



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

ANDRÉIA LUCIANA MARTINS SALDANHA

PROTOCOLO PARA A PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CEDRO (*Cedrela odorata* L.)

TESE
034.99757
S102

Belém
2010



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

ANDRÉIA LUCIANA MARTINS SALDANHA

PROTOCOLO PARA A PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CEDRO (*Cedrela odorata* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, para a obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof.º Vicente Savonitti Miranda

Belém
2010



Saldanha, Andréia Luciana Martins

Protocolo para a propagaao *in vitro* de cedro (*Cedrela odorata* L.) / Andréia Luciana Martins Saldanha. – Belém, 2010.

56 f.:il.

Dissertaao (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

1. Cedro – planta - crescimento *in vitro* 2. Micropropagaao 3. Citocininas 4. Auxinas I. Título.

CDD – 634.9757



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

ANDRÉIA LUCIANA MARTINS SALDANHA

PROTOCOLO PARA A PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CEDRO (*Cedrela odorata* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia,
como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia,
para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof.º Vicente Savonitti Miranda

Aprovada em 19 de abril de 2010

BANCA EXAMINADORA

Vicente S. Savonitti

Biólogo, DSc., Prof.º Vicente Savonitti Miranda
Presidente/Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Orígenes
Eng.º Agr. DSc. Oriel Filgueira de Lemos
1º Examinador
Embrapa Amazônia Oriental

Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro

Eng.ª Ftal. DSc. Iracema M.ª C.C. Cordeiro
2º Examinador
Tramontina Belém S/A

Roberto Cezar Lobo da Costa
Biólogo, DSc., Roberto Cezar Lobo da Costa
3º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Dedico este trabalho aos meus pais, Emílio e Sandra Saldanha por todo ensinamento, compreensão, força e motivação e pelo orgulho que me fazem sentir de suas trajetórias. E ao meu grande amigo e anjo da guarda Marlenilson Miranda por todo incentivo e carinho recebido.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado que tornou possível o desenvolvimento e a realização dessa pesquisa.

A meus pais por todo amor e dedicação.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), especialmente ao Curso de Mestrado em Agronomia, pela oportunidade de realização do curso.

À Embrapa Amazônia Oriental, pela disponibilização do laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos.

A Gracy Monteiro, secretária do curso de Mestrado em Agronomia, por toda paciência.

A todo corpo docente da graduação e pós-graduação pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof^o Vicente Savonitti Miranda pela orientação e amizade.

À banca examinadora pela disposição e boa vontade em contribuir com seus conhecimentos.

Ao Senhor Paulo Guaraná do horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, pela amizade e assistência na condução dos experimentos.

À laboratorista Lísia Aline pela amizade e pela prontidão em ajudar.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade e companheirismo, principalmente à Patrícia e ao Daniel, que nunca negaram ajuda quando precisei.

A minha irmã Daniela e a todos os meus familiares, pela torcida e energia positiva.

Ao meu querido e eterno amigo Marlenilson Miranda por todo carinho e incentivo e por ter estado ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial ao Dr. Osmar Alves Lameira, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, pela confiança e empenho para que meu trabalho se desenvolvesse.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, todo o meu amor e gratidão.

MUITO OBRIGADA!

**“Sou um só,mas ainda assim sou um.
Não posso fazer tudo, mas posso fazer alguma coisa.
E, por não poder fazer tudo,
Não me recusarei a fazer o pouco que posso.”**

Edward Everett Hale

**“O que eu faço, é uma gota no meio do oceano.
Mas sem ela, o oceano será menor.”**

Madre Tereza de Calcutá

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | RESUMO..... | 10 |
| | ABSTRACT..... | 11 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 | FAMÍLIA MELIACEAE..... | 16 |
| 2.2 | CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA..... | 16 |
| 2.3 | CULTURA DE TECIDOS..... | 19 |
| 2.4 | MEIO DE CULTURA E FITORREGULADORES..... | 21 |
| 2.5 | DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL..... | 24 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1 | LOCAL DO ESTUDO..... | 26 |
| 3.2 | MEIO DE CULTURA E CONDIÇÃO DE CULTIVO..... | 26 |
| 3.3 | MATERIAL VEGETAL..... | 26 |
| 3.4 | EXPERIMENTO 1 - ASSEPSIA E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES..... | 27 |
| 3.5 | EXPERIMENTO 2 - INDUÇÃO DAS BROTAÇÕES..... | 27 |
| 3.5.1 | Teste 1-Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotos em segmentos nodais e apicais..... | 28 |
| 3.5.2 | Teste 2-Efeito das concentrações de sacarose na formação de brotos e segmentos caulinares..... | 28 |
| 3.6 | EXPERIMENTO 3 - ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES..... | 29 |
| 3.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 29 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 30 |
| 4.1 | ASSEPSIA E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES..... | 30 |
| 4.2 | EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NA INDUÇÃO DE BROTOS EM SEGMENTOS NODAIS E APICAIS..... | 34 |
| 4.3 | EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA FORMAÇÃO DE BROTOS EM SEGMENTOS CAULINARES..... | 39 |
| 4.4 | ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES..... | 42 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| CONCLUSÕES..... | 46 |
| REFERÊNCIAS..... | 47 |
| ANEXOS..... | 56 |

RESUMO

A família Meliaceae destaca-se por seu valor econômico, medicinal, ecológico e de suas potencialidades de exploração biotecnológica. O presente trabalho teve como objetivo obter um protocolo de obtenção de plantas de cedro (*Cedrela odorata* L.) a partir de explantes excisados de plântulas assépticas germinadas *in vitro*, cultivados em meio básico de cultura MS suplementado com reguladores de crescimento e adição de sacarose. Para a desinfestação das sementes foram testadas imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0; 1,0; 1,5 e 2,0% por 10, 15 e 20 minutos. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3 (3 concentrações e 3 tempos de imersão) com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, totalizando 200 tubos no experimento. Foi avaliada a percentagem de contaminação por fungos e bactérias aos 7 dias e 15 dias. Para a indução de brotações, o estudo foi dividido em dois testes. No Teste 1 foi utilizado segmento nodal e apical em diferentes concentrações de BAP: 0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (5 concentrações e 2 tipos de explantes), com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, totalizando 200 tubos no experimento. Foram realizadas avaliações em intervalos de 15 dias quanto ao número e comprimento das brotações por tratamento. No teste 2 foi utilizado segmentos caulinares utilizando 0, 10, 20 e 30 g.L⁻¹ de sacarose. O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, totalizando 80 tubos no experimento. Foram realizadas avaliações em intervalos de 15 dias quanto ao número e comprimento das brotações por tratamento. Para o enraizamento *in vitro* foi utilizado brotos do teste de indução de brotação utilizando 0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹ de ANA. O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, totalizando 100 tubos no experimento. Foram realizadas avaliações em intervalos de 15 dias quanto ao número e comprimento das raízes por tratamento. Os dados obtidos, nos diferentes experimentos, foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados demonstraram que uso de hipoclorito de sódio a 2,0% por 15 minutos na desinfestação das sementes apresentou a menor percentagem de contaminação (10%). A indução de brotações foi possível utilizando 1 mg. L⁻¹ de BAP promovendo o maior número (1,45 brotos/explante) e comprimento (1,96 cm/explante) de brotos em segmentos apicais e 2 g.L⁻¹ de sacarose na indução de brotos em segmentos caulinares com número de 2,05 brotos/explante e comprimento de 1 cm brotos/explante. O enraizamento foi possível com a utilização de 1 mg. L⁻¹ de ANA com maior número (2,5 raízes/brotos) e comprimento de raízes (3,4 cm/brotos) para a obtenção de planta completa. Sementes são desinfestadas com sucesso em solução de hipoclorito de sódio a 2,0 %, indução de brotos em meio MS suplementado com 1 mg. L⁻¹ de BAP e sacarose a 2,0% que enraízam a 1 mg.L⁻¹ de ANA.

Palavras chave: Crescimento *in vitro*, micropropagação, citocininas, auxinas.

ABSTRACT

The family Meliaceae stands out for its economic value, medicinal, ecological and its potential for biotechnological exploitation. This study aimed to define a protocol for obtaining of plants of cedar (*Cedrela odorata* L.) from explants excised of aseptic seedlings germinated *in vitro* and cultured in basic MS media supplemented with growth regulators and the addition of sucrose. For seed disinfestation were tested immersion in a solution of sodium hypochlorite at 0; 1,0; 1,5 and 2,0%, for 10, 15 and 20 minutes. The design was completely randomized in a 3x3 factorial (three concentrations and three immersion times) with four replications, with 5 tubes in each repetition, totaling 200 tubes in the experiment. It was evaluated the percentage of contamination by fungi and bacteria at seven days and 15 days. To the induction of shoots, the study was divided into two tests. Test 1 was used nodal segments and apical in different concentrations of BAP: 0; 1,0; 2,0; 3,0 and 4,0 mg.L⁻¹. The design was completely randomized in a 5x2 factorial design (five concentrations and two types of explants), with four replicates with five tubes in each repetition, totaling 200 tubes in the experiment. It was Evaluations were made at intervals of 15 days on the number and length of shoots by treatment. In the second test was used stem segments using 0, 10, 20 and 30 g.L⁻¹ of sucrose. The design was completely randomized with four replications, with 5 tubes in each repetition, totaling 80 tubes in the experiment. It was Evaluations were made at intervals of 15 days on the number and length of shoots by treatment. For the rooting of shoots *in vitro* test was used to 0; 1,0; 1,5; 2,0 and 2,5 mg.L⁻¹ ANA. The design was completely randomized with four replications, with 5 tubes in each repetition, totaling 100 tubes in the experiment. It was Evaluations were made at intervals of 15 days on the number and root length by treatment. The data obtained in different experiments, were subjected to analysis of variance and means compared by Tukey test at 5% probability. The results showed that use of sodium hypochlorite 2.0% for 15 minutes in the disinfestation of the seeds had the lowest percentage of contamination (10%). The induction of shoots was possible using 1 mg. L⁻¹ BAP promoting the highest number (1,45 shoots/explant) and length (1,96 cm/explant) of shoots in the segments apical and 2 g.L⁻¹ of sucrose in inducing shoots on stem segments with the number of 2,05 shoots/explant and length of 1 cm shoots/explant. The rooting was possible with the use of 1 mg. L⁻¹ of ANA with the highest number (2,5 roots/shoot) and root length (3,4 cm/shoot) to obtain complete plant. Seeds are disinfested with success in solution of sodium hypochlorite 2,0%, induction of shoots on MS medium supplemented with 1 mg. L⁻¹ BAP and sucrose at 2,0%, rooting at 1 mg. L⁻¹ of ANA.

