





## Crescimento mínimo e retomada de crescimento in vitro em brotações de *Luehea divaricata*

Karol Buuron da Silva<sup>1\*</sup>, Lia Rejane Silveira Reiniger<sup>1</sup>, Silvia Machado dos Santos Rabaioli<sup>1</sup>, Caetano Miguel Lemos Serrote<sup>2</sup>, Charlene Moro Stefanel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Lúrio, Avenida do Trabalho, Central, Lichinga, Moçambique

### \*Autor correspondente:

karolbuuron@hotmail.com

### Termos para indexação:

Recurso genético vegetal  
Germoplasma  
Cultura de tecidos

### Index terms:

Plant genetic resources  
Germplasm  
Tissue culture

### Histórico do artigo:

Recebido em 15/07/2019

Aprovado em 14/07/2021

Publicado em 29/11/2021

**Resumo** - O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do sorbitol e do período de cultivo in vitro sobre o crescimento mínimo e a subsequente retomada do crescimento de brotações de *Luehea divaricata*. Foram realizados dois ensaios, um de crescimento mínimo e o outro de retomada de crescimento. No crescimento mínimo, observou-se redução nas médias de sobrevivência, estabelecimento, número de folhas e de raízes primárias e secundárias na presença de sorbitol. Quando se considerou o período, observou-se redução aos 30 dias seguida de aumento e estabilização nas médias de raízes primárias e secundárias e do número de folhas e de brotos. Na retomada de crescimento, a presença de sorbitol promoveu uma redução significativa nas médias de sobrevivência, estabelecimento, número de folhas e de brotos. Somente a partir dos 120 dias observou-se um decréscimo das médias na sobrevivência e estabelecimento. A presença de sorbitol é importante para realizar a conservação in vitro de *L. divaricata* via crescimento mínimo, o qual pode ser realizado por um período de até 120 dias. A subsequente retomada de crescimento das brotações conservadas na presença de sorbitol é limitada a 90 dias.

### Minimum growth in vitro and resumed growth of *Luehea divaricata* shoots

**Abstract** - The objective of this work was to evaluate the effect of sorbitol and on the growth period on minimum growth and subsequent resumed growth of *Luehea divaricata* shoots. Two tests were performed, one of minimal growth and the other of resumed growth. In the presence of sorbitol at minimum growth there was a reduction in averages of survival, establishment, number of leaves and primary and secondary roots. When the period was considered, it was observed a reduction at 30 days followed by increase and stabilization in averages of primary and secondary roots, and number of leaves and of shoots. The presence of sorbitol promoted a significant reduction in averages, in the resumed growth, for survival, establishment, number of leaves and of shoots. A decrease of averages in survival and establishment was observed only after 120 days. The presence of sorbitol is important for in vitro conservation of *L. divaricata* by minimum growth, which can be carried out for up to 120 days. The subsequent resumed growth of the shoots preserved in the presence of sorbitol is limited to 90 days.



## Introdução

A conservação de germoplasma *in vitro* é muito importante nos programas de melhoramento de plantas, pois esta estratégia possibilita a manutenção de um grande número de acessos de germoplasma em um pequeno espaço físico, livre das intempéries e riscos que existem em campo, reduzindo os custos e facilitando a disponibilidade de material para emprego direto no melhoramento genético. Assim, os denominados bancos de germoplasma *in vitro* são coleções mantidas em laboratório, em condições de crescimento reduzido das amostras vegetais a partir de meristemas ou outros tecidos das plantas (Matsumoto et al., 2010). No Brasil, são estimados cerca de 250 bancos ativos de germoplasma de plantas (BAG), incluindo espécies florestais nativas, frutíferas e agrícolas (Costa et al., 2012).

Particularmente, no caso de espécies florestais nativas, a conservação em BAG é estratégica, devido à vulnerabilidade desses recursos genéticos na natureza, em função da intensa degradação ambiental nas últimas décadas, o que vem reduzindo drasticamente as populações naturais. No Brasil, o bioma Mata Atlântica é o que apresenta a maior diversidade de espécies arbóreas por unidade de área (454 espécies ha<sup>-1</sup>) (Stehmann et al., 2009). No entanto, a erosão genética registrada neste bioma tem aumentado gradativamente nas quatro últimas décadas (Silva & Perelló, 2010).

