

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Otimização do crescimento e desenvolvimento de teca (*Tectona grandis* Linn f.)  
*in vitro***

**Felipe Uassurê Nery**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Recursos  
Florestais. Opção: Silvicultura e Manejo Florestal**

**Piracicaba  
2011**

Felipe Uassurê Nery  
Engenheiro Agrônomo

**Otimização do crescimento e desenvolvimento de teca (*Tectona grandis* Linn f.) *in vitro***

Orientador:  
Prof. Dr. ANTÔNIO NATAL GONÇALVES

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Recursos  
Florestais. Opção: Silvicultura e Manejo Florestal**

**Piracicaba  
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Nery, Felipe Uassuré

Otimização do crescimento e desenvolvimento de teca (*Tectona grandis* Linn f.) *in vitro*.  
- - Piracicaba, 2011.  
59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Clonagem 2. Cultura de tecidos 3. Micropropagação vegetal 4. Organogênese vegetal 5. Teca I. Título

CDD 634.97338  
N456o

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

A minha família, na qual sempre encontrei apoio em qualquer momento de minha vida.

Em especial a minha mamãezinha Antonieta e ao meu maior exemplo e herói, meu pai Wanderley, pela educação e base tão valiosas que se desdobraram para me dar e tanto contribuíram na formação de meu caráter. Pelo incentivo e confiança em mim depositados, amo vocês!

Aos meus irmãos: Soraya, Ana e Saulo.

Aos meus sobrinhos: Junior, Isabela e Raquel.

**Dedico**



## AGRADECIMENTOS

Ao único EU SOU: DEUS, meu criador e aquele que me amou incondicionalmente desde o princípio de tudo. **“Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”** Romanos 11: 36

Ao Professor Antônio Natal Gonçalves pela orientação, paciência, incentivo e experiência compartilhada;

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, pela convivência durante o curso de mestrado e as aulas ministradas;

A Catarina, secretária de pós-graduação do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, pela dedicação aos alunos;

A CAPES pela concessão da bolsa;

A Sílvia Maria Zinsly, por ser tão prestativa.

Ao Betão, técnico do Laboratório de Fisiologia das Árvores, pelos ensinamentos;

Ao biólogo Wirifran Fernandes de Andrade, pela colaboração;

Aos amigos da Sala de Pós-graduação, Alexandre, Lauro, Vinícius, Marileide (Fava), Eduardo, Sara e Javier, pelas conversas e convivência agradáveis;

Aos companheiros, Gilvano, Ângela, Gilberto, Allan e Marcelo, pelo apoio;

A Miriã, com amor, pela compreensão;

Enfim, a todos que participaram dessa etapa direta ou indiretamente. Muito obrigado!



**“Para o triunfo do mal, basta que os bons não façam nada!”**

**(Edmund Burke)**





## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1 Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2. Específico .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Hipótese .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 <i>Tectona</i> sp.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 História da teca.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Propagação de <i>Tectona grandis</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Meio de Cultura.....</b>	<b>25</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Obtenção do material vegetal.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Delineamento experimental e condições de cultivo .....</b>	<b>29</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Interpretação do Peso de Matéria Seca (PMS) para os clones de teca .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.1 Clone 61.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2 Clone 62.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.3 Clone 68.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.4 Geral.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Interpretação da Taxa de Crescimento Relativo (TCR) para os clones de teca.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.1 Clone 61.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.2 Clone 62.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.3 Clone 68.....</b>	<b>42</b>

<b>4.2.4 Geral.....</b>	<b>44</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>55</b>

## RESUMO

### Otimização do crescimento e desenvolvimento de teca (*Tectona grandis* Linn f.) *in vitro*

O crescente aumento no uso da micropropagação de teca como forma de produção de clones com qualidades genotípicas e fenotípicas selecionadas a partir de árvores de elite, determinou a importância desse método, pois origina plantações com maior qualidade e uniformidade, agregando maior valor ao preço da madeira no mercado. O uso de sementes para a obtenção de mudas é uma técnica menos onerosa, porém resulta em plantas com tamanhos desiguais e não há um padrão na qualidade da madeira, essa técnica depende também da época de produção de sementes e, portanto é restrita a um período do ano. A micropropagação permite a clonagem em larga escala das árvores de elite em tempo e espaço reduzidos, podendo ser realizada em qualquer época do ano, além disso, permite a formação de mudas totalmente livres de pragas e patógenos. Faz-se necessário, maiores estudos com meio de cultura para *Tectona grandis*, pois os materiais relacionados a esse assunto são escassos. Para que a técnica do cultivo *in vitro* da teca seja incrementada, objetivou-se nesse experimento, otimizar o crescimento dos explantes de três clones diferentes, testando a eficiência de 6 meios de cultura com diferentes formulações nutricionais e constatar qual deles apresenta a melhor resposta para cada clone. O estudo contou com 6 tratamentos (MS, Básico, M1, M2, M3 e M4), durante oito épocas de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias), para três clones de *Tectona grandis* (61, 62 e 68), com três repetições por tratamento/clone, utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado. A avaliação do crescimento foi feita por meio do peso de matéria fresca (PMF), matéria seca (PMS) e a taxa de crescimento relativo (TCR) proporcionado pelos meios. O PMF foi usado para obtenção do PMS e cálculo da TCR. Baseado nos valores do PMS obtidos, para o clone 61, constatou-se a formulação do meio Básico (PMS = 0,38 g), como a mais eficiente. Para o clone 62, o meio mais responsivo foi M4 (PMS = 0,47 g) e no clone 68, destacou-se o meio M3 (PMS = 0,71 g). Quanto a TCR, não foi encontrada diferença estatística significativa para nenhum dos 6 meios de cultura levando-se em conta os três clones.

**Palavras-chave** - Micropropagação; Organogênese; Meio de cultura; Explante; Clone



## ABSTRACT

### Optimization of teak (*Tectona grandis* Linn f.) growth and development *in vitro*

The increasing use of teak micropropagation as a way of producing clones with genotypic and phenotypic qualities selected from elite trees, established the importance of this method, it leads to higher crop quality and consistency, adding more value to the price of wood business. The use of seeds to obtain seedlings has a less cost, but it results in plants with unequal sizes and wood quality without a pattern. This technique also depends on the time of seed production and therefore is restricted to a year period. Micropropagation allows cloning elite trees in large-scale and reduced time and space. It can be performed at any time of year, in addition, allows the formation of plants totally free of pests and pathogens. It is necessary more studies with culture medium for *Tectona grandis*, because the materials related to this subject are scarce. To increase the technique of teak *in vitro* cultivation, this experiment aimed to optimize the growth and development of explants from three different clones, testing the effectiveness of six culture media with different nutritional formulations and find which one offers the best answer to each clone. The study included six treatments (MS, Basic, M1, M2, M3 and M4) for eight periods (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 days) for three clones of *Tectona grandis* (61, 62 and 68) with three replicates per treatment/clone, in a randomized experimental design. The growth assessment was performed by the fresh matter weight (FMW), dry matter weight (DMW) and relative growth rate (RGR) provided by the media. The FMW was used to obtain the DMW and to calculate RGR. Based on DMW values obtained for clone 61, was found that the formulation of Basic medium (DMW = 0.38 g) was the most efficient. For clone 62, the most responsive medium was M4 (DMW = 0.47 g) and to clone 68, M3 (DMW = 0.71 g) was the highlighted medium. As the RGR, it was found no statistically significant difference for any of the six culture media taking into account the three clones.