Key words: *In vitro* growth, micropropagation, cytokinins, auxins.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Percentagem média de contaminação em sementes de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) aos 7 dias após a inoculação..... | 31 |
| Tabela 2 | Médias de sementes germinadas (%) cultivados <i>in vitro</i> submetidos a diferentes concentrações e tempos de imersão em NaOCl aos 15 dias após a inoculação..... | 33 |
| Tabela 3 | Resumo da análise da variação para o número e comprimento de raízes em função do efeito de concentrações de ANA..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | <i>Cedrela odorata</i> :: (A) árvore; (B) filotaxia e floração; (C) aspecto do fruto maduro; (D) sementes; (E) aspecto da casca do fuste; e (F) aspecto da madeira... | 18 |
| Figura 2 | Número médio de brotações em segmentos apicais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação..... | 35 |
| Figura 3 | Comprimento médio em cm de brotações em segmentos apicais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação..... | 35 |
| Figura 4 | Número médio de brotações em segmentos nodais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação..... | 37 |
| Figura 5 | Comprimento médio em cm de brotações em segmentos nodais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação..... | 37 |
| Figura 6 | Segmento apical com 1 mg. L ⁻¹ de BAP aos 60 dias..... | 38 |
| Figura 7 | Efeito de diferentes concentrações de sacarose (g.L ⁻¹) no número de brotações induzidas em meio MS aos 45 dias após a inoculação..... | 40 |
| Figura 8 | Efeito de diferentes concentrações de sacarose (g.L ⁻¹) no comprimento (cm) de brotações induzidas em meio MS aos 45 dias após a inoculação..... | 40 |
| Figura 9 | Valores médios do número de raiz em brotações submetidas a diferentes concentrações de ANA aos 45 dias após a inoculação..... | 43 |
| Figura 10 | Valores médios do comprimento (cm) de raiz em brotações submetidas a diferentes concentrações de ANA aos 45 dias após a inoculação..... | 44 |
| Figura 11 | Brotação de cedro submetida à concentração de 1 mg. L ⁻¹ de ANA aos 45 dias... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

A família Meliaceae se destaca por seu valor econômico, medicinal, ecológico e de suas potencialidades de exploração biotecnológica. Apresenta gêneros de grande importância como *Cedrela* (cedro), geralmente conhecidos pela excelente qualidade da madeira que produzem (KLEIN, 1984).

A finalidade comercial do cultivo do cedro está associada à sua madeira, que é amplamente empregada na confecção de compensados, obras de talha, esculturas, madeiras da construção civil, naval e aeronáutica, caixas para charutos, instrumentos musicais e muitas outras aplicações artísticas. A árvore apresenta qualidades ornamentais recomendadas para o paisagismo em geral, sendo também utilizada na recomposição de áreas degradadas (RIZZINI, 1971)

E segundo Carvalho (1998), existe um sério problema na cultura do cedro, tanto em viveiros como em plantios em escala menor, é o ataque às gemas apicais pela broca-do-cedro (*Hypsila grandella*), que leva ao desenvolvimento arbustiforme e, em casos extremos, a morte da planta. A espécie apresenta também um outro problema que está relacionado ao seu cultivo, observa-se uma acentuada variação quanto ao desenvolvimento das plantas, tanto em altura como em diâmetro.

Então a aplicação das técnicas de cultura de tecidos associadas à micropropagação relaciona-se principalmente com a obtenção de mudas uniformes, de elevada qualidade e livres de doenças, permitindo a multiplicação rápida e geneticamente confiável e a preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção.

A micropropagação permite um trabalho de forma contínua ao longo do ano, o que agiliza a propagação comparado com métodos convencionais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Portanto, o uso da cultura de tecidos para a multiplicação de genótipos superiores de cedro, possibilitaria auxiliar futuros programas de melhoramento da espécie e agilizaria a instalação de bosques comerciais homogêneos, com alta qualidade genética.

Assim, técnicas de propagação vegetativa *in vitro* tem possibilitado a reprodução de espécies lenhosas, com muitas vantagens em relação às técnicas *ex vitro*. Pois nos últimos 40 anos, as técnicas de cultura de tecidos *in vitro* constituíram num importante conjunto de tecnologias em todas as áreas da biologia vegetal, auxiliando na compreensão de seus processos

de desenvolvimento e para a utilização e conservação dos recursos genéticos vegetais (WITHERS ; WILLIAMS, 1998).

Sendo que atualmente, a ampliação imediata de investimentos em plantios comerciais se justifica pela demanda por produtos madeireiros de qualidade. O uso de espécies exóticas, de rápido crescimento, não atende à demanda por madeira nobre (CARVALHO, 2000), o que exige a instalação de bosques comerciais com espécies nativas, dependente da disponibilidade de mudas de alta qualidade genética e fisiológica (CARVALHO, 2003).

Na área florestal, a cultura de tecidos é uma tecnologia bastante recente, servindo como ferramenta básica aos programas de melhoramento de espécies comerciais exóticas, com a maximização ou manutenção do valor genético do clone a ser propagado.

As técnicas de micropropagação são ferramentas de grande importância e interesse, pois permitem obter um grande número de plantas em espaço e tempo reduzidos, com controle das contaminações, além de permitir que a produção seja planejada segundo a melhor época de demanda.

Em consequência da ênfase atual nos problemas ambientais, em especial a necessidade de recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem natural, tem crescido o número de trabalhos de micropropagação com espécies florestais nativas, a exemplo da *Cedrela fissilis* (NUNES et al., 2002; AMARAL, 2006), *Cedrela odorata* (LAMEIRA; GOMES; LOPES, 2000), *Swietenia macrophylla* (LOPES, 2000), *Acacia mearnsii* (COUTO et al., 2004), *Schizolobium amazonicum* (CORDEIRO et al., 2004).

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de obtenção de plantas de cedro (*Cedrela odorata* L.) utilizando explantes excisados de plântulas assépticas germinadas *in vitro*, utilizando reguladores de crescimento e sacarose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA MELIACEAE

O hábito da família constitui-se de árvores e arvoretas de 3 a 30 metros de altura. São encontradas em florestas estacionais decíduas e semidecíduas, apresentando ampla e expressiva distribuição. Ocorrem também na floresta ombrófila densa da encosta atlântica, mesmo em altitudes elevadas (KLEIN, 1984).

As características da família Meliaceae são as folhas alternas, compostas e sem estípulas. As flores são pequenas, cíclicas, diclamídeas, actinomorfas (JOLY, 1985), bissexuadas ou unissexuadas por aborto (PASTORE, 2003). As plantas podem ser andróginas, dióicas, monóicas ou polígamas e havendo pistilóides e estaminódios, estes são muito desenvolvidos, dificultando a distinção de uma flor hermafrodita das flores unissexuais.

O ovário é súpero, com um a oito lóculos e um ou dois óvulos superpostos em cada lóculo nas 5 plantas da subfamília Melioideae ou, três a muitos óvulos seriados na subfamília Swietenioideae (BARROSO, 1991).

Como exemplos brasileiros de Meliáceas destacam-se os gêneros *Cedrela*, o popular cedro, de excelente madeira avermelhada, *Carapa*, *Trichila* e a *Guarea*, todos com madeira de boa qualidade. O mogno (*Swietenia macrophylla* King), espécie desta mesma família, tem grande valor comercial (JOLY, 1985). Muitos estudos merecem destaque com espécies que apresentam efeito medicinal como *Azadirachta indica* A. Juss., conhecido como nim (ALIERO, 2003), dentre outras.

2.2 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O gênero *Cedrela* foi descrito pela primeira vez por Browne em 1756 (TUESTA, 2003). O cedro é uma árvore decidual de 25 a 35 metros de altura, que apresenta um tronco de 60 a 150

cm de DAP (diâmetro à altura do peito) com ramificação dicotômica ascendente, heliófila ou de luz difusa, seletiva higrófila, características das matas primárias e secundárias altas de terra firme. As folhas são longas, curvadas e decíduais, alternas compostas, pinadas e grandes (60 a 120 cm de comprimento por 20-30 cm de largura) (REITZ; KLEIN ; REIS, 1983), formando copa arredondada muito típica.

A inflorescência apresenta um tirso amplo com 25-30 cm de comprimento bastante denso e geralmente mais curto que as folhas, sendo que suas flores possuem 12 mm de comprimento. Floresce durante os meses de dezembro-fevereiro e os frutos amadurecem a partir de maio com a planta totalmente sem folhas. Os frutos constituem de uma cápsula deiscente de 2,0-3,5 cm de comprimento, com várias sementes por frutos (LORENZI, 2002).

Sua madeira varia do bege-rosado-escuro ao pardo-avermelhado, claro ou escuro, uniforme; superfície lustrosa, com reflexo dourado, e lisa; odor *sui generis*, aromático, às vezes muito fraco; sabor levemente amargo ou insípido. A coloração dos cedros varia bastante conforme a procedência; segue-se daí que as denominações cedro-rosa, cedro-vermelho e cedro-branco são aplicadas à mesma espécie em localidades diferentes, de acordo com a tonalidade do lenho. O odor é quase sempre perceptível. Destilada, cede óleo de cheiro desagradável. Alburno rosa-amarelado, delgado (RIZZINI, 1971).

A espécie *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), popularmente conhecida como cedro-vermelho, cedro cheiroso ou cedro-mogno, ocorre em todo o Brasil em todas as formações florestais, à exceção do Cerrado (Figura 1). É particularmente freqüente na Mata Atlântica e na floresta pluvial Amazônica. É também comum nas matas ciliares do Brasil e nos demais países da América do Sul. Sua madeira é uma das melhores do país, com ótima utilização para laminados, móveis, lambris, compensados e para tabuado em geral. É explorada comercialmente, por sua madeira possuir boa resistência mecânica e ser moderadamente resistente ao ataque de pragas; é considerada madeira nobre, o que a tornou ameaçada de extinção pela extração intensiva (LORENZI, 2002).

Há mais de 20 anos a família Meliaceae vem sendo bastante estudada como a mais promissora fonte de compostos com propriedades inseticidas (HAMMAD; NEMER ; KAWAR, 2000). Muitos gêneros desta família produzem vários compostos com ação medicinal e inseticida (LORENZI, 1998). As espécies desta família têm seu papel principalmente na medicina natural,

apresentando como propriedades terapêuticas: ação anti-viral, anti-helmíntica, anti-reumática, anti-inflamatória e anti-cancerígena (MARZALINA ; KRISHNAPILLAY, 1999).