Uma das técnicas utilizadas com sucesso para conservar germoplasma é o crescimento mínimo, que consiste em reduzir o máximo possível o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade. Esta diminuição na atividade metabólica pode ocorrer pela redução na intensidade de luz, temperatura, concentração dos componentes salinos e orgânicos ou pelo acréscimo de reguladores de crescimento ao meio nutritivo (Withers & Williams, 1998), entre outras intervenções. Igualmente, o crescimento mais lento da cultura pode ser obtido com o emprego de alguns agentes osmóticos, como o manitol, sorbitol e a sacarose (Dumet et al., 1993).

Os agentes osmóticos adicionados ao meio nutritivo têm como principal objetivo desacelerar ou suprir totalmente o crescimento do material vegetal que se quer preservar, durante o maior tempo possível, sem, contudo, influenciar negativamente a estabilidade genética e a viabilidade das plantas. Assim, esses agentes osmóticos promovem a remoção do excesso de

água intracelular, por gradiente osmótico, e com isso a planta tem uma redução da capacidade de absorção de água e de nutrientes do meio nutritivo, o que resulta no crescimento mais lento da espécie (Barrueto Cid, 2010). No entanto, a eficiência da metodologia de crescimento mínimo deve ser comprovada com a subsequente retomada do crescimento das plantas, sob condições normais de cultivo, após um determinado período de conservação *in vitro*.

*Luehea divaricata* (Malvaceae) é uma espécie florestal nativa do bioma Mata Atlântica, conhecida popularmente como açoita-cavalo. Suas populações naturais têm sido devastadas ao longo dos anos, em decorrência do grande potencial da madeira para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas (Flôres et al., 2011). Sendo assim, o desenvolvimento de alternativas tecnológicas para garantir a perpetuação dessa espécie é essencial. Neste contexto, no presente trabalho foi investigada a conservação *in vitro* de germoplasma de *L. divaricata* através da cultura de tecidos, mais especificamente, pela metodologia de crescimento mínimo.

Existem poucos trabalhos de conservação *in vitro* utilizando técnicas de crescimento mínimo na literatura, contudo, os estudos relatados têm mostrado resultados promissores em espécies florestais de importância econômica e ambiental, como em *Cedrela fissilis* Vell. (Nunes et al., 2003), *Hancornia speciosa* Gomes (Santos et al., 2011) e *Populus alba* L. (Hwida, 2012). Entretanto, como as respostas podem variar em função da espécie, genótipo e idade da planta que se deseja conservar *in vitro*, os protocolos destes trabalhos não podem ser padronizados, o que ressalta a importância de estudos específicos para cada caso. Frente a isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do sorbitol e do período de cultivo *in vitro* sobre o crescimento mínimo e a subsequente retomada do crescimento de brotações de *L. divaricata*.

## Material e métodos

O ensaio de crescimento mínimo e de retomada do crescimento foram realizados no laboratório do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 2 x

4, em que os tratamentos consistiram da adição do sorbitol (0 ou 10 g L<sup>-1</sup>) ao meio nutritivo, e os períodos de cultivo (30, 60, 90 ou 120 dias), totalizando oito tratamentos com oito repetições. Os explantes utilizados foram segmentos nodais de *Luehea divaricata* com aproximadamente 7 mm de comprimento, provenientes do desenvolvimento de plântulas obtidas via germinação in vitro, com cultivo em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) durante 60 dias (Silva et al., 2019). Cada repetição foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 3 °C e 16 h), e intensidade luminosa de 20 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-2</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações ocorreram aos 30, 60, 90 e 120 dias em cada ensaio, considerando as variáveis sobrevivência (explantes com coloração verde, %), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento, em %), formação de raízes primárias (%), formação de raízes secundárias (%), número de folhas e número de brotos.