**Keywords** - Micropropagation; Organogenesis; Culture medium; Explant; Clone



## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a cultura de tecidos, especialmente a técnica de micropropagação *in vitro*, tornou-se uma alternativa viável e segura de reprodução assexuada (propagação vegetativa) para obtenção de mudas de algumas espécies florestais, contribuindo para uma produção de plantas totalmente sadias em tempo e espaço reduzidos. Através dessa técnica, otimizou-se o melhoramento genético florestal, podendo-se propagar genótipos superiores previamente selecionados com características desejadas, criando clones que após formados originam uma população de árvores homogêneas em todos os quesitos (altura, diâmetro, qualidade de madeira, etc) influenciando diretamente na produtividade de madeira da plantação e conseqüentemente no ganho de capital.

Segundo Titon et al. (2006), a micropropagação tem como vantagens a manutenção do genótipo e do fenótipo, conhecimento sobre mutações ou variedades genéticas selecionadas, excelente estado fitossanitário das plantas obtidas, rápida propagação clonal, produção em massa geneticamente idêntica e fisiologicamente uniforme. Esse método oferece ainda, excelentes possibilidades para propagação comercial de plantas, possibilitando a obtenção de grande número de indivíduos a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (BONGA; ADERKAS, 1992).

A micropropagação ou organogênese direta, como também é conhecida, propicia sem a perda de fidelidade, clones dos genótipos selecionados, possibilitando a reversão do material à juvenilidade e segundo Correia (1993) tem sido a técnica de cultura *in vitro* mais aplicada para *Eucalyptus grandis*. Esta afirmação tornou-se uma realidade também para *Tectona grandis*, uma árvore de madeira nobre, muito apreciada e de alto valor econômico.

Na Tailândia, foi dada alta prioridade para a propagação vegetativa na década de 80 e nos anos 90 a cultura de tecidos avançou para uma escala comercial (KAOSA-ARD et al., 1998). Em contrapartida, na propagação por sementes existem dificuldades como a pequena quantidade produzida por árvore e a baixa taxa de germinação da maioria de seus lotes (GOH; GALIANA, 2000). A consequência desses fatores é a formação de uma plantação de grande variabilidade



genética, com plantas de alturas desiguais e madeira de qualidade variável, não existindo um padrão.

Bonga (1980) apontou que a cultura de tecidos é um método que está avançando muito rápido e que possui um ótimo potencial se for perseguido de forma realista. Devido a esses fatores objetivou-se neste trabalho otimizar o crescimento dos explantes através da modificação das características nutricionais dos meios de cultura, procurando assim, constatar qual deles estará em maior conformidade àquela exigida pela espécie em questão. Higashi e Gonçalves (2006) salientam que diversos autores avaliaram o desenvolvimento de calos e brotações *in vitro* para várias espécies, mediante a alteração dos sais minerais dos meios de cultura.

Contudo para a cultura de teca, trabalhos dessa área são mais escassos devido ao recente interesse em seu cultivo *in vitro*, destacando-se, portanto, a importância de novos trabalhos relacionados.

Como o meio de cultura é o foco de trabalho do experimento, leva-se em conta a observação de Correia (1993), dizendo que dentre os fatores ambientais de maior importância destaca-se o meio de cultura, sua especificidade com as exigências nutricionais da espécie e/ou clone e a capacidade de difusão para influenciar no crescimento e desenvolvimento, aumentando o desempenho em cada fase da micropropagação.

Segundo Kaosa-ard (1998) é possível obter explantes em série, de mudas de teca com 45 dias de idade, as quais também já foram explantes. Almeja-se assim, encurtar essa fase de formação dos explantes, tornando-os aptos novamente para serem multiplicados em seqüência e por um número indefinido de vezes, com maior rapidez, porém sem perder suas qualidades. Esse benefício poderá ser sentido também com a antecipação da fase de enraizamento.

Estudos de nutrição *in vitro* poderiam ser instrumentos importantes no entendimento de aspectos relacionados à exigência nutricional no campo em curto espaço de tempo. Esses trabalhos poderiam antecipar os conhecimentos sobre a exigência de clones quando comparados com estudos em condições de campo, além de apresentarem menores custos de implantação e avaliação. Materiais genéticos podem ser selecionados quanto à exigência nutricional e déficit

hídrico, servindo como base para o plantio em áreas de diferentes fertilidades de solo e distribuição de precipitação (HIGASHI; GONÇALVES, 2006).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Geral**

Avaliar o crescimento de teca *in vitro* sob influência de adequação estequiométrica dos nutrientes minerais nos meios de cultura.

### **1.1.2. Específico**

Determinar quais concentrações e relações nutricionais nos meios de cultura foram mais eficientes para o crescimento e desenvolvimento com taxas de crescimento máximo e de crescimento ótimo de brotações de teca, por meio da avaliação do incremento de matéria fresca, matéria seca e a taxa de crescimento relativo.

## **1.2 Hipótese**

Diferentes concentrações e relações nutricionais no meio de cultura induzirão desenvolvimento e crescimento diferenciados de brotações de *Tectona grandis in vitro*.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Tectona* sp.

O gênero *Tectona* é representado por apenas três espécies, *Tectona grandis* Linn f., *Tectona hamiltoniana* Wall., distribuída pelas zonas secas de Mianmar e *Tectona philippinensis* Benth e Hooker. f., restrita às Ilhas Filipinas (TEWARI, 1992). A espécie utilizada foi a *Tectona grandis* Linn f.. Sua filogenia ou classificação botânica compreende (APG III, 2009):

Reino: Plantae

Clado: Eudicotiledôneas

Clado: Eudicotiledôneas nucleares

Clado: Asterídeas

Clado: Lamídeas

Ordem: Lamiales

Família: Lamiaceae

Gênero: *Tectona*

Espécie: *Tectona grandis*

### 2.2 História da teca

A teca é uma espécie arbórea natural das florestas de monção do sudeste asiático (Figura 1). Trata-se de uma árvore tropical heliófita, caducifólia, que perde suas folhas na estação seca, ocorrendo de forma descontinuada entre os paralelos de latitudes 9° a 26° N, e de longitudes 73° a 104° L ao longo dos territórios da Índia central e meridional, Bangladesh, Mianmar (antiga Birmânia), norte da Tailândia e Laos. Subseqüentemente foi introduzida em alguns países do sudeste da Ásia como a Indonésia, Sri Lanka, Vietnã, Leste e Oeste da Malásia e Ilhas Salomão, também em alguns países da África, como Costa do Marfim, Nigéria e Togo (VEIT, 1996; GOH; MONTEUUIS, 2004).