Fonte: Lorenzi, 2002

Figura 1 - *Cedrela odorata*:: (A) árvore; (B) filotaxia e floração; (C) aspecto do fruto maduro; (D) sementes; (E) aspecto da casca do fuste; e (F) aspecto da madeira.

Segundo Carvalho (1998), na medicina popular, a casca do cedro é utilizada na forma de chá como tônica, adstringente e no combate à febre. Sua decocção é utilizada para lavar feridas e úlceras. A madeira do cedro, submetida à destilação, produz óleo essencial ao qual se atribui

poder repelente ao cupim. Porém, a presença deste óleo é pouco intensa, tanto na casca como no lenho. Haines (1994) reconhece a importância da família Meliaceae e alerta para a necessidade de estudos que visem a sua conservação, uma vez que muitas espécies estão sofrendo uma forte pressão ambiental com severa erosão genética.

2.3 CULTURA DE TECIDOS

Segundo Teixeira (2009), as espécies lenhosas de interesse agrícola são basicamente constituídas pelas espécies frutícolas, como maçã, pêra, pêssego, manga e citrus, espécies florestais, como eucalipto, coníferas, teca, mogno e cedro e espécies bioativas como espinheira-santa, jaborandi e nim. Também como lenhosas se enquadram café, cacau, chá mate, erva-mate, romã, além das espécies produtoras de amêndoas como a castanha-do-pará, o caju e a noz macadâmia. Do ponto de vista econômico e social, essas espécies lenhosas constituem um grupo de plantas extremamente importante.

Sendo assim, a cultura de tecidos é uma técnica com grande aplicação na agricultura na propagação de espécies florestais. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes (Que é um fragmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro*), são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico aquele do ancestral comum (TORRES et al., 2000).

Essa regeneração é fundamentada na capacidade de proliferação das células vegetais organizarem-se em tecido e, eventualmente, em plantas completas (KERBAUY, 1997). Essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulo apropriado, a potencialidade de iniciar um novo indivíduo multicelular (TORRES et al., 2000).

O fisiólogo Haberlandt, baseado nesse princípio, foi o pioneiro na tentativa de cultivar células de tecidos somáticos de diferentes plantas em solução nutritiva. Contudo, o referido pesquisador não alcançou sucesso em seus estudos pelo fato de não conhecer reguladores de crescimento, que ainda não haviam sido descobertos (SANTOS, 2003).

A teoria da totipotência formulada por Schleiden e Schwann, em 1838, um dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro*, afirma que toda célula contém o potencial necessário para originar uma planta completa sob condições de estímulo (CID, 2009).

E de acordo com Caldas; Haridasan e Elias (1998), na cultura de tecidos, existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo (qual espécie, cultivar ou variedade que está sendo utilizada), a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema, etc.) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura, vasilhame). Na realidade, muito ainda precisa ser conhecido sobre mecanismos de hormônios vegetais e sobre os processos que controlam o desenvolvimento das plantas. A melhor via para o desenvolvimento de sistemas de regeneração *in vitro* continua sendo aquela baseada em testes que incluem esses três fatores. O objetivo desses testes é obter uma combinação ótima dos fatores para que o processo seja bem-sucedido

Murashige (1974) propôs três diferentes estágios para o estabelecimento do cultivo *in vitro*: Estágio I: seleção de explantes, desinfestação e cultivo destes em meio nutritivo, sob condições assépticas. Nesta etapa apresenta uma grande dificuldade quanto à obtenção de explantes descontaminados sem conduzi-los à morte;

Estágio II: multiplicação dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos, em meios de cultura apropriados para a multiplicação. Embora o objetivo desta fase seja produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter uma taxa satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante. Outro aspecto essencial é a qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois isso vai determinar o sucesso na fase de enraizamento;

Estágio III: transferência das partes aéreas produzidas para o meio de cultura com reguladores de crescimento indutores de raízes e o posterior transplante das mudas produzidas para substrato ou solo.

A cultura de tecidos também pode ser empregada de diferentes maneiras dentro de um programa de melhoramento vegetal. Embora não estejam diretamente envolvidas no desenvolvimento de cultivares, muitas vezes, essas técnicas oferecem soluções exclusivas nas diferentes fases do processo. No melhoramento de espécies que apresentem problemas de dormência de sementes, pode-se utilizar a técnica de germinação *in vitro*. Em alguns casos, quando o desenvolvimento do fruto é um processo prolongado, pode-se utilizar a cultura de embriões imaturos, na germinação, para acelerá-la (ANDRADE, 2002).

2.4 MEIO DE CULTURA E FITORREGULADORES

As diferentes etapas da micropropagação requerem diferentes condições nutricionais e um adequado balanço hormonal. Os meios de cultura se baseiam nas exigências nutricionais das plantas, sendo adequados às necessidades de cada espécie e etapas *in vitro* (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Meios de cultura não-adequados podem causar sintomas de deficiência mineral e até a morte dos propágulos (MONTEIRO et al., 2000). A presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo é normalmente importante nas fases de multiplicação e enraizamento.

Basicamente, o meio de cultura fornece não só macro (N, P, Ca, K, Mg, S) e micronutrientes (Mn, Zn, B, Cu, Mo, Co, I, Si, Al, Ni, Fe), mas também carboidratos (normalmente a sacarose) como fonte de carbono que a planta fixa na atmosfera pela fotossíntese. Para proporcionar melhor desenvolvimento, normalmente incluem-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Como é importante que o meio seja o mesmo sempre que for preparado, componentes que podem variar em sua composição devem ser evitados, mesmo que proporcionem resultados positivos (PASQUAL ; HOFFMANN ; RAMOS, 1997).

O carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos. Para as plantas é necessária energia, esta pode ser oriunda da fotossíntese ou de outra fonte de carboidratos (CALVETE et al., 2002). Contudo, convém salientar que a concentração ótima de

sacarose para a indução de morfogênese ou crescimento difere entre os genótipos e, às vezes, entre genótipos muito próximos (GEORGE, 1993).

Dentre os meios mais empregados na cultura de tecidos vegetais estão o meio de cultura de Murashige e Skoog, (1962) MS. O meio MS é um meio universalmente usado especialmente para morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas. Este meio caracteriza-se pela sua elevada concentração em sais minerais. Diversos trabalhos foram então realizados de modo a aperfeiçoar o cultivo e atender necessidades específicas de diversos tipos de tecidos de espécies variadas.

A concentração de sais no meio de cultura pode ser adequada de acordo com cada espécie, podendo a redução da concentração iônica favorecer o processo de micropropagação (GUERRA ; NODARI, 2009). Pois, altas concentrações iônicas causadas pelo acúmulo de sais, diminuem o potencial hídrico do meio de cultura, resultando em uma menor disponibilidade de água para a planta. Contudo, a diluição excessiva pode levar à deficiência mineral na planta. Os micronutrientes, em virtude de sua baixa concentração original, na maioria dos trabalhos, não necessitam de diluição (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998)

Para a indução dos processos de desdiferenciação e rediferenciação responsáveis pela formação de tecidos e órgãos, além da escolha do explante mais adequado, se faz necessário o uso de fitorreguladores capazes de estimular a formação de parte aérea e raízes. A indução de brotos em explantes pode ser realizada por meio da aplicação de citocininas exógenas, promovendo o crescimento inicial das gemas axilares pela quebra da dominância apical (TAIZ ; ZEIGER, 2004).

Dessa forma, a adição de fitorreguladores ao meio supre prováveis deficiências das quantidades de fitohormônios nos explantes da planta mãe, induzindo os processos de desdiferenciação e rediferenciação, com conseqüente formação de tecidos e órgãos. Dentre os fitorreguladores utilizados na cultura de tecidos, as citocininas e auxinas possuem maior destaque, atuando na formação de raízes, parte aérea e calo (PASQUAL, 2001).

Os hormônios vegetais podem ser definidos como substâncias naturais (fitohormônios) ou sintéticas (fitorreguladores) que são adicionados ao meio de cultura, com a finalidade de induzir modificações nos padrões de crescimento e desenvolvimento do explante (TERMIGNONI, 2005).

As citocininas também estimulam a divisão celular (HARTMANN et al., 2002) e são fundamentais na etapa de regeneração de calos e na brotação de gemas axilares ou apicais na cultura de tecidos de plantas, entretanto, o enraizamento pode ser dificultado se estas permanecerem muito tempo em contato com o material regenerado, em decorrência de um possível efeito residual da citocinina (BARRUETO CID, 2000).

Dentre as citocininas, o 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido a mais utilizada na indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998). Alguns dados sugerem que essa citocinina é a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro*, mostrando-se muito eficiente na formação de brotos em explantes de diversas espécies lenhosas, a exemplo da *Swietenia macrophylla* (SCHOTTZ et al., 2007), *Cabralea canjerana* (ROCHA et al., 2007) e *Ficus carica* (FRÁGUAS ; PASQUAL ; PEREIRA, 2004).

De acordo com Hartmann et al. (2002), as auxinas são as substâncias mais importantes, que desempenham maiores funções no enraizamento de estacas. Dentre as principais funções biológicas das auxinas, pode-se citar o crescimento de órgãos, especialmente as raízes. A auxina de presença natural é sintetizada principalmente em gemas apicais e em folhas jovens e, de maneira geral, move-se através da planta, do ápice para a base.

As auxinas podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação, no meio de enraizamento, sendo que o ácido naftalenoacético (ANA) é uma das auxinas mais empregadas, em concentrações que variam conforme a espécie e/ou cultivar. As concentrações mais frequentes estão na faixa de 0,5 a 5,0 mg.L⁻¹ (GATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998).

Segundo George e Sherrington (1984), para evitar a inibição do enraizamento pela presença constante da auxina no meio, tem sido adotada a estratégia de manter os explantes por um período curto na presença desta substância. Em seguida, faz-se a inoculação em um novo meio sem regulador de crescimento.

A ação da auxina ocorre antes do primeiro evento de formação do primórdio radicular, ou seja, pouco antes da desdiferenciação e formação de um lócus meristemático, sugerindo que a função da auxina no enraizamento esteja associada somente à indução radicular e não ao posterior desenvolvimento (BLAKESLEY ; WESTON ; HALL, 1991).

