61- 98.

ARAMBARRI, A. M.; FREIRE, S. E.; BAYÓN, N. D.; COLARES, M. N.; MONTI, Claudia; N. M. C.; HERNÁNDEZ, M. P. Morfoanatomía foliar de árboles medicinales de la Provincia Biogeográfica de las Yungas (Argentina). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 8, n. 5, p. 342-379, 2009.

BARNETT, H. L.; B. B. HUNTER. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. St. Paul, Minnesota: **The American Phytopathological Society Press**, 1998. 218 p.

BETTIOL, W. **Controle alternativo**. Brasília: Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_23_299200692526.html >. Acesso em: 03 mar. 2013.

BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeitos na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BOTELHO, L. S. **Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), aroeira-pimenteira (*Schinus terebinthifolius*) e aroeira-salsa (*Schinus molle*): incidência, efeitos na germinação, transmissão para plântulas e controle**. 2006. 114 f. (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. (Ed.). **Introduction to plant disease epidemiology**. New York, NY: Wiley, 1990. 532 p.

CARNEIRO, S.M. DE T.P.G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M.E. DA C.; GOMES, J.C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p.34-39, 2007.

COSTA, C. J.; VILLELA, F. A.; BERTONCELLO, M. R.; TILLMANN, M. A. A.; MENEZES, N. L. Pré-hidratação de sementes de ervilha e sua interferência na avaliação do potencial fisiológico. **Revista brasileira de sementes**, Londrina, v. 30, n.1, p. 198-207, 2008.

COSTA, C. L. C.; GERALDO, M. R. F.; ARROTÉIA, C. C.; KEMMELMEIER, C. *In vitro* activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and Aflatoxins B1 and B2 production. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Toronto, v.1, n.1, p. 92-299, 2010.

COSTAMILAN, L. M. **Metodologias para estudo de resistência genética de trigo e de cevada a oídio**. Passo Fundo: Embrapa Trigo. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do14_1.htm. Acesso em: 14 fev. 2013.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Micro-organismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

FORCELINI, C.A.; REIS, E.M. Controle de *Helminthosporium sativum*, *Septoria nodorum*, *Fusarium graminearum* e *Erysiphe graminis* f. sp. tritici pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, n.1, p.28-31, 1988.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J.; ZEQUI, J.A. C.; MARTINS, L. H.; PERALTA, C. H.; MOINO JR, A. Effect of biofertilizers and Neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n.4, p. 419-423, 2001.

IHARA. **Iharabras S.A. Indústrias Químicas. Fungicidas: Cerconil WP**. Disponível em: <http://www.ihara.com.br/defensivos/fungicidas/cerconil-wp/68/>. Acesso em: 14 fev. 2013.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cerconil WP**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/CERCONIL_S C.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2013.

MARTINEZ, S. S. **O Nim *Azadirachta indica* um Inseticida Natural**. Instituto Agrônômico do Paraná-IAPAR, PR. Atualizado em: 20 fev. 2008). Disponível em:<<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=410>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

MORAES, S.A. de **Quantificação de doenças de plantas**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/doencas/index.htm>. Acesso em: 15/3/2013

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

PAIVA, J. G. A.; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHAES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500[®]: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 257-264, 2006.

PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P.; HEIL, M. The microbe-free plant: fact or artifact?. **Frontiers in plant science**, Lausanne-Switzerland, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2011.

PAZ LIMA, M. L.; LOPES, C. A.; CAFÉ FILHO, A. C. Estabilidade da resistência de *Capsicum* spp. ao Oídio em Telado e Casa de Vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 519-525. 2004.

REIS, E.M.; MOREIRA, E. N.; CASA, R. T.; BLUM, M. M.C. Eficiência e persistência de fungicidas no controle do oídio do trigo via tratamento de sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 371-374, 2008.

RESENDE, L. V.; SILVA, M. M. Biotecnologia e proteção de plantas. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. 1. ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

SILVA, A. M. L.; COSTA, M. F. B.; LEITE, V. G.; REZENDE, A. A.; TEIXEIRA, S. P. Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 329-33, 2009.

SILVA, G. L.; COSMI, F. C.; SOUZA, A. F. Efeito do tratamento químico na sanidade de sementes de espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 473-478, 2011.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effects of nitrogen fertilization on the expression of show-mildwing in knox wheat. **Phytopathology**, Paul, MN, v. 67, p. 1051 -1055, 1977.

SPECIES FUNGORUM. **CABI databases**. Disponível em:< <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 26, n. 1, p. 175-177. 2000.

VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**. 1996.127 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

YARWOOD, C.E. Powdery mildews. **The botanical Review**, Washington v. 23, n. 1, p. 235-301, 1957.