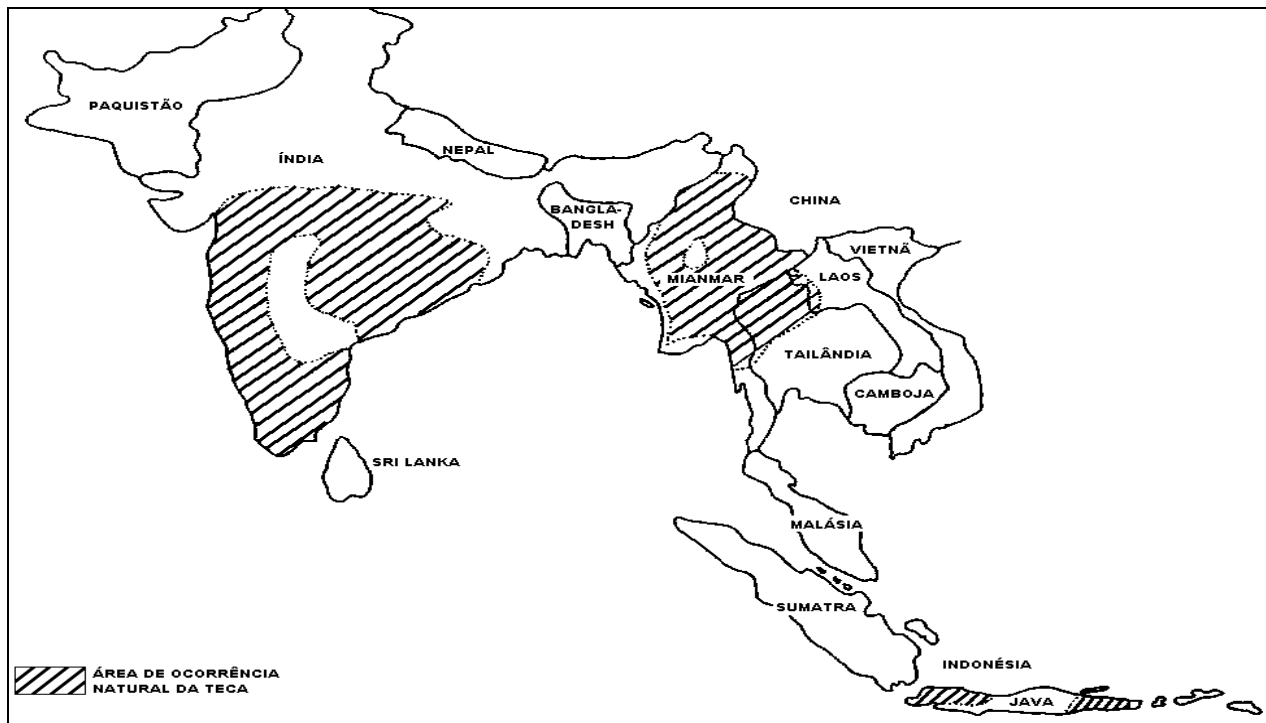


Figura 1 – Área de ocorrência natural de *Tectona grandis* no mundo. Adaptado de FAO (1998)

É uma árvore de segunda grandeza, raramente atingindo portes superiores a 30 metros. Pode alcançar 2 metros de diâmetro com um fuste de 24 metros de altura. Seu crescimento é bastante lento, levando em suas condições naturais cerca de 100-120 anos para atingir 60 centímetros de diâmetro (MIRANDA, 1988).

A origem dos materiais de teca introduzidos no Brasil ainda é desconhecida. Somente têm-se registro de materiais provenientes da Índia que foram utilizados em plantios de teca realizados no Jardim botânico do Rio de Janeiro e no Horto Florestal de Rio Claro, em São Paulo (MATRICARDI, 1989).

No Brasil é plantada em escala comercial, principalmente, nos estados do Mato Grosso, Amazonas e Acre. Cultivada desde o século XVIII, quando se destinava principalmente à construção naval, a teca atualmente serve para múltiplos fins, tais como na construção civil, na fabricação de assoalhos e *decks*, sendo também destinada ao setor mobiliário, de embarcações, laminados decorativos e adornos em geral. A área de florestas plantadas com teca no Brasil atingiu, em 2009, estimados 65.240 ha, enquanto em 2008 o total foi de 58.810 ha. Tais áreas

representam crescimento de 10,9% na área plantada deste grupo de espécies no país, indicando o interesse crescente por tal gênero florestal, principalmente em função das expectativas de retorno financeiro em projetos com a mesma (ABRAF, 2010).

A madeira da teca é conhecida e valorizada por suas propriedades físicas, mecânicas e de uso, assemelhando-se ao mogno. Ela é leve, porém resistente. É durável, mesmo se exposta ao tempo ou a água do mar por longo período; é estável, uma vez que sua contração ou dilatação é mínima, com as variações da umidade de ambiente e não empenha durante a secagem; é fácil de trabalhar, permitindo excelente acabamento e, adicionalmente, tem aspecto agradável e decorativo (VEIT, 1992, 1996). Essa madeira possui grande importância econômica e corresponde a 4% da área total das espécies florestais plantadas no mundo (KRISHNAPILLAY, 2000).

Além de suas características físicas, ela possui uma resistência natural ao ataque de fungos, insetos pragas e brocas, o que a coloca em um patamar de grande importância econômica. Sendo considerada uma madeira nobre, é também muito empregada na fabricação de móveis e revestimento de embarcações (VIEIRA et al., 2002).

A demanda mundial pelas chamadas madeiras nobres tem aumentado, porém a maior parte que é comercializada foi explorada de forma ilegal e é proveniente de florestas nativas, sendo retiradas de forma agressiva. No Brasil, mais precisamente na Amazônia, as reservas de mogno, cerejeira e freijó estão esgotadas há cerca de 15 anos (VIEIRA et al., 2002).

Todos esses fatores geraram esforços para o melhoramento genético da teca por meio da micropropagação *in vitro*, que tem se mostrado mais eficaz do que a propagação feita via sementes, enxertia e macro-estaquia.

## **2.2 Propagação de *Tectona grandis***

A espécie pode ser propagada de maneira sexuada (sementes) ou assexuada, chamada de propagação vegetativa (enxertia ou estaquia).

O método tradicional de propagação da teca é através de sementes, particularmente quando estas se encontram em quantidade restrita e presumivelmente, possuem um alto valor genético, assim como para pomares de polinização controlada (GOH; GALIANA, 2000).