2.5 DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O cultivo *in vitro* de plantas apresenta grande importância para a base de plantios nas áreas florestal e agrônômica, porém o sucesso dessa técnica está relacionado diretamente com a assepsia do explante. Para tanto, é essencial que o tecido que dará origem ao explante esteja livre de contaminantes, sendo necessária a realização de um tratamento de desinfestação deste tecido, a fim de eliminar microorganismos exógenos, para a obtenção de um bom resultado no final do processo de estabelecimento *in vitro*. (SILVA ; BLANK ; ANGELO, 2003).

Estas contaminações causadas por bactérias, fungos e insetos tornam-se sério problema devido à competição pelos nutrientes, liberação de toxinas, modificação do meio de cultura e predação, resultando na morte do tecido vegetal. É necessário remover as contaminações com desinfestantes antes do estabelecimento *in vitro* para que não haja perda de material, principalmente quando as contaminações não são detectadas precocemente. Após a escolha do melhor explante, este deve ser desinfetado superficialmente, porque os microorganismos que crescerem no meio de cultivo irão competir vantajosamente com o explante pelos nutrientes (SMITH, 2000).

A desinfestação do explante é uma etapa essencial na qual podem ser utilizadas diversas substâncias de ação germicida, dentre os quais os mais utilizados estão o etanol, o hipoclorito de sódio, além dos habituais detergentes de cozinha. O detergente deve ser adicionado em teor muito baixo, enquanto a concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição pode variar, de acordo com o objetivo do trabalho, o tamanho e a natureza do explante (WILLADINO ; CÂMARA, 2009).

Segundo Hirata e Mancini Filho (2002), o etanol além da ação germicida, tem ação surfactante e facilita a ação de outros produtos. É utilizado em concentrações em torno de 70 a 80%, pois concentrações maiores podem causar desidratação dos tecidos.

Dentre as várias substâncias germicidas à base de cloro utilizadas para desinfestação dos explantes, as mais comuns são o hipoclorito de sódio, encontrado em formulações comerciais de água sanitária, ou o hipoclorito de cálcio, encontrado na forma de pó em lojas de material para piscina (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998)

A super exposição do tecido aos agentes esterilizantes, geralmente, danifica o explante e leva à morte celular (SMITH, 2000). O autor recém citado salienta que não é exequível recomendar um procedimento padrão, sendo necessário investigar efetivamente os procedimentos de desinfestação para diferentes tipos de espécies e tecidos para que a instalação *in vitro* inicie com explantes saudáveis e o cultivo desenvolva-se com sucesso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental

3.2 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÃO DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado foi o MS (Anexo A). O pH foi ajustado em $5,8 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,5 N. Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio, lacrados com papel alumínio e esterilizados por autoclavagem durante 20 min. à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm. Os fitoreguladores foram adicionados ao meio antes da sua esterilização.

As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica. Os tubos foram colocados em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12 h.luz.dia⁻¹ com intensidade luminosa de 25µmol.m².s⁻¹ de irradiância e temperatura de 25±2°C pelo período de dois meses. Tempo necessário para os embriões lançarem as primeiras brotações.

3.3 MATERIAL VEGETAL

As sementes de cedro utilizadas neste experimento foram coletadas no campo experimental da Embrapa Amazônia Oriental em agosto de 2008 e levadas para o Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia dessa instituição de pesquisa.

As sementes foram acondicionadas em saco de papel Kraft e armazenadas em geladeira para não desidratarem e perderem seu poder germinativo. Após no máximo 3 dias todas as sementes foram retiradas da geladeira e utilizadas nos experimentos de desinfestação e posteriormente transferidas para meios de cultura visando a germinação *in vitro*.

3.4 EXPERIMENTO 1 - ASSEPSIA E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Para o estabelecimento *in vitro* da cultura, sementes passaram por testes de desinfestação utilizando como agentes desinfestantes hipoclorito de sódio (NaOCl). As sementes tiveram uma pré-desinfestação com várias lavagens em água corrente e detergente comercial. Em câmara de fluxo laminar os tratamentos de desinfestação consistiram em imersão em álcool 70% por 1 min, seguido em imersão em NaOCl, variando nas concentrações de 0; 1,0; 1,5 e 2,0% de cloro ativo e tempo de imersão a 10, 15 e 20 minutos, sendo posteriormente, submetidas a 3 enxágües em água destilada e autoclavada. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS com 3% de sacarose e solidificado a 0,7% de ágar, na quantidade de 10 mL por tubo.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial, 3x3 (3 concentrações de NaOCl e 3 tempos de imersão), com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, para cada tratamento, totalizando 200 tubos no experimento. A avaliação da percentagem de contaminação de fungos e bactérias e germinação das sementes se fez aos 7 e 15 dias após a inoculação.

3.5 EXPERIMENTO 2 – INDUÇÃO DAS BROTAÇÕES

Foram realizados os testes de multiplicação e de indução de crescimento de brotos por meio de segmentos apicais e nodais retirados de plantas assépticas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*.

3.5.1 Teste 1 - Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotos em segmentos nodais e apicais.

Neste experimento foram utilizadas plantas germinadas *in vitro*, com 60 dias de idade de onde foram retirados os segmentos caulinares nodais e apicais, com tamanho aproximado de 1 cm com uma gema axilar.

Os segmentos caulinares nodais e apicais foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS com 3% de sacarose e solidificado a 0,7% de ágar, na quantidade de 10 mL por tubo, onde foram testadas diferentes concentrações de BAP (0; 1; 2; 3 e 4 mg.L⁻¹)

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 5x2 (5 concentrações e 2 tipos de segmentos), com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, para cada tratamento, totalizando 200 tubos no experimento. Foram realizadas avaliações em intervalos de 15 dias, quanto ao número e o comprimento de brotações por tratamento.

3.5.2 Teste 2 - Efeito das concentrações de sacarose na formação de brotos em segmentos caulinares.

Em câmara de fluxo laminar, segmentos caulinares provenientes de plantas oriundas da germinação de sementes *in vitro*, após 60 dias de idade foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, solidificado com 0,7% de ágar, na quantidade de 10 mL por tubo, suplementado com vitaminas e com 1 mg. L⁻¹ de BAP. O meio de cultura foi complementado com diferentes concentrações de sacarose (0; 1,0; 2,0 e 3,0 g.L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, para cada tratamento, totalizando 80 tubos no experimento. Foram realizadas avaliações em intervalos de 15 dias, quanto ao número e o comprimento de brotações por tratamento.

3.6 EXPERIMENTO 3 – ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES

Para o enraizamento das brotações foi utilizado, em câmara de fluxo laminar, os brotos de cedro com aproximadamente 1,5 cm, com 45 dias induzidos na fase anterior na multiplicação com BAP, foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, solidificado com 0,7% de ágar, na quantidade de 10 mL por tubo, suplementado com vitaminas e 2% de sacarose. O meio de cultura foi complementado com diferentes concentrações de ANA (ácido naftalenoacético), 0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹. Após 8 dias os explantes foram transferidos para novos meios contendo metade da concentração de sais MS sem a adição da auxina.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições, com 5 tubos em cada repetição, para cada tratamento, totalizando 100 tubos no experimento. Foram feitas avaliações em intervalo de 15 dias, quanto ao número e o comprimento de raízes por tratamento.

Posteriormente as plantas formadas irão para a fase de aclimação e em seguida levadas para campo.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos das variáveis observadas, nos diferentes experimentos foram submetidos à análise de variância com o auxílio do programa estatístico SISVAR 4.3 (FERREIRA, 1999). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ASSEPSIA E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Em todos os tratamentos, a germinação das sementes teve início entre 7 e 9 dias após a inoculação, com o rompimento do tegumento das sementes e a emissão da radícula. Para a porcentagem de sementes desinfestadas, os resultados da análise de variância demonstraram que, aos 7 dias de avaliação, houve interação entre os fatores concentração de hipoclorito de sódio e tempo de imersão. Aos 7 dias da inoculação a menor porcentagem de sementes contaminadas (10%) ocorreu nos tratamentos com 2,0% de hipoclorito de sódio por 15 e 20 min. (Tabela 1), Resultado semelhante foi encontrado em *Cedrela fisillis*, onde tratamento de desinfestação de sementes contendo 2% de NaOCl durante imersão de 10 minutos, apresentou taxa de contaminação 7% e 80 % de sementes germinadas (AMARAL, 2006).

Contudo, foi verificado que a exposição das sementes com 2,0% de NaOCl por 20 minutos induziu maior taxa de oxidação nas mesmas logo nos primeiros 10 dias, promovendo o aparecimento de partes escuras tanto nas sementes, quanto no meio, devido ao tempo elevado de exposição ao desinfestante, causando a morte da maioria das sementes.

No tratamento sem uso do NaOCl, em que as sementes apenas foram lavadas com detergente e água destilada, houve 100% de contaminação, indicando com isso, a necessidade do uso de NaOCl na desinfestação das fontes de explantes. Resultado semelhante foi encontrado por Couto et al. (2004) na desinfestação de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*), sendo observado 11% de sementes assépticas quando não tratadas com hipoclorito de sódio. A segunda maior taxa de contaminação foi observado nas sementes tratadas com NaOCl a 1% por 10 e 15 minutos com uma taxa de contaminação de 76%.

No presente estudo, foi verificado que com o aumento da concentração e tempo de exposição ao NaOCl, foi diminuindo o número de sementes contaminadas e que a contaminação presente nas sementes se deu principalmente pela manifestação de fungos, que se disseminou das sementes para o meio nutritivo, dificultando o processo de germinação.

Tabela 1 - Percentagem média de contaminação em sementes de cedro (*Cedrela odorata* L.) aos 7 dias após a inoculação

| Concentração de NaOCl (%) | Tempo de imersão (em minutos) | Contaminação (%) |
|------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| 0 Testemunha | 0 | 100 a |
| 1,0 | 10 | 76 b |
| 1,0 | 15 | 76 b |
| 1,0 | 20 | 70 c |
| 1,5 | 10 | 55 d |
| 1,5 | 15 | 50 e |
| 1,5 | 20 | 46 f |
| 2,0 | 10 | 15 g |
| 2,0 | 15 | 10 h |
| 2,0 | 20 | 10 h |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Organismos eucarióticos, como fungos e leveduras, geralmente apresentam crescimento visível nos meios nutritivos porque, em geral, a composição desses meios contempla todos os nutrientes essenciais ao crescimento de tais microrganismos (LEIFERT ; CASSELLS, 2001). Assim, fungos filamentosos e leveduras raramente permanecem ocultos no cultivo *in vitro* de plantas. Por isso, a maioria das contaminações microbianas que surge logo após a inoculação dos explantes *in vitro* é devido a fungos e leveduras. As contaminações causadas por fungos, bactérias e leveduras na micropropagação de plantas constituem as principais causas de perdas de material vegetal, podendo alcançar valores médios de 3 a 15% a cada subcultivo (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003).