#### *Crescimento mínimo*

O meio nutritivo utilizado no ensaio de crescimento mínimo foi o MS reduzido à metade da concentração de sais (MS/2), acrescido de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e sorbitol (0 ou 10 g L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 min a 121 °C e 1 atm de pressão.

#### *Retomada de crescimento*

Após a realização do experimento de crescimento mínimo, as culturas foram expostas novamente às condições de desenvolvimento padrão para a espécie, que são usualmente utilizadas em nosso grupo de pesquisa, descritas a seguir. Nesse ensaio os tratamentos foram constituídos pela combinação do sorbitol (0 ou 10 g L<sup>-1</sup>) e dos períodos de cultivo (30, 60, 90 ou 120 dias) empregados no experimento anterior (de crescimento mínimo).

Ao final dos 120 dias de cultivo do experimento de crescimento mínimo, foram retiradas as folhas e as raízes das culturas in vitro de cada tratamento, sendo assim obtidos os explantes (segmentos nodais), com

aproximadamente 7 mm, para o ensaio de retomada do crescimento, os quais foram inoculados em meio MS sem adição de sorbitol. Ao meio nutritivo foram acrescentados 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar. Posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 min a 121 °C e 1 atm de pressão.

#### *Análises estatísticas*

Nas análises estatísticas empregou-se o pacote estatístico Sisvar (sistema para análise de variância) para Windows® versão 5.1 (Ferreira, 2014). A normalidade dos erros foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett e, quando necessário, as médias foram transformadas pela função  $\sqrt{x+0,5}$ , sendo x o valor observado. Na sequência, os dados foram submetidos à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro para comparação das médias. A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (equação 1), conforme indicado por Pimentel-Gomes (2009).

$$IV = \frac{CV}{\sqrt{N}} \quad (1)$$

Em que: IV = índice de variação; CV = coeficiente de variação e N = número de repetições.

## **Resultados**

#### *Crescimento mínimo*

Foi observado efeito significativo do sorbitol (p = 0,0041; p = 0,0018, respectivamente) para as variáveis sobrevivência (IV = 4,3) e estabelecimento (IV = 4,3), mas não do período de cultivo (p = 0,3929; p = 0,5010, respectivamente) e nem da interação entre os fatores principais (p = 0,3929; p = 0,5010, respectivamente). Observou-se que a presença de sorbitol no meio nutritivo afetou significativamente a sobrevivência e o estabelecimento das brotações (Tabela 1).

O efeito do sorbitol foi significativo para as variáveis raiz primária (IV = 5,7) e raiz secundária (IV = 5,4) (p = 0,0001; p = 0,0018, respectivamente), e para período

( $p = 0,0339$ ;  $p = 0,0000$ , respectivamente), mas não para interação entre os dois fatores ( $p = 0,9835$ ;  $p = 0,7869$ , respectivamente). Para o fator principal sorbitol, observou-se um desempenho semelhante àquele obtido para a sobrevivência e estabelecimento, em que há uma redução nas médias de formação de raízes primárias na presença do carboidrato (Tabela 1).

Considerando o período de cultivo (Tabela 2), verificou-se aos 30 dias uma média de 47,6% de formação de raízes primárias (Tabela 1), a qual a partir dos 60 dias aumentou (74,9%) e se manteve constante a partir desse período (Tabela 2). No entanto, a presença de sorbitol reduziu em cerca de 30% as médias de raízes secundárias (Tabela 1). No que diz respeito ao período de cultivo, a partir dos 60 dias as médias que sofreram um aumento inicial, estabilizaram-se, semelhante ao que foi observado para raízes primárias.

Para a variável número de folhas (IV = 10,4), houve efeito significativo do sorbitol ( $p = 0,0008$ ) e do período de cultivo ( $p = 0,0003$ ), mas não da interação entre os fatores ( $p = 0,3466$ ). Houve redução das médias do número de folhas na presença do regulador sorbitol (Tabela 1). Em relação ao período de cultivo, observou-se o mesmo desempenho já relatado para raízes primárias e secundárias, com aumento aos 60 dias e estabilização nas médias a partir desse período. Por outro lado, no que tange ao número de brotos (IV=7,8), não houve efeito significativo do sorbitol ( $p = 0,1497$ ), e da interação entre o sorbitol e o período ( $p = 0,2725$ ). Para o período, houve efeito significativo ( $p = 0,0072$ ) e observou-se o mesmo desempenho registrado em relação às variáveis raízes primárias e secundárias e número de folhas (Tabela 2).