Isso significa que a propagação sexuada é, no entanto prejudicada pelo limitado número de sementes produzidas por árvore, juntamente com as baixas taxas de germinação em alguns lotes de sementes, dependendo da origem, condições de armazenamento e tratamentos prévios para a semeadura (KAOSA-ARD, 1986).

Segundo Dupuy e Verhaegen (1993), plantas originadas por sementes não apresentam crescimento e desempenho homogêneos devido a incerteza relacionada a herança de características importantes e econômicas.

Em contrapartida aos fatores da propagação por sementes, pode-se adotar a perpetuação pelo modo assexuado ou vegetativo, sendo esta uma alternativa vantajosa que permite a multiplicação do mesmo indivíduo por um número de vezes indefinido, conseguindo ainda manter as suas características genéticas, criando-se simplesmente clones.

A enxertia é usualmente empregada para preservar as árvores em bancos de clones ou para os pomares de produção de sementes, nos quais o objetivo é a produção em larga escala. Porém um grande problema da enxertia é a incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto (HONG, 1975).

A estaquia é um método usado para a multiplicação de muitas espécies florestais, alcançando grande sucesso para algumas delas. Pode ser realizada de inúmeros modos, sendo um deles o enraizamento de galhos intactos sem retirá-los da planta, através da aplicação de uma cinta embebida em hormônios envolvendo o galho (KADAMBI; DABRAL, 1954; HOEKSTRA, 1957)

Outro caminho é a mini-estaquia, considerada uma técnica de micropropagação, tem esse nome, pois é feita em um nível menor, usando brotações de mudas, diferentemente da estaquia comum que utiliza geralmente pequenos galhos da planta. Efetuado em viveiro, nesse método lança-se mão do uso das brotações axilares de mudas enraizadas com 20 a 30 centímetros de altura, retirando-as subsequentemente, para originar novos clones. Em média cada muda pode produzir 40 mini-estacas anualmente, que são enraizadas em viveiro sob sistema de nebulização (GOH; MONTEUUIS, 2004).

Não menos importante, destaca-se a micro-estaquia, especificamente conhecida como cultura de tecidos, método geralmente aplicado no cultivo *in vitro* em laboratório (Figura 2), que se desenvolveu rapidamente nos últimos anos. Com essa técnica é possível retirar partes de qualquer tecido da planta e através do fornecimento de nutrientes e fitorreguladores obterem-se clones.



Figura 2 – Aspecto geral de explantes de teca *in vitro* em sala de crescimento no Laboratório de Fisiologia das Árvores localizado no Departamento de Ciências Florestais da ESALQ - USP

No caso da teca, utilizam-se sementes germinadas *in vitro*, e pela origem da semente notam-se os benefícios da cultura de tecidos através da melhora na capacidade germinativa (21%



em laboratório contra 4% em viveiro), bem como a possibilidade de propagar material de plantas, *in vitro*, enriquecendo o banco de genes disponível. Entretanto, a extração das sementes de frutos maduros é bastante trabalhosa e o tempo consumido com isso envolve cuidado com o risco de dano às delicadas sementes (GOH; GALIANA, 2000).

Para a propagação feita a partir de porções nodais de brotações das plantas, utilizam-se segmentos com um nó, originários da porção terminal dos brotos. Podem vir também de novos crescimentos produzidos por hastes ou novos galhos localizados em condições adequadas de viveiro sob sistema nebulizado (MONTEUUIS et al., 1995). Cada explante é colocado em recipiente com meio de cultura contendo nutrientes e fitorreguladores para a produção de novos brotos (Figura 3).

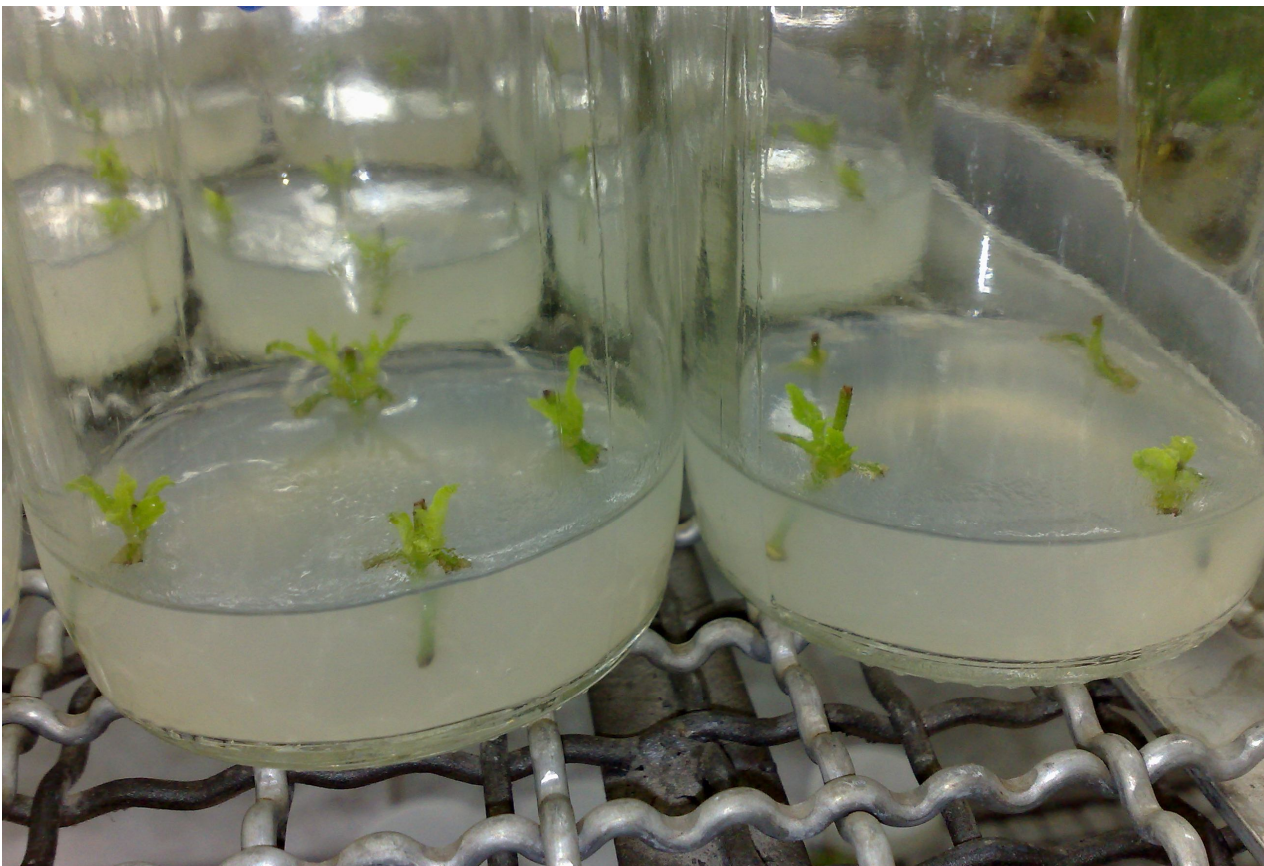


Figura 3 – Detalhe de explantes de teca em sua fase inicial de estabelecimento *in vitro* em meio de cultura sólido (adição de agente geleificante – agar)

A tecnologia desenvolvida possibilita a micropropagação em massa de qualquer genótipo através de brotações axilares com uma taxa exponencial de multiplicação de três a quatro brotações a cada dois meses de subcultivo (MONTEUUIS, 1995).