Um dos fatores limitantes ao sucesso da micropropagação *in vitro* é a adequação da metodologia de assepsia dos explantes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), uma das dificuldades da micropropagação reside no fato de se obter um explante descontaminado sem conduzi-lo a morte quando isolado.

Foi observado também que as germinações com o uso da menor concentração do agente desinfestante foi maior, mas devido à alta taxa de contaminação, este procedimento foi

descartado, devido ao maior número de sementes contaminadas. Foi percebido que por um tempo prolongado, os agentes desinfestantes prejudicam a regeneração dos explantes, com isso podemos afirmar que a duração do tratamento é um ponto crítico no estabelecimento de sementes para germinação *in vitro*, uma vez que os tratamentos de assepsia podem ser ineficientes ou danosos, quando muito suaves ou muito agressivos, respectivamente.

A desinfestação superficial dos explantes deve permitir a eliminação dos microrganismos com o menor dano possível ao explante. A desinfestação em hipoclorito de sódio por 5 minutos de sementes de *Parkinsonia aculeata* não contribuiu para sua máxima germinação (GOMES, 2007). O longo tempo de exposição pode também comprometer o processo de germinação (MARTINS-CORDER ; BORGES JUNIOR, 1999).

Nos dados apresentados na Tabela 2, foi verificado que o número de sementes livres de contaminantes, que germinaram após 15 dias de à inoculação, nos tratamentos com NaOCl a concentração de 1% e 1,5% foi muito baixo, devido ao grande número de sementes perdidas pela contaminação. Esses resultados diferem dos obtidos por Kalil Filho; Graça; Grigoletti Junior, (2000), que alcançaram em até 100% a germinação das sementes de mogno quando desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos e germinadas *in vitro*.

O uso de hipoclorito de sódio 2,0% por 15 minutos promoveu menor infestação de fungos e uma maior taxa de germinação das sementes (76%). Aumentando-se o tempo de exposição ao desinfestante para 20 minutos não diferiu do tempo de 15 minutos, apresentando a mesma taxa de contaminação fúngica, mas uma maior taxa de necrose e morte das sementes e conseqüentemente menor taxa de germinação (30%), mostrando com isso que o maior tempo de exposição de 20 minutos apresentou efeito tóxico às sementes.

Tabela 2 – Médias de sementes germinadas (%) cultivados *in vitro* submetidos a diferentes concentrações e tempos de imersão em NaOCl aos 15 dias após a inoculação

| Concentração de NaOCl (%) | Tempo de imersão (em minutos) | Germinação (%) |
|------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| 0 Testemunha | 0 | 0 h |
| 1,0 | 10 | 10 f |
| 1,0 | 15 | 10 f |
| 1,0 | 20 | 10 f |
| 1,5 | 10 | 38 e |
| 1,5 | 15 | 40 d |
| 1,5 | 20 | 43 c |
| 2,0 | 10 | 70 b |
| 2,0 | 15 | 76 a |
| 2,0 | 20 | 30 g |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5%

Diversos tratamentos têm sido utilizados em espécies florestais para maximizar a germinação das sementes. Um estudo com sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) tratadas com hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos e álcool a 70% por 40 segundos apresentaram 100% de germinação, (MARTINS-CORDER ; BORGES JUNIOR, 1999). Resultado diferente comparado com o presente estudo, mostrando que para cada espécie deve-se adotar um protocolo de desinfestação diferente.

De posse destes dados, para a desinfestação das sementes de cedro, deve-se utilizar álcool etílico 70% em combinação com NaOCl (2,0 % de cloro ativo) por um período de 15 minutos.

4.2 - EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NA INDUÇÃO DE BROTOS EM SEGMENTOS NODAIS E APICAIS.

De acordo com a figura 2 pode-se observar que ocorreu efeito significativo entre as concentrações da citocinina para os segmentos caulinares do ápice. No segmento apical para o parâmetro número de brotos, o melhor resultado foi na concentração de 1 mg.L⁻¹ de BAP, produzindo média de 1,45 brotos/explante, contudo não diferiu estatisticamente das concentrações de 2, 3 e 4 mg.L⁻¹ de BAP produzindo 1,1; 0,80 e 0,70 brotos/explantes respectivamente.

Resultado semelhante foi verificado em *Cedrela fissilis* onde obtiveram uma média de 2,5 brotações por explantes em segmentos apicais quando adicionaram ao meio de cultura MS 1,25 mg. L⁻¹ de BAP (NUNES et al., 2002)

Na concentração de 4 mg.L⁻¹ de BAP houve uma diminuição no número de brotos, produzindo 0,70 brotos/explantes, seguido do tratamento sem a adição da citocinina, onde foi verificado o menor número de brotações (0,55 brotos/explantes).

Para o parâmetro comprimento das brotações houve diferença significativa entre as concentrações de BAP, onde o resultado que apresentou o maior comprimento de brotações foi verificado na concentração de 1 mg.L⁻¹ de BAP, apresentando um comprimento médio de 1,96 cm por explantes e que à medida que se aumentava a concentração, houve uma diminuição no crescimento das brotações e onde foi observado o menor comprimento das brotações foi na concentração de 4 mg.L⁻¹ (0,46 cm/explante), não diferindo estatisticamente das concentrações de 0, 2, 3 mg.L⁻¹ onde apresentaram 0,50; 0,81 e 0,70 cm/explante respectivamente (Figura 3).

É interessante ressaltar que os níveis de reguladores de crescimento adequados para proporcionar a maior quantidade de brotos emitidos variam de acordo com o genótipo da planta, e que devem ser determinadas caso a caso. Foi o que observaram Cordeiro et al., (2004) em trabalhos com *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá), que conseguiram um efeito benéfico de BAP na concentração de 3 mg L⁻¹ de BAP na proliferação de brotos em segmentos nodais alcançando uma média no comprimento dos brotos, uma faixa de 2,0 e 2,5 cm/explante.

Enquanto, Schottz (2003) obteve em média até 7,22 brotos/explante em segmento caulinar nodal de *Swietenia macrophylla* quando utilizou 10 mg.L⁻¹ de BAP.

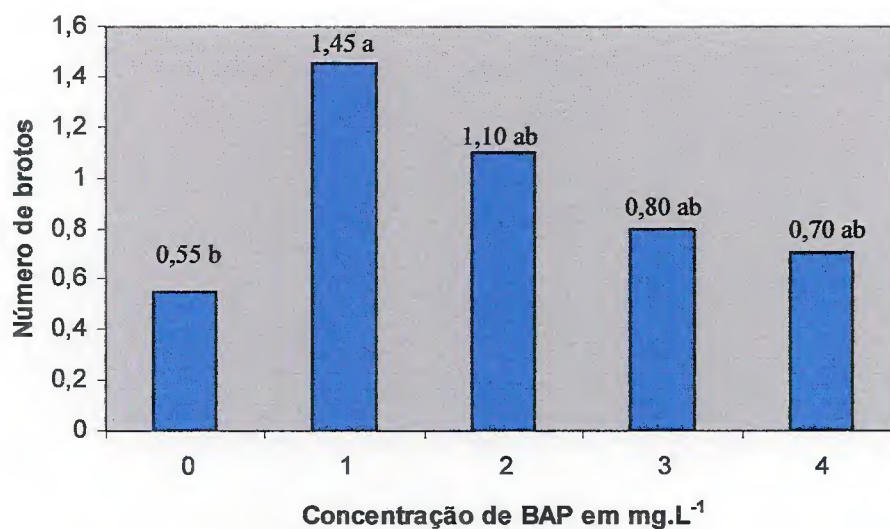


Figura 2 - Número médio de brotações em segmentos apicais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação

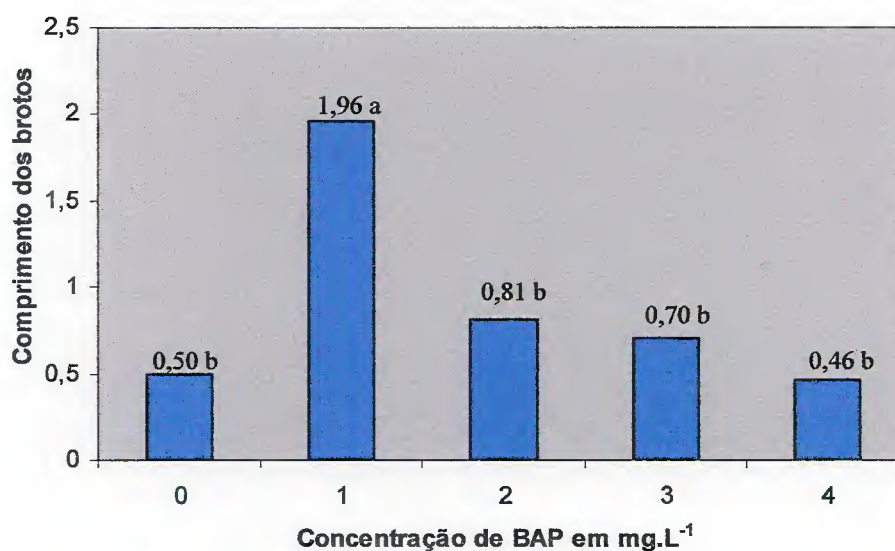


Figura 3 - Comprimento médio em cm de brotações em segmentos apicais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação

Em relação aos segmentos nodais, a figura 4 mostra que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas, para os parâmetros analisados, e onde foi verificado o maior

número de brotos foi na concentração de 1 mg.L^{-1} com 1,50 brotos/explante. Seguida das concentrações de 2, 3 e 4 mg.L^{-1} de BAP produzindo uma média de 1,3; 1,05 e 1,00 brotos/explante respectivamente. Na ausência da citocinina foi observado o menor número de brotos (0,45 brotos/explante).

Em relação ao comprimento das brotações nos segmentos nodais foi observado que o tratamento onde produziu maior comprimento das brotações foi na concentração de 1 mg.L^{-1} de BAP (0,92 cm/explante), seguida das concentrações de 0, 2 e 3 mg.L^{-1} , com o comprimento médio de 0,74; 0,89 e 0,56 cm/explante respectivamente e que na concentração de 4 mg.L^{-1} (0,25 cm/explante) encontramos o menor desenvolvimento das brotações (figura 5).

Resultados semelhantes foram verificados em ameixeira, onde para Leontiev-Orlov et al. (2000) e Rogalski ; Guerra e Silva (2003), a altura média dos brotos *in vitro* foi afetada pela concentração de BAP, reduzindo-se com o aumento da concentração desta citocinina. Para estes autores, concentrações superiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP inibiram o crescimento das brotações.