**Tabela 1.** Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de folhas, formação de raízes primárias (%) e raízes secundárias (%) em brotações de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) em função da presença de sorbitol (0 ou 10 g L<sup>-1</sup>), independentemente do período de cultivo in vitro (30, 60, 90 ou 120 dias).

**Table 1.** Average of survival (%), establishment (%), number of leaves, primary (%) and secondary roots formation (%) in shoots of *Luehea divaricata* depending on the presence of sorbitol (0 or 10 g L<sup>-1</sup>), regardless of the in vitro culture period (30, 60, 90 or 120 days).

Sorbitol (g L <sup>-1</sup> )	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Número de folhas	Raízes primárias (%)	Raízes secundárias (%)
0	100,0 a	100,0 a	23,0 a	88,4 a	70,6 a
10	79,1 b	77,0 b	16,1 b	51,9 b	45,7 b
Média	89,6	88,5	19,6	70,2	58,2
Índice de variação	4,3	4,3	10,4	5,7	5,4

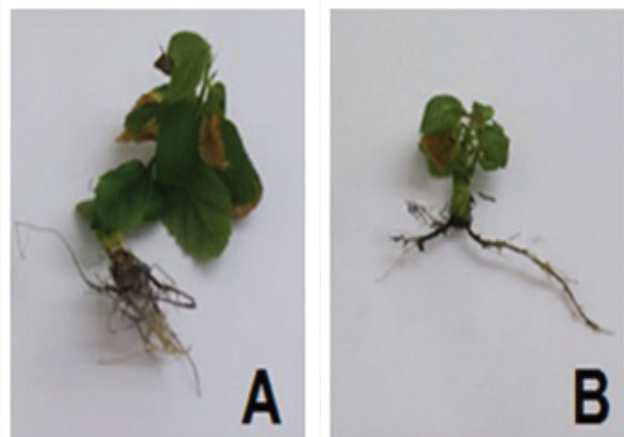
Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente pelo teste F ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Médias de formação de raízes primárias (%), raízes secundárias (%), número de folhas e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) em função do período de cultivo in vitro (30, 60, 90 ou 120 dias), independente da presença de sorbitol (0 ou 10 g L<sup>-1</sup>).

**Table 2.** Average formation of primary (%) and secondary roots (%) and number of leaves and number of shoots in shoots of *Luehea divaricata* depending on the in vitro culture period (30, 60, 90 or 120 days), regardless of the presence of sorbitol (0 or 10 g L<sup>-1</sup>).

Período (dias)	Raízes primárias (%)	Raízes secundárias (%)	Número de folhas	Número de brotos
30	47,6 b	10,3 b	11,9 b	1,1 b
60	74,9 a	66,4 a	19,9 a	1,9 a
90	79,1 a	76,9 a	22,8 a	2,4 a
120	79,1 a	79,1 a	23,6 a	2,5 a
Média	70,2	58,2	19,5	1,9
Índice de variação	5,7	5,4	10,4	7,8

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).



Fotos: Karol Buuron da Silva.

**Figura 1.** Brotações de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) após 120 dias de cultivo in vitro em meio nutritivo MS/2, em função da ausência (A) ou presença (B) de 10 g L<sup>-1</sup> de sorbitol.

**Figure 1.** Shoots of *Luehea divaricata* after 120 days of in vitro culture in nutritive medium MS/2 after 120 days, depending of absence (A) or presence (B) of 10 g L<sup>-1</sup> sorbitol.