Uma análise econômica comparativa mostrou que para a produção de mais de 100.000 explantes por ano, os procedimentos adotados na cultura de tecidos são mais eficientes do que a produção em viveiros de mudas (MONTEUUIS; MAÎTRE, 2007).

Existe ainda a propagação feita por meristemas apicais de brotos, sendo este, um procedimento especialmente útil para a introdução de culturas livres de patógenos, particularmente aqueles endógenos que são difíceis de erradicar através de outros meios (GOH; GALIANA, 2000). Essa técnica funcionou muito bem para multiplicação de milhares de meristemas apicais vindos de genótipos já maduros (MONTEUUIS et al., 1998).

Nesse tipo de micropropagação o manipulador precisa ter habilidade, concentração e ferramentas específicas como uma lupa iluminada e lâminas afiadas para cortar as gemas, que serão colocadas *in vitro* para formação de calos e em seguida novos brotos.

A micropropagação mostrou-se mais eficaz quando efetuada a partir de explantes de árvores jovens e mudas originadas de sementes, pois, nesse caso, obteve-se enraizamento máximo, porém observou-se mínima formação de raízes quando usados explantes de árvores adultas maduras (NAUTIYAL; RAWAT, 1994).

Os métodos de micropropagação tais como, germinação de sementes *in vitro*, segmentos nodais de brotações ou a multiplicação de meristemas, possuem as mesmas capacidades organogênicas para cultivos feitos *in vitro*. Dentre elas, enraizamento espontâneo e uma taxa de multiplicação de três a quatro clones por explante (GOH; GALIANA, 2000).

### **2.3 Meio de Cultura**

Conforme Bravo (2005), a regeneração da cultura de tecidos vegetais é basicamente influenciada pelo genótipo, meios de cultura, tipos de explante e condições de cultura.

Geralmente os meios de cultura para cultivo *in vitro* são compostos por íons minerais, reguladores de crescimento, sacarose e vários compostos orgânicos, com a presença ou ausência de agente geleificante (CORREIA, 2006).

A otimização da produção de brotações pode ser feita através da manipulação do meio, do ambiente, do background genético ou do estágio de desenvolvimento (CARDIM, 2006). Um dos meios mais utilizados em micropropagação *in vitro* ultimamente é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), otimizado para a cultura de calos em tabaco (WILLIANS, 1995).

O meio MS caracteriza-se por apresentar concentração iônica total alta, sendo as concentrações de nitrogênio, potássio, zinco e cloro mais elevadas quando comparadas a outros meios de cultura (GABRIEL, 2009).

Diniz et al. (1999) concluíram que para a bananeira cultivada *in vitro* o meio básico MS na quantidade de 12,5 mL por explante fornece macronutrientes em níveis satisfatórios para o seu desenvolvimento até os 50 dias, a partir dos quais cessa a absorção do P e do S.

Para se obter um meio de cultura melhorado é necessário que haja uma adequação do suprimento nutricional à espécie que se está trabalhando, como por exemplo, o meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), desenvolvido especificamente para o cultivo de *Eucalyptus grandis*.

Durante a formulação de um meio específico para uma espécie, deseja-se obter um balanço iônico ajustado e com níveis de nutrientes considerados adequados para um crescimento ótimo e máximo (CORREIA, 2006).

Daquinta et al (2002), induziu a formação de calos do ápice, entrenós e cotilédones de *Tectona grandis* utilizando o meio MS com diferentes concentrações de thidiazuron e conseguiu obter brotos dos calos do ápice caulinar mediante a aplicação de diferentes níveis de benzilaminopurina e quinetina.

Tiwari et al (2002) conseguiu média máxima no número de brotações em explantes nodais de teca, estabelecidos *in vitro* em meio MS suplementado com benzilaminopurina e AIA (3 ácido indol acético).

Terrer e Tomas (2001) obtiveram maiores taxas de multiplicação de brotações, maiores alturas, maior número de folhas e baixos sintomas de hiperhidria nos meios de cultura com teores nutricionais específicos desenvolvidos para porta-enxertos (pessegueiro/amendoeira) do que em meio MS.

A otimização do meio de cultura pode ser feita modificando-se vários fatores, dentre eles, a concentração de macro e micronutrientes, reguladores de crescimento, nutrientes orgânicos e também o estado físico do meio (líquido ou sólido). Neste trabalho o fator analisado foi a variação nutricional de cada meio influenciando no crescimento e desenvolvimento dos explantes multiplicados.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fisiologia das Árvores localizado no Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, campus da Universidade de São Paulo (USP), situado no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo.

#### 3.1 Obtenção do material vegetal

Foram utilizadas brotações de gemas caulinares de mudas micropropagadas mantidas *in vitro* no próprio laboratório, sendo estas, originárias de três clones diferentes de teca (61, 62 e 68). Fez-se uso do meio de cultura sólido (com adição de agente geleificante - agar). O processo de obtenção das brotações caulinares foi efetuado em câmara de fluxo laminar devidamente esterilizada, como preconizado para uma segura assepsia das plântulas obtidas. Para manipulação e excisão dos explantes utilizou-se tesoura e pinça de metal, esterilizadas.

#### 3.2 Delineamento experimental e condições de cultivo

O experimento consistiu em um delineamento experimental inteiramente casualizado com seis tratamentos (6 meios de cultura diferentes - ver Tabela 1) para cada um dos três clones (61, 62 e 68), efetuando-se três repetições por tratamento, por clone. A primeira avaliação foi durante a implantação (dia 0), seguida de sete épocas de avaliação no decorrer da pesquisa (7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias). No dia 0 os explantes foram excisados e avaliados em seguida, sem haver necessidade de sua implantação *in vitro*, como para os demais.

Em cada época de avaliação foi verificado o Peso de Matéria Fresca (PMF), o Peso de Matéria Seca (PMS), porcentagem de matéria seca e a Taxa de Crescimento Relativo (TCR), retirando-se três frascos de cada tratamento para análise. O PMS foi obtido após a secagem da matéria fresca em estufa a 60 °C durante 72 horas. Cada frasco continha 4 explantes e 40 mL de meio de cultura sólido (presença de agente geleificante - agar) e pH do meio ajustado para 5,8.