Foi observado que, a medida em que se aumentava a concentração de BAP o número e comprimento médio de brotos/explante foram reduzidos, em todos os parâmetros avaliados em segmentos apicais e nodais. Esses resultados demonstram para a espécie em estudo, que o uso de BAP em concentrações mais elevadas tende a inibir a formação de brotações e o seu desenvolvimento.

Neste estudo não houve diferenças entre os segmentos utilizados, contudo os segmentos apicais apresentaram resultados melhores em relação aos segmentos nodais, pois segundo Torres ; Caldas e Buso (1998) gemas apicais normalmente apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares, devido ao efeito da dominância apical. Entretanto, é freqüente a opção pelo uso de gemas axilares, em função de ocorrerem em maior número por planta.

Os resultados obtidos nesse trabalho com *Cedrela odorata* L. em ambos os segmentos caulinares quando comparados com as de outros autores demonstraram que o tipo de explante a ser selecionado dependerá da espécie

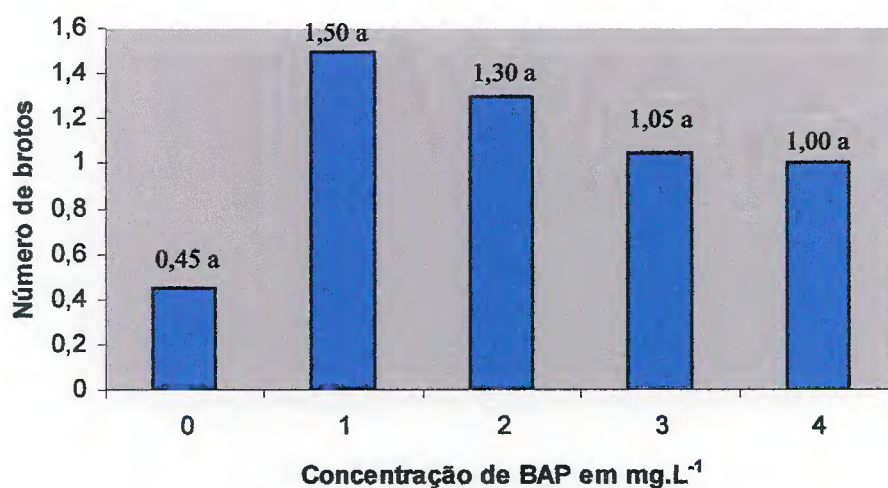


Figura 4 - Número médio de brotações em segmentos nodais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação

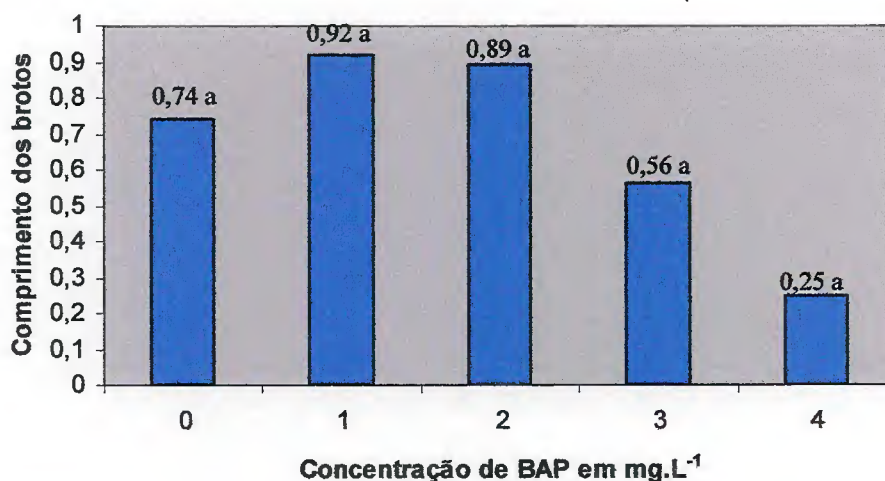


Figura 5 - Comprimento médio em cm de brotações em segmentos nodais sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação

A pequena formação de brotos, tanto em número quanto em tamanho, nos explantes inoculados em meio livre de fitorregulador indica que há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a brotação em segmentos caulinares de cedro. Foi verificado que a adição de BAP ao meio favoreceu a formação de brotos em segmento caulinares no presente

estudo como mostra a figura 6, pois Segundo Torres ; Caldas e Buso (1998), o BAP é adicionado ao meio de cultura para melhorar a micropropagação, com aumento no número de gemas, folhas e brotos, e para induzir um acréscimo na produção de massa fresca e qualidade das plantas cultivadas.

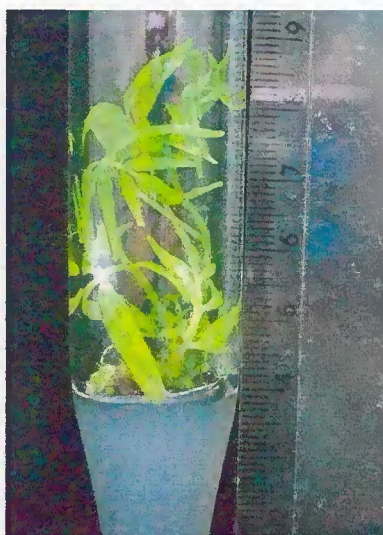


Figura 6 - Segmento apical com 1 mg. L⁻¹ de BAP aos 60 dias

A escolha da BAP para multiplicação de brotações axilares de cedro foi devido ao custo mais baixo em relação às demais citocininas e também por este regulador vegetal em geral, apresentar melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, como para peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) (RIBAS et al., 2005), louro-pardo (*Cordia trichotoma*) (MANTOVANI ; FRANCO ; VESTENA, 2001), acácia-negra (*Acacia mearnsii*) (BORGES-JUNIOR ; SOBROSA ; CORDER, 2004), copaíba (*Copaifera lagsdorffii*) (NOLETO ; SILVEIRA, 2004).

O efeito das citocininas pode apresentar-se também de maneira residual de uma subcultura para outra. Esse efeito residual torna-se negativo quando afeta o crescimento da parte aérea, limita o enraizamento e diminui a capacidade de sobrevivência durante a aclimatização, reforçando ainda mais o uso de menores concentrações de citocininas para o cedro.

E de acordo com os resultados apresentados o uso de 1 mg L^{-1} de BAP para a indução de brotações é a concentração ótima a ser utilizada, a fim de se minimizar ou até mesmo eliminar os possíveis efeitos anteriormente citados.

4.3 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA FORMAÇÃO DE BROTOS EM SEGMENTOS CAULINARES.

Não foi verificada diferença significativa quando se avaliou o número de brotos aos 45 dias. Foi observado um maior número médio de brotos em explantes inoculados nos meios contendo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose (2,65/explante), seguida de 2 g.L^{-1} de sacarose onde se obteve média de 2,05 brotos/explante (figura 7). Contudo com o aumento da concentração de sacarose para 3 g.L^{-1} verificou-se uma queda no número de brotos (1,65 brotos/explante), e que não houve formação de brotação nos explantes nos meios sem adição de sacarose.

Em relação ao comprimento dos brotos aos 45 dias (Figura 8), não houve diferença estatística entre as concentrações usadas, onde o maior comprimento dos brotos foi verificado na concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose (1,00 cm/explante), seguidas da concentração de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (0,87cm/explante) e o menor comprimento se obteve na concentração de 3 g.L^{-1} (0,65 cm/explante).

Resultado semelhante foi verificado em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), onde o número de folhas foi favorecido quando se aumentou a concentração de sacarose de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ para $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ (FERREIRA et al., 2002), como mostra o presente estudo com o cedro, onde aumentando a concentração de 1 g.L^{-1} para 2 g.L^{-1} , o crescimento da parte aérea foi estimulado.

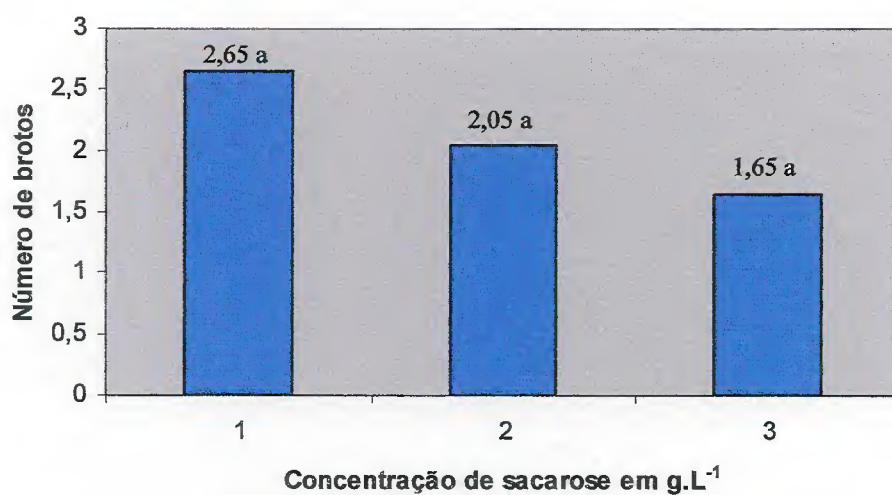


Figura 7 - Efeito de diferentes concentrações de sacarose (g.L⁻¹) no número de brotações induzidas em meio MS aos 45 dias após a inoculação

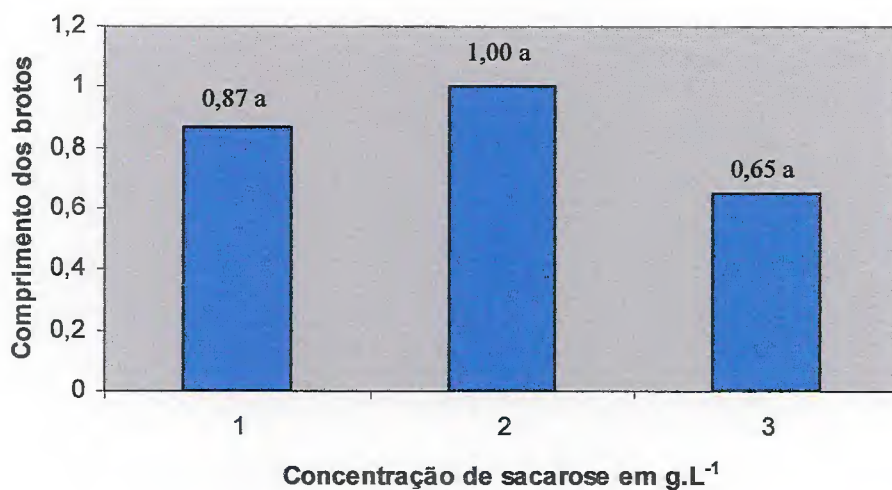


Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de sacarose (g.L⁻¹) no comprimento (cm) de brotações induzidas em meio MS aos 45 dias após a inoculação

Neste estudo os resultados mostram que a variação nas dosagens de sacarose influenciou no crescimento de brotos e aumento da parte aérea. A ausência de sacarose no meio de cultura provocou um estado estacionário nos explantes, seguindo-se de necrose e morte dos mesmos após

15 dias de cultivo *in vitro*. Portanto para a espécie em estudo há a necessidade de adição de uma fonte de carbono no meio de cultura para o seu desenvolvimento.