#### Retomada de crescimento

Para a variável sobrevivência (IV=5,9) e estabelecimento (IV= 5,9), houve efeito significativo do sorbitol na retomada de crescimento ( $p = 0,0000$ ;  $p = 0,0000$ , respectivamente) (Tabela 3) e do período ( $p = 0,0002$ ;  $p = 0,0012$ , respectivamente) (Tabela 4), mas não da interação entre os dois fatores principais ( $p = 0,4171$ ;  $p = 0,4157$ , respectivamente).

As médias de sobrevivência e estabelecimento ficaram em torno de 40%, uma redução de aproximadamente 50%, quando comparadas às médias na ausência do carboidrato no meio nutritivo (Tabela 3). Em relação ao período, a sobrevivência e o estabelecimento se mantiveram estáveis até 90 dias, ocorrendo uma redução aos 120 dias.

Em relação às raízes primárias (IV = 7,3) e secundárias (IV=6,1), não foi observado efeito significativo do sorbitol ( $p = 0,6805$ ;  $p = 0,394,1$  respectivamente) (Tabela 3), dos períodos de cultivo ( $p = 0,8533$ ;  $p = 0,6322$ , respectivamente) e da interação entre os fatores principais ( $p = 0,8533$ ;  $p = 0,6322$ , respectivamente), com médias baixas de formação de raízes primárias (19,1%) e secundárias (10,8%).

**Tabela 3.** Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de folhas e de brotos em brotações de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) em função da presença de sorbitol (0 ou 10 g L<sup>-1</sup>), independente do período de cultivo in vitro (30, 60, 90 ou 120 dias) na etapa de retomada de crescimento.

**Table 3.** Average of survival (%), establishment (%), number of leaves and of shoots in shoots of *Luehea divaricata* depending on the presence of sorbitol (0 or 10 g L<sup>-1</sup>), regardless of the in vitro culture period (30, 60, 90 or 120 days) in the resumed growth stage.

Sorbitol (g L <sup>-1</sup> )	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Número de folhas	Número de brotos
0	79,0 a	77,9 a	12,2 a	1,4 a
10	41,5 b	38,3 b	5,0 b	0,7 b
Média	60,2	58,1	8,6	1,1
Índice de variação	5,9	5,9	12,6	9,9

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 4.** Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%) e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) em função período de cultivo in vitro (30, 60, 90 ou 120 dias), independente da presença de sorbitol (0 ou 10 g L<sup>-1</sup>) na etapa de retomada de crescimento.

**Table 4.** Average of survival (%), establishment (%) and number of shoots in shoots of *Luehea divaricata* depending on the in vitro culture period (30, 60, 90 or 120 days), regardless of the presence of sorbitol (0 or 10 g L<sup>-1</sup>) in the resumed growth stage.

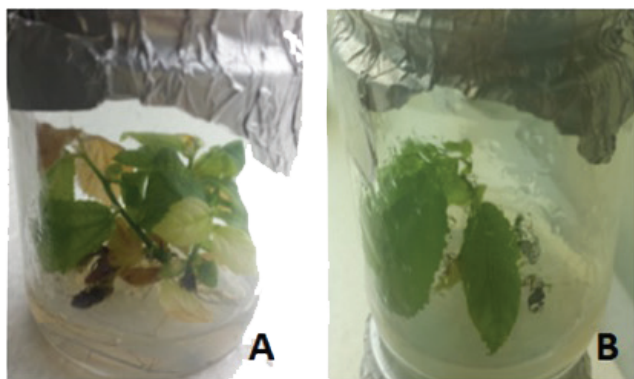
Período (dias)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Número de brotos
30	83,2 a	74,8 a	2,1 a
60	68,5 a	68,5 a	1,5 a
90	60,2 a	60,2 a	0,6 b
120	29,1 b	29,1 b	0,1 b
Média	60,2	58,1	1,1
Índice de variação	5,9	5,9	9,9

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

Foi observado efeito significativo do sorbitol ( $p = 0,0000$ ) no número de folhas (IV = 12,6), apenas na retomada de crescimento (Tabela 3), mas não do período de cultivo ( $p = 0,8704$ ) ou interação entre os dois fatores ( $p = 0,3930$ ). A presença do sorbitol no meio nutritivo durante o crescimento mínimo influenciou nesta etapa

de retomada de crescimento, e as médias reduziram-se em torno de 60%, quando comparadas à ausência do regulador no meio nutritivo.