Tabela 1 - Cntrações ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dos sais nos meios de cultura (MS, Básico, M1, M2, M3 e M4) utilizados no cultivo de *Tectona grandis in vitro*

Sal	Peso molecular (g)	Concentração ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) do sal no meio de cultura					
		MS	Básico	M1	M2	M3	M4
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	80,04	20,06	8,00	20,00	8,00	8,00	20,00
$\text{KNO}_3$	101,11	18,80	3,50	3,50	12,00	3,50	12,00
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,04	1,25	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	---	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,20	3,00	---	---	---	2,50	2,50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48	1,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278,02	0,100	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
$\text{Na}_2$ EDTA	372,24	0,100	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169,02	0,100	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,83	0,100	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	289,54	0,030	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,68	0,0001	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,95	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237,93	0,0001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
KI	166,01	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005

O PMS é utilizado para o cálculo da TCR, definida por meio da equação dada por Hunt (1982).

$$TCR = \left( \frac{\ln PMS_2 - \ln PMS_1}{T_2 - T_1} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: TCR = Taxa de Crescimento Relativo em porcentagem

ln = logaritmo neperiano

$PMS_2$  = produção de matéria seca no período final

$PMS_1$  = produção de matéria seca no período inicial

$T_2$  = tempo final

$T_1$  = tempo inicial

A cultura foi mantida em sala de crescimento com temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas, com  $50\text{ }\mu\text{mol m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) equivalente a 2000 lux. A luminosidade foi fornecida por luz branca fria localizada 30 cm acima do nível de cada prateleira, gerada por duas lâmpadas de 110 Watts de potência e 250 cm de comprimento, aproximadamente, durante todo o tempo da pesquisa.

Todas as variantes foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para constatar se houve interação significativa e os dados obtidos para TCR foram avaliados no Teste de Tukey a 5% de probabilidade.





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise variância (ANOVA) efetuada, houve diferença significativa na interação dos três elementos (tempo, clone e meio de cultura) (Tabela 2).

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para Peso de Matéria Fresca (PMF), Peso de Matéria Seca (PMS) e Taxa de Crescimento relativo (TCR) de explantes de teca em relação aos tratamentos testados

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios		
		PMF <sup>(1)</sup> ( g · explante <sup>-1</sup> )	PMS <sup>(1)</sup> ( g · explante <sup>-1</sup> )	TCR ( % · dia <sup>-1</sup> )
Tempo (T)	7	15,457**	0,4541**	0,3408**
Parcela	16	0,019 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>	0,0061 <sup>ns</sup>
Clone (C)	2	3,624**	0,1298**	0,0015 <sup>ns</sup>
Meio (M)	5	0,192**	0,0085**	0,0020 <sup>ns</sup>
C*M	10	0,035**	0,0021**	0,0027 <sup>ns</sup>
C*T	14	0,246**	0,0120**	0,0191**
M*T	35	0,048**	0,0019**	0,0115**
C*M*T	70	0,024**	0,0007**	0,0081**
Resíduo	272	0,013	0,0005	0,0047
Média	---	1,471	0,138	11,14
CV <sub>exp</sub> (%)	---	9,03	2,90	21,19

<sup>ns</sup> valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\*\* valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> e <sup>(2)</sup> dados transformados por  $(n+0,5)^{0,5}$  e  $((n+0,5)/100)^{0,5}$ , respectivamente pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro.  $n$  = dado amostrado.

CV<sub>exp</sub>(%) = coeficiente de variação experimental, GL = graus de liberdade.

Levando em consideração a ANOVA ter sido significativa, faz-se a seguir a discussão dos dados e resultados relacionados ao estudo realizado.

### 4.1 Interpretação do Peso de Matéria Seca (PMS) para os clones de teca

No decorrer do experimento, os explantes de cada clone de teca foram pesados para obtenção da quantidade de matéria fresca (PMF). Posteriormente, após a secagem do material, obteve-se o peso de matéria seca e por meio deste pode-se fazer o acompanhamento e verificar o incremento de matéria seca proporcionado pelos diferentes tratamentos utilizados, durante as épocas de avaliação. Sendo assim, pode-se inferir quais meios foram mais eficazes para cada

clone. Os gráficos do PMF não serão utilizados nessa discussão, pois seus dados podem camuflar os reais valores para cada meio, devido a presença de água na matéria fresca dos explantes, entretanto são de extrema importância. Estes, estão disponíveis nos anexos, para consulta complementar (Anexos 1, 2 e 3).

#### **4.1.1 Clone 61**

Visualizando a Figura 4, nota-se, de forma geral, que foi a partir dos 35 dias de avaliação, quando começou a haver uma diferenciação mais nítida entre cada curva no ganho do peso de matéria seca (PMS) por parte dos explantes, em seus respectivos meios de cultura. O meio Básico, foi aquele que apresentou maior PMS (0,38 g), seguido de M3 (0,36 g), logo após vieram M2 e M4 (ambos com 0,34 g), levando em conta os 49 dias do experimento.

O meio MS foi o que menos contribuiu para esse incremento (0,20 g). É interessante observar-se que ele ocasionou nos explantes um crescimento bem estável, sem uma variação muito grande em sua curva de tendência, assemelhando-se até mesmo com um crescimento mais linear, o mesmo não ocorreu com os demais meios.

Apesar do meio MS ter ocasionado o menor crescimento dos explantes, Tambarusssi (2009), em um estudo com teca, comparou três meios de cultura (MS, WPM, e JADS) e encontrou para o MS os melhores resultados de altura de plântulas (7,5 cm) e gemas laterais (4 gemas), contra 6,0 cm e 3,65 gemas laterais no JADS e 6,8 cm e 2,95 gemas no WPM. Neste caso o MS foi o mais responsivo.