O mesmo foi verificado em um estudo com paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*), neste estudo foi observado que no meio MS suplementado com 3 mg L⁻¹ de BAP, mas na ausência de sacarose, não houve formação de brotações, indicando que mesmo com a presença de citocinina, há necessidade de adição de carboidrato ao meio de cultivo para multiplicação *in vitro* de paricá. (REIS et al., 2008).

Nas células, carboidratos são necessários como fonte de energia e de carbono nos processos biossintéticos. (GÖSSLOVÁ et al., 2001). A sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada, devido à rapidez de sua absorção, estando presente em meios de cultura em concentrações que variam de 20 a 40 g.L⁻¹.

Resultados semelhantes foram verificados em *Cedrela fissilis* onde após 30 dias de cultivo se obteve 100% de gemas com brotação em meio MS, suplementado com 2 g.L⁻¹ de sacarose (AMARAL, 2006).

O aumento da concentração de sacarose para 3,0 g.L⁻¹ inibiu o crescimento dos brotos (0,65 cm/explante). Essa diminuição tanto em número de brotos, quanto em tamanho, este fato pode estar relacionado com a diminuição da capacidade fotoautotrófica das plantas cultivadas com concentrações maiores de sacarose, e com o excesso de sacarose no meio extracelular, pode ter provocado uma perda maior de água devido à pressão osmótica exercida sobre o explante, devido a diminuição osmótica do meio, o que afetaria o desenvolvimento dos mesmos (TORRES, 1999)

Contudo Nunes et al. (2008), em trabalho com pinhão-mansão, verificaram que o aumento das concentrações de sacarose no meio de cultura, proporcionou crescimento linear do comprimento da parte aérea das plântulas, atingindo o máximo de 60 g.L⁻¹. Discordando dos resultados do presente estudo, sendo que essa diferença de resultados poderia ser explicada pelo fator genético, por se tratar de duas espécies distintas. Portanto, cada espécie vai se comportar de maneira diferente.

4.4 ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES

A formação de raízes adventícias em material vegetal cultivado *in vitro* constitui-se a última etapa do processo de regeneração de plantas inteiras a partir de explantes.

De acordo com a análise de variância a percentagem de formação de raízes foi influenciada pela concentração de ANA presente no meio de cultura (Tabela 3) e que na ausência da auxina não foi verificado o desenvolvimento de raízes nas brotações.

Tabela 3 - Resumo da análise da variação para o número e comprimento de raízes em função do efeito de concentrações de ANA.

| Causas da variação (mg.L ⁻¹) | G.L | | Quadrados Médios | |
|--|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| | Número de raízes | Comprimento de raízes (cm) | Número de raízes | Comprimento de raízes (cm) |
| Conc. ANA | 4 | 4 | 0,445724* | 8,411750* |
| Resíduo | 15 | 15 | | |
| CV(%) | 13,75 | 18,21 | | |
| Média | 1,42 | 1,65 | | |

*Significativos a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A ausência de raízes no meio sem a auxina, pode estar ligado à necessidade de auxina exógena para estimular a rizogênese, o que, segundo Gratapaglia e Machado (1998), é comum em partes aéreas provenientes da multiplicação. E segundo este mesmo autor, as plântulas possuem um certo nível endógeno de auxina e neste estudo este nível nos explantes utilizados foi muito baixo, não permitindo o desenvolvimento de raízes sem a adição da auxina exógena e a adição de ANA foi fundamental para que ocorresse a rizogênese.

De acordo com a figura 9, em relação ao parâmetro número de raízes, foi verificado que a melhor resposta à adição de auxina ao meio, foi obtido na concentração de 1 mg.L⁻¹ de ANA com 2,5 raízes/explante, não diferindo estatisticamente das concentrações de 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de ANA,

onde apresentaram 1,50 e 1,20 raízes/explante respectivamente. Na concentração de 2,5 mg.L⁻¹ de ANA, foi o tratamento onde se verificou o menor número de raízes (0,50 raízes/explante).

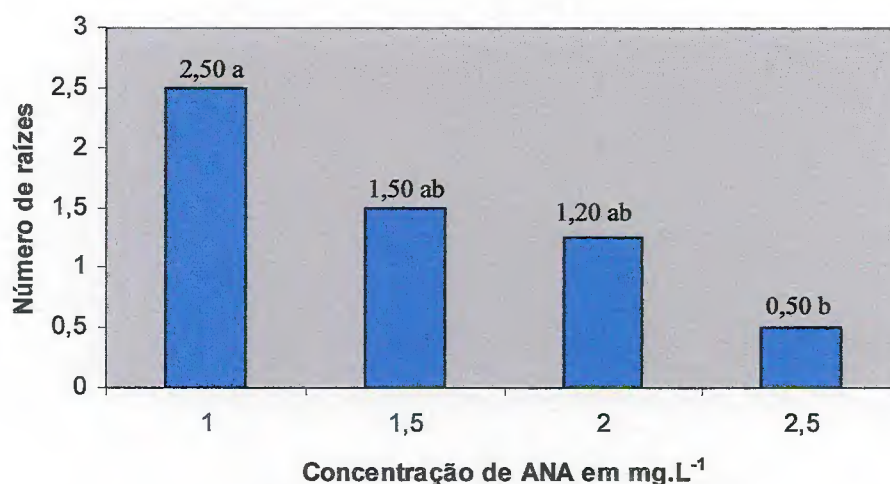


Figura 9 - Valores médios do número de raízes em brotações submetidas a diferentes concentrações de ANA. aos 45 dias após a inoculação

No parâmetro comprimento médio de raízes foi observado que a melhor resposta à auxina foi na concentração de 1 mg.L⁻¹ de ANA onde as brotações apresentaram 3,4 cm/explante. Seguidas das concentrações de 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de ANA, onde apresentaram diferenças estatísticas de 2,60 e 1,80 cm/explante respectivamente. O menor comprimento de raízes foi observado na concentração de 2,5 mg.L⁻¹ apresentando 0,30 cm / explante (figura 10)

Neste estudo se verificou um efeito negativo no desenvolvimento de raízes, onde a partir da concentração de 1 mg.L⁻¹ ocorreu uma diminuição no número e comprimento das raízes, e também na diminuição da parte aérea das brotações. Este fato pode ser devido à influência do BAP utilizado na fase de multiplicação, visto que as brotações foram provenientes dos tratamentos da fase de multiplicação com esta citocinina e que pode ter estimulado a produção de citocininas endógenas (VANKOVA et al., 1991) e isso, por sua vez, pode inibir a iniciação da raiz (BOLLMARK ; KUBAT ; ELIASSON, 1988) e também o alongamento (TAIZ ; ZEIGER, 2004).

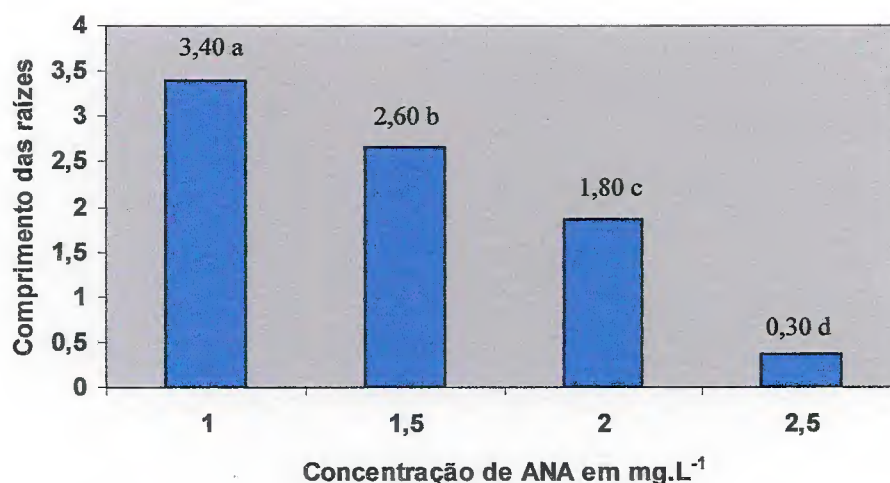


Figura 10 - Valores médios do comprimento (cm) de raiz em brotações submetidas a diferentes concentrações de ANA aos 45 dias após a inoculação

A adição de auxina também influenciou o crescimento das brotações, pois segundo Grattapaglia e Machado (1998) altas concentrações de auxinas ocasiona uma barreira para a passagem de nutrientes e água para a parte superior da planta, levando o baixo desenvolvimento da parte aérea em função do excesso de auxina, o qual causa toxidez à planta, levando a uma senescência foliar, comprometendo sua sobrevivência.

Foi observado que as brotações enraizadas apresentaram um bom sistema radicular e um bom desenvolvimento da parte aérea aos 45 dias (figura 11), sendo que as concentrações utilizadas neste trabalho discordam do estudo em *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden, onde na concentração de 1 mg.L⁻¹ de ANA foi observada indução de calo, resultando em efeito negativo no alongamento das brotações (BRONDANI et al., 2009). Isso demonstra que cada espécie se comporta de maneira diferente em relação às auxinas.

Como em Lopes et al. (2001), onde o ANA nas concentrações de 5,0 e 2,0 mg.L⁻¹ foi obtido os maiores percentuais de enraizamento e maior número médio de raízes em brotações, apresentando resultados satisfatórios nas concentrações mais elevadas comparadas ao presente estudo, discordando dos resultados aqui apresentados, ou ainda em *Cedrela fissilis*, onde a maior porcentagem de formação de raízes foi verificada com as culturas iniciadas com segmentos nodais nas concentrações de ANA 2,5 e 5 mg.L⁻¹, com 16,7 e 16,7%, respectivamente (LAUDANO, 2005).