Para a variável número de brotos (IV = 9,9), houve efeito significativo do sorbitol ( $p = 0,0010$ ) (Tabela 3) e do período de cultivo ( $p = 0,0000$ ) (Tabela 4), mas não da interação entre os dois fatores principais ( $p = 0,3987$ ). Novamente, a presença de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sorbitol reduziu as médias de número de brotos nesta etapa de retomada de crescimento. Para o período de cultivo, até aos 60 dias a formação de novos brotos apresentou bons resultados, decaindo significativamente após 90 dias.



Fotos: Karol Buuron da Silva.

**Figura 2.** Brotações de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) em meio nutritivo MS/2 após 120 dias de cultivo in vitro na retomada de crescimento, em função dos tratamentos na ausência (A) ou presença (B) de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sorbitol durante o crescimento mínimo.

**Figure 2.** Shoots of *Luehea divaricata* in nutritive medium MS/2 after 120 days of in vitro culture in the resumed growth stage, depending of absence (A) or presence (B) of  $10 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol during the minimum growth.

## Discussão

### Crescimento mínimo

Na presença de sorbitol observou-se redução nas médias de sobrevivência, estabelecimento, número de folhas, raízes primárias e secundárias (Tabela 1), resposta que é considerada positiva, uma vez que para fins de conservação in vitro o objetivo principal é reduzir ao máximo a formação de novos órgãos no material sujeito ao processo, procurando aumentar o intervalo entre os subcultivos (Olorode, 2004).

A redução da sobrevivência das brotações na presença do regulador, provavelmente, decorreu da remoção do excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, o que também acarretou crescimento mais lento (Dumet et al., 1993), reduzindo, simultaneamente, o seu subsequente estabelecimento e formação de folhas. Contudo, há que se destacar que, mesmo assim, a média de sobrevivência observada é adequada para a conservação de germoplasma in vitro, o que se constitui em uma característica importante a ser considerada no desenvolvimento de um eventual protocolo de crescimento mínimo para *Luehea divaricata*, visando uma subsequente retomada de crescimento, conforme apontaram Lima-Brito et al. (2011).

Apesar da redução significativa (em torno de 30%) nas médias de folhas na presença de sorbitol, seu efeito parece ter sido menor que aquele observado em brotações de *Passiflora giberti* (maracujá-do-mato), nas quais foram obtidas apenas 2,31 unidades (Faria et al., 2006), na presença de  $10 \text{ g L}^{-1}$  do regulador. Esses resultados salientam a importância do estudo de crescimento mínimo para cada espécie, sendo que, em alguns casos, até mesmo cada genótipo pode responder de maneira distinta.

A presença de sorbitol promoveu uma redução proporcionalmente maior nas médias de formação de raízes primárias e secundárias (Tabela 1), comparadas às variáveis sobrevivência e estabelecimento. Provavelmente, o processo de rediferenciação dos explantes iniciais em tecidos radiculares foi prejudicado pela remoção do excesso de água e nutrientes dos tecidos promovido pelo regulador, o que reduziu o número de elementos disponíveis para o seu desenvolvimento e, conseqüentemente, causou este retardo no crescimento (Wilches et al., 2013).

Por outro lado, quando se considerou o período de cultivo, observou-se redução aos 30 dias nas médias de formação de raízes primárias e secundárias, número de folhas e número de brotos, seguida de aumento e estabilização nas médias dessas variáveis (Tabela 2). Apesar da rizogênese ter alcançado valores em torno de 70%, a presença do regulador osmótico limitou a iniciação e o desenvolvimento radicular, considerando que é possível obter médias de cerca de 90% de rizogênese in vitro aos 60 dias de cultivo em brotações de *Luehea divaricata* na ausência de sorbitol (dados não publicados).