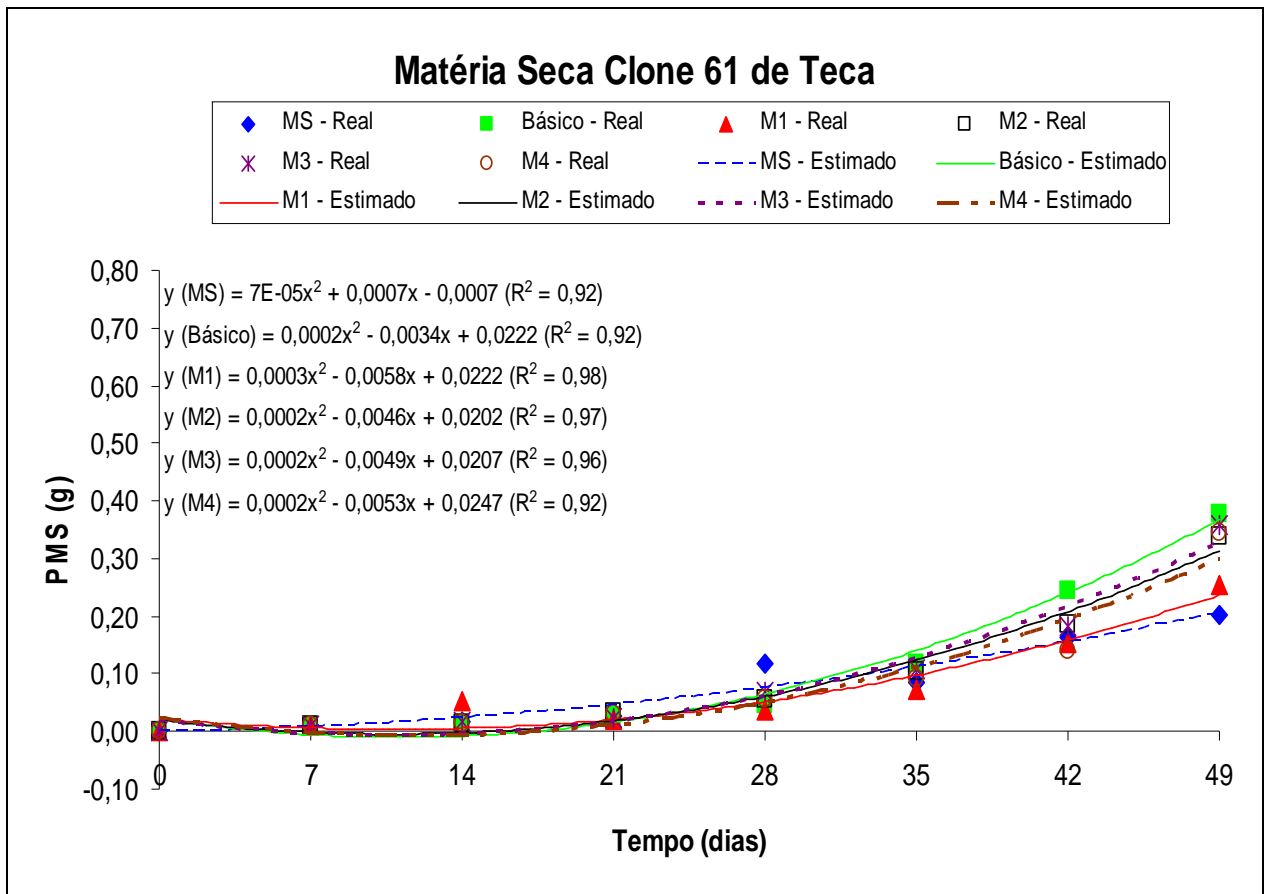


Figura 4 – Valores reais e estimados para o peso de matéria seca (PMS), em gramas (g), para os meios de cultura MS, Básico, M1, M2, M3 e M4 em função das 8 épocas de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias) para o clone 61 de teca

Atentando-se para a curva de tendência de cada meio (Figura 4), conclui-se que o Básico foi o mais promissor dentre eles, seguido em uma posição intermediária por M3, M2 e M4. Os meios M2, M3 e M4 levaram os explantes a se comportarem de maneira praticamente idêntica durante o experimento, de modo geral. Os explantes do meio M1 obtiveram PMS de 0,25 g, ficando numa posição bem baixa, acima, apenas, do MS. Quanto a sua linha de tendência, observa-se que a partir dos 35 dias, diferenciou descreveu uma trajetória de distanciamento das curvas dos meios Básico, M2, M3 e M4.

### 4.1.2 Clone 62

Para o clone 62 de teca, observa-se (Figura 5) que as plântulas cultivadas no meio Básico tiveram um pequeno incremento no PMS entre os 42 e 49 dias de cultivo, correspondendo respectivamente a 0,33 e 0,37 g, se comparado com os demais meios nesse mesmo período. Atentando-se para as curvas de tendência, vê-se que o meio M3 se sobressai. Porém levando-se em conta o PMS aos 49 dias, nota-se que M4 foi o maior (0,47 g), em seguida M3 (0,46 g), M2 (0,45 g) e MS (0,43 g).

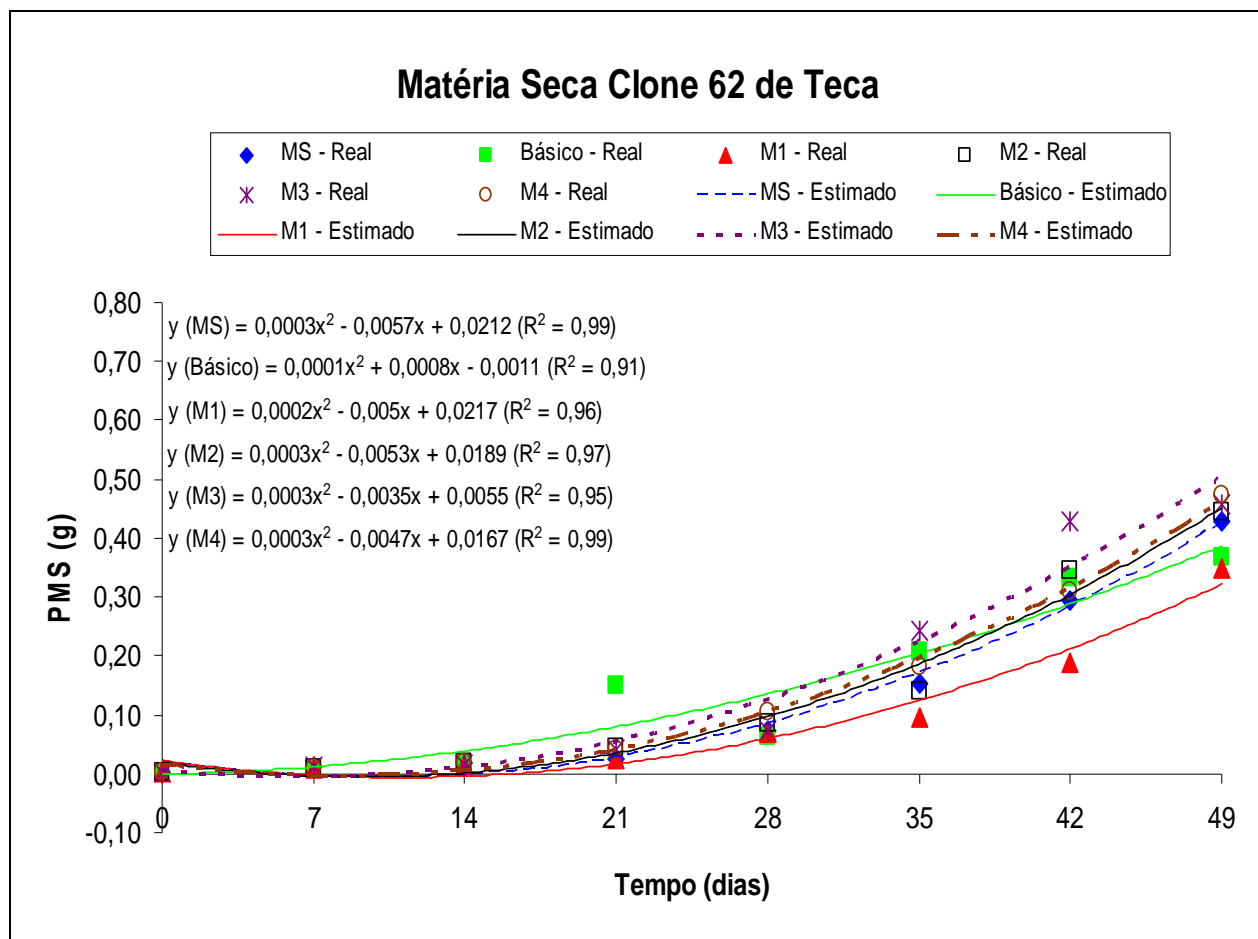


Figura 5 – Valores reais e estimados para o peso de matéria seca (PMS), em gramas (g), para os meios de cultura MS, Básico, M1, M2, M3 e M4 em função das 8 épocas de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias) para o clone 62 de teca