Figura 11 - Brotação de cedro submetida à concentração de 1 mg. L^{-1} de ANA aos 45 dias

De acordo com os resultados obtidos, o uso de 1 mg.L^{-1} de ANA foi suficiente para a formação de raízes nas partes aéreas obtidas, no estágio de multiplicação, permitindo assim a constituição de plantas completas, para posterior transferência a condições *ex vitro*

5 CONCLUSÕES

Para o cultivo *in vitro* de cedro o protocolo deve ser:

Assepsia das sementes com álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio a 2 % por 15 minutos;

Indução de brotação em explantes em meio MS contendo 1 mg.L^{-1} de BAP e 2 g.L^{-1} de sacarose utilizando segmentos apicais

Enraizamento dos brotos e formação de plantas completas em 1 mg.L^{-1} de ANA.

REFERÊNCIAS

ALIERO, B. L. Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. **African Journal of Biotechnology**, Kampala (Uganda), v.2, n.9, p.325-327, 2003.

AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** Planaltina : Embrapa Cerrados, 2002. p 14.(Embrapa Cerrados, Documentos 58)

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. v.2, 377p.

BARRUETO CID, L. P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L. P. (Org.) **Introdução aos hormônios vegetais.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.

BLAKESLEY, D., WESTON, G. D., HALL, J. F. The role endogenous auxin in root initiation **Plant Growth Regulation.** v. 10, p. 341-353, 1991.

BOLLMARK M.; KUBAT B.; ELIASSON, L. Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. **Journal of Plant Physiology.** v.132, p.262-265. 1988.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Willd.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.4, p.493-497, 2004.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, J.H. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33. n.1, jan./feb., 2009

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. F.; ELIAS, M. Meios nutritivos. In: CALDAS, L. S.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA - CNPH, 1998. v. 1, 509 p.

CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.186-191, jun., 2002.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed., Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo – PR : EMBRAPA – CNPF, 2003, 1039 p

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, PR. : EMBRAPA-CNPF/SPI. 1998. 640p.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais: uma ferramenta no estudo da biologia moderna de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Disponível em:<<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: set. 2009

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá), **Cerne**, v. 10, n. 1, p. 118-124, jan./jun. 2004.

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.

FERREIRA, M.G.R.; CÁRDENAS, F.E.N.; CARVALHO, C.H.S. ; CARNEIRO, A.A.; FILHO, C.F.D. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24. n.1. Apr. 2002

FERREIRA, D.F. **SISVAR 4. 3-Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999. (Software estatístico).

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia.*, v. 28, n. 1, p. 49-55, jan./fev. 2004.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the components of culture media.** 2. ed. Great Britain: Exegetics, 1993. 574p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture.** England: Eastern Press, 1984. 709p.

GOMES, M. L. O. **Germinação *in vitro* de *Parkinsonia aculeata* L.: uma espécie de uso múltiplo ocorrente nas matas ciliares da caatinga.** 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2007.

GÖSSLOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, H.; LIPAVSKÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; VREUGDENHIL, D. Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v.37, p.24-28, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação . In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. v.1, p. 183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material Didático de apoio à disciplina de biotecnologia.** Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm>. Acesso em: 07 de nov. 2009.

HAMMAD, E. M. A.; NEMER, N. M.; KAWAR, N. S. Efficacy of Chinaberry tree (Meliaceae) aqueous extracts and certain insecticides against the pea leafminer (Diptera: *Agromyzidae*). *Journal of Agricultural Science*, n.134, p. 413-420, 2000.

HAINES, R. **Biotecnology in Forest tree improvement with special reference to developing countries.** Rome: FAO/IBPGR Forest, 1994. 230 p. (Paper, 118)

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices.** 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HIRATA, M.H. ; MANCINI FILHO, J. **Manual de biossegurança**. Barueri: Manole, 2002. 496p.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1985. 776p.

KALIL FILHO, A. N.; GRAÇA, M. E. C.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Micropropagação do Mogno (*Swietenia macrophylla*): Desinfestação e Germinação. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSISTEMAS FLORESTAIS – FOREST, 6., Porto Alegre, 2000. **Anais...** Porto Seguro, 2000, p.1013.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.1, n.1, p.30-33, maio 1997.

KLEIN, R. M. **Meliaceas**. Itajai: Herbario Barbosa Rodrigues, 1984. 140p. (Flora Ilustrada Catarinense).

LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. R.; LOPES, S. C. Efeito da sacarose e luminosidade sobre a germinação *in vitro* de embriões de cedro. Belém : Embrapa Amazônia Oriental, 2000. p.1-3. (Embrapa Amazônia Oriental, Comunicado Técnico, 20)

LAUDANO, W.L.S. **Cultura de Calos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis* VELLOZO (MELIACEAE)**.2005. 148f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A.C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**. New York, v.37, p.133-138, 2001.

LEONTIEV-ORLOV, O. ; ROGALSKI, M. ; MOSSI, A. J. ; CANSIAN, R.L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus sp*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, p.63- 67, 2000.

LOPES, S. C. **Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla*)**. 2000. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas, 2000.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1998. v. 1 e 2.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v.2.368p.

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

MARTINS-CORDER, M. P.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, v.9, n.2, p.1-7, 1999.

MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B. Recalcitrant seed Biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.). **Plant Conservation Biotechnology**, London: Taylor and Francis, 1999. p. 265-276.

MONTEIRO, A. C. B. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **In vitro Cellular e Developmental Biology-plant**, Columbia, v.36, n.6, p.527-531, 2000.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p.135-166, 1974.

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

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.109-120, 2004.

NUNES, C.F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D.N. dos; CUSTÓDIO, T.N.; ARAÚJO, A.G. de. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.1, jan., 2008

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

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**, introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações. Lavras: UFLA/AEPE, 2001, 74p.

PASTORE, J. A. **Meliaceae**. In: WANDERLEY, M. D. G. L.; SHEPHERD G. J.; GIULIETTI A.M.; MELHEM T. S. (Ed.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Rima, 2003. v.3.

PEREIRA, J. E. S; MATTOS, M. L. T; FORTES, G. L. R. 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, jul. 2003.

REIS, I.N.R. de; LAMEIRA, O.A.; CORDEIRO, I.M.C.C.; CARNEIRO, A.G.; FERREIRA, S.F. Indução *in vitro* de brotos em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*). **Plant Cell Culture and Micropropagation**., Lavras, v.4, n.1, p.21-27, 2008

REITZ, R; KLEIN, RM; REIS, A. **Madeiras do Brasil**. Florianópolis: Ed. Lunardelli, 1983.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.49, p.517-524, 2005

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. São Paulo: E. Blücher, 1971

ROCHA, S. C. ; QUORIM, M. ; RIBAS, L.L.F. ; KOEHLER, H.H. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v.31, n.1, p.43-50, 2007.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': Efeito da Citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.365-367, 2003..

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Org.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.415-444.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUSA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.79-98

SCHOTTZ, E. S. ; FILHO, A.N.K. ; TRACZ, A.L. ; KOEHLER, H. ; RIBAS, L.L.F. ; QUOIRIN, M. Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) a partir de material juvenil. *Ciência Florestal*, v.17, n.2, p.109-117, abr-jun. 2007.

SCHOTTZ, E. S. **Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de material juvenil**. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003

SILVA, R.M.S. ; BLANK, M.F.A. ; ÂNGELO, P.C.S. Desinfestação de explantes de inhame roxo (*Dioscorea rotundata*, Poir) coletados no campo para micropropagação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p.329.

SMITH, J. **Micropropagation of the Gynea Lily: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation**. Kingston: RIRDC, 2000. 59p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/index.htm>. Acesso em: 16 fev. 2009

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília- DF: EMBRAPA/CBAB. 1998. v.1, 509 p.

TORRES, A. C. **Curso Teórico e Prático de Cultura de Tecidos e Biologia Molecular**. Natal : UFRGN /Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia, 1999.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M. M. ; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TUESTA, S. Y. M. **Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de cotiledones**. 2003. TCC. Faculdade de Ciências. Universidade Nacional Agrária La Molina. Lima. Peru. 2003.

VANKOVA, R.; HSIAO, K.C.; BORNMAN, C.H.; GAUDINOVA, A. Effects of synthetic cytokinins on levels of endogenous cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells suspension. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.10, p.197-199, 1991

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2009.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v.1, p.297-330.

ANEXOS

Anexo A - Composição do meio básico MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962)

| Nº | Composto | Concentração | Solução Estoque (SE) | | Volume (SE) /1.000 mL | |
|------------------|---------------------------------------|--------------|----------------------|------------|--------------------------|----------|
| | | (mg.L-1) | Concentração | Mg/1.000mL | | mg/100mL |
| Macronutrientes | | | | | | |
| 1 | NH ₄ NO ₃ | 1.650 | 50 X | 82.500 | 8.250 | 20 mL |
| | KH ₂ PO ₄ | 170 | 50 X | 8.500 | 850 | |
| 2 | KNO ₃ | 1.900 | 50X | 95.000 | 9.500 | 20 mL |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 | 50X | 18.500 | 1.850 | |
| 3 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 | 50X | 22.000 | 2.200 | 20 mL |
| Fe-EDTA | | | | | | |
| 4 | FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,8 | 100X | 2.780 | 278,00 | 10 mL |
| | Na ₂ EDTA | 37,3 | 100X | 3.730 | 373,00 | |
| Micronutrientes | | | | | | |
| 5 | MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,3 | 100X | 2.230 | 223,00 | 10 mL |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,6 | 100X | 860 | 86,00 | |
| | H ₃ BO ₃ | 6,2 | 100X | 620 | 62,00 | |
| | KI | 0,83 | 100X | 83 | 8,30 | |
| | NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 | 100X | 25 | 2,50 | |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 | 100X | 2,5 | 0,25 | |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,025 | 100X | 2,5 | 0,25 | |
| Vitaminas | | | | | | |
| 6 | | | | (mg/100ML) | (mg/10ML) | 2 mL |
| | Tiamina-HCl | 0,10 | 500X | 5,00 | 0,50 | |
| | Piridoxina-HCl | 0,50 | 500X | 25,00 | 2,50 | |
| | Ac. nicotínico | 0,50 | 500X | 25,00 | 2,50 | |
| | Glicina | 2,00 | 500X | 100,00 | 10,00 | |
| | Mio-inositol | 100,00 | 500X | 5.000,00 | 500,00 | |
| Fonte de carbono | | | | | | |
| | Sacarose | 30.000 | 3% | | | |
| | pH | | | | | 5,8 |