Igualmente, para as variáveis número de folhas e número de brotos, entre 60 e 120 dias, as médias se estabilizaram em torno de 20 e 2 respectivamente (Tabela 2), o que demonstra que nesse período os explantes cultivados em condições de crescimento mínimo tiveram seu desenvolvimento limitado, mas permaneceram vivos, o que possibilitaria posterior retomada de crescimento. Faria et al. (2006), em trabalho realizado com brotações de *P. giberti* em que foi testado o efeito do sorbitol na conservação in vitro, observaram a formação de folhas aos 120 dias bem inferior (apenas 3,2) à observada no presente trabalho, ratificando que as respostas podem variar em função da espécie.

Os resultados relatados demonstram que a presença do sorbitol a 10 g L<sup>-1</sup> propiciou uma redução no desenvolvimento das plantas, podendo-se realizar sua conservação in vitro por um período de 120 dias (Figura 1). Esse protocolo de crescimento mínimo possibilitou a redução do metabolismo das plantas, aumentando os intervalos de subcultivos, aparentemente sem afetar a sua viabilidade, além de permitir redução nos custos com a manutenção do banco ativo de germoplasma e, simultaneamente, minimizar os riscos de contaminação e perdas de acessos (Lemos et al., 2002).

#### *Retomada de crescimento*

A presença de sorbitol na fase de retomada de crescimento promoveu uma redução significativa nas médias de sobrevivência e de estabelecimento (Tabela 3), conforme era esperado, uma vez que o regulador osmótico promoveu estresse que resultou na mortalidade de brotações, mas pode-se observar que praticamente todos os sobreviventes se estabeleceram. Após a retomada de crescimento, somente a partir dos 120 dias (Tabela 4) observou-se um decréscimo das médias em ambas as variáveis, decorrente, provavelmente, da depleção de nutrientes do meio nutritivo, que não foi renovado ao longo deste período de cultivo. Assim, a redução observada nas médias destas variáveis, provavelmente, não está relacionada ao efeito do regulador osmótico que foi aplicado na etapa de crescimento mínimo, e sim da ausência de nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas (Souza et al., 2009).

A diminuição da sobrevivência e estabelecimento após esse longo período pode ser considerado normal, uma vez que as brotações já vieram de uma etapa de crescimento mínimo (120 dias), que contabilizada à etapa

de retomada de crescimento, somam 240 dias de cultivo in vitro, em que houve apenas uma transferência para meio nutritivo fresco. Além disso, pelo fato das plantas permanecerem no mesmo meio de cultivo por 120 dias, o acúmulo de gases no interior dos frascos, como o etileno, pode ter ocasionado danos às plantas, e em alguns casos esse acúmulo pode dificultar ou impossibilitar que plantas normais sejam regeneradas na retomada de crescimento (Barrueto Cid, 2010), fato que pode ter ocorrido no presente ensaio. O etileno, mesmo em pequenas concentrações, pode ser fisiologicamente ativo e desencadear vários processos, afetando a diferenciação, desenvolvimento, morfologia e crescimento, diminuindo a expansão foliar e o comprimento dos brotos e inibindo a regeneração de novos brotos (Erig & Schuch, 2005).

Existem poucos trabalhos na literatura sobre o comportamento das plantas na etapa de retomada de crescimento após submetidas à conservação in vitro via crescimento mínimo. Dentre estes, destacamos o estudo de conservação in vitro de segmentos nodais de *Hancornia speciosa* (mangabeira), desenvolvido por Santos et al. (2011). Estes autores relataram que os explantes mantidos na ausência de sacarose ou na presença de 10 g L<sup>-1</sup> de sorbitol durante o crescimento mínimo apresentaram maior viabilidade na retomada de crescimento até aos 60 dias de cultivo, semelhante ao que ocorreu no presente trabalho na etapa de retomada de crescimento.