A curva de tendência do meio Básico (Figura 5) apresentou o comportamento mais diferente das outras, descrevendo uma trajetória quase retilínea, ficando com PMS aos 49 dias

bem baixo (0,37 g). Para M1, registrou-se o menor valor aos 49 dias (0,35 g), sendo que sua curva também foi a mais destoante e baixa de todas, ou seja, foi o meio menos responsivo, acarretando um menor incremento de matéria seca para esse clone.

#### 4.1.3 Clone 68

Nos valores do PMS para o clone 68 (Figura 6) evidencia-se um comportamento mais padronizado dos explantes de um modo geral, pois estes descreveram curvas de tendência com inclinações semelhantes durante seu crescimento, porém com diferentes valores. Os meios que proporcionaram menores resultados para o PMS das plantas aos 49 dias foram o M1 (0,48 g), seguido do MS e M4 (0,51 g para ambos) como se pode observar. As plântulas do M3 obtiveram o maior PMS (0,71 g), em seguida, decrescentemente, vieram o M2 (0,64 g) e o Básico (0,56 g).

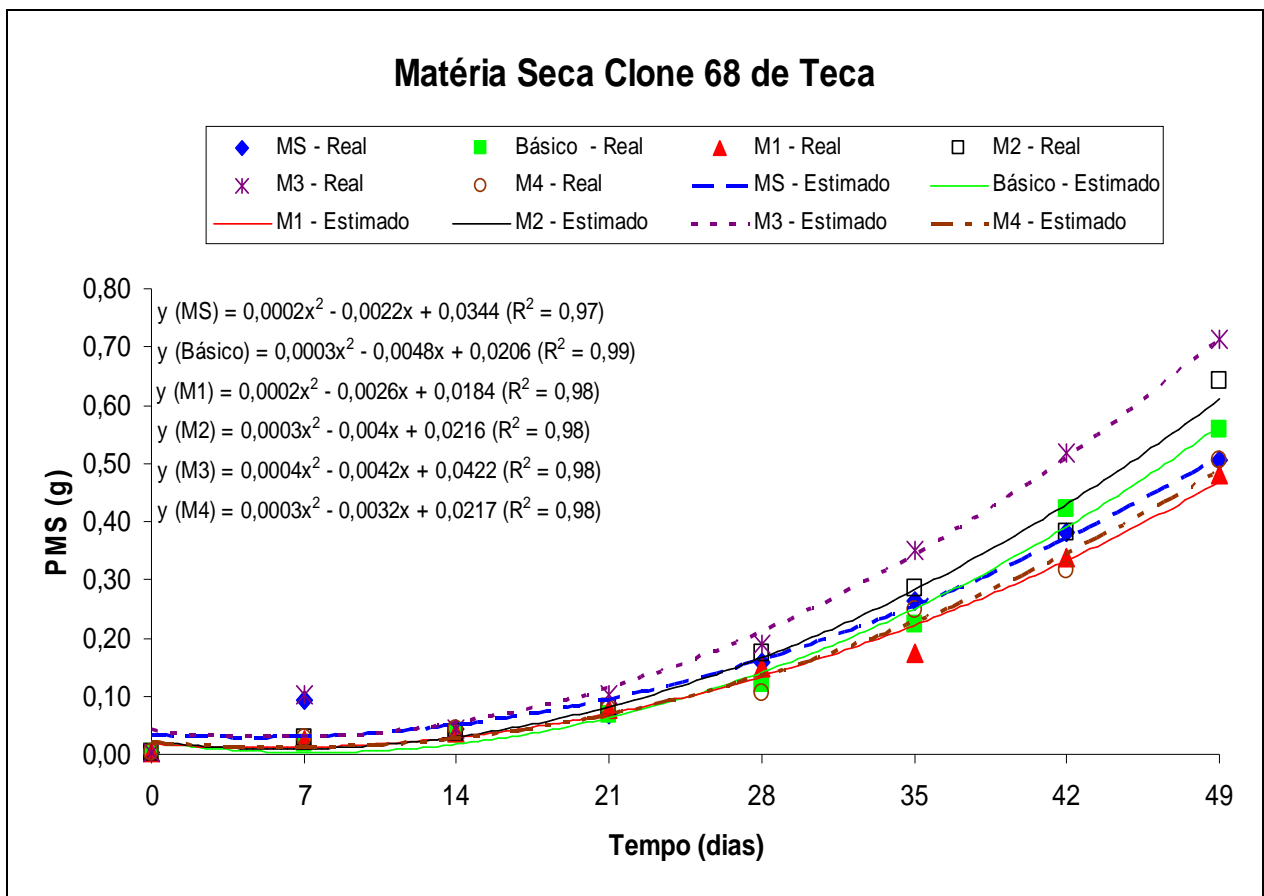


Figura 6 – Valores reais e estimados o peso de matéria seca (PMS), em gramas, para os meios de cultura MS, Básico, M1, M2, M3 e M4 em função das 8 épocas de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias) para o clone 68 de teca

Observando-se as curvas de tendência, nota-se que os valores estimados mais elevados são daquela descrita por M3, sendo, portanto o meio que proporcionou o maior crescimento para o clone 68. Os meios M2 e Básico tiveram curvas intermediárias a M3 e os demais formaram um grupo de curvas parecidas e com os menores valores do gráfico, gerando pequeno crescimento.

#### 4.1.4 Geral

Em suma, comparando-se os três clones de forma geral, pode-se afirmar que todos os meios proporcionaram ganho no PMS durante os 49 dias de experimento, pois os explantes encontravam-se em condições favoráveis de desenvolvimento.

Todavia, foi constatado em um estudo feito por Souza, Gonçalves e Machado Neto (1999), no qual 6 progênies de *Eucalyptus camaldulensis* foram submetidas a estresse hídrico *in vitro* e mesmo assim, aos 20 dias de cultivo apresentaram incremento no PMS.

Vê-se que o clone 61 (Figura 4) e o clone 62 (Figura 5) foram aqueles que demoraram mais para responder aos