A presença do sorbitol também reduziu as médias do número de folhas e de brotos na retomada do crescimento (Tabela 3). Isso pode decorrer do fato de que algumas concentrações de reguladores osmóticos causam efeitos tóxicos às plantas, conforme relatado em *H. speciosa* (Sá et al., 2011; Santos et al., 2011). O sorbitol geralmente não é metabolizado por tecidos vegetais, visto que grande quantidade de espécies não possui uma via natural para a biossíntese de álcoois açúcares (Thorpe et al., 2008), e esse fato pode ter prejudicado a retomada do crescimento das plantas. Para o número de brotos, em particular, no que diz respeito ao período de cultivo (Tabela 4), observou-se que a redução na média foi mais precoce, ocorrendo 30 dias antes do que a observada no estabelecimento, talvez por necessitar de recursos que aos 90 dias de cultivo já não estavam mais disponíveis (Souza et al., 2009).

Em brotações de *Pfaffia tuberosa* (corango-de-batata), conservadas em meio MS na ausência de sacarose e com 10 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, o crescimento mínimo foi

satisfatório, e as plantas continuaram a se desenvolver até aos 120 dias, quando se reestabeleceram as condições normais de cultivo *in vitro* (Flores et al., 2013), ao contrário do presente trabalho, em que a retomada de crescimento foi limitada até, no máximo, 90 dias.

### Conclusões

A presença de sorbitol é importante para realizar a conservação *in vitro* de *Luehea divaricata* via crescimento mínimo, técnica que pode ser realizada por um período de até 120 dias. A subsequente retomada de crescimento das brotações conservadas na presença de sorbitol é limitada a 90 dias, necessitando de mais estudos para melhoria dos parâmetros avaliados.

Recomenda-se que os protocolos de conservação *in vitro* sejam avaliados e ajustados para cada espécie e genótipo, tanto durante a etapa de crescimento mínimo, como na subsequente retomada, visando a conservação da diversidade genética. Inobstante, os resultados obtidos no presente trabalho podem subsidiar estudos adicionais sobre o crescimento mínimo e a retomada de crescimento de *Luehea divaricata*, bem como de outras espécies florestais nativas.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – 88882.427782/2019-01) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 312499/2018-3).

### Referências

- Barrueto Cid, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.
- Costa, A. M. et al. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 628 p.
- Dumet, D. et al. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, n. 14, p. 243-250, 1993.
- Erig, A. C. & Schuch, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>.
- Faria, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452006000200025>.
- Flôres, A. V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011. <http://dx.doi.org/10.5902/198050982760>.
- Flores, R. et al. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013.
- Hwida, M. F. *In vitro* conservation of *Populus alba* and *Melaleuca ercifolia* germplasm. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 3, p. 1373-1382, 2012.
- Lemos, E. E. P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002001000002>.
- Lima-Brito, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000800010>.
- Matsumoto, K. et al. **Manual de curadores de germoplasma vegetal: conservação *in vitro***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 12 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 318). <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149791/1/doc318.pdf>.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Nunes, E. D. C. et al. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, n. 12, p. 837-848, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1022492226341>.
- Olorode, O. Conservation of plant genetic resources. **African Journal Traditional Complementary and Alternative medicines**, n. 1, p. 4-14, 2004.
- Pimentel-Gomes, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Livraria Nobel, 2009. 451 p.
- Sá, A. de J. et al. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000100010>.
- Santos, M. C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902011000300020>.
- Silva, J. G. & Perelló, L. F. C. Conservação de espécies ameaçadas do Rio Grande do Sul através de seu uso no paisagismo. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 5, n. 4, p. 1-21, 2010. <http://dx.doi.org/10.5380/revsbau.v5i4.66314>.
- Silva, K. B. et al. Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, p. 1282-1295, 2019. <https://doi.org/10.5902/1980509826045>.
- Souza, A. S. et al. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 24 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular técnica, 90).
- Stehmann, J. R. et al. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 516 p.



Thorpe, T. et al. The components of plant culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George, E. F. et al. (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. New York: Springer, 2008. v. 1, p. 115-173.

Wilches, O. E. C. et al. Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservacion *in vitro* de Dioscorea alata, d. bulbifera, d. rotundata y d. trifida por el método de crecimiento mínimo. **Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas**, v. 25, p. 41-51, 2013.

Withers, L. A. & Williams, J. T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: Torres, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. p. 297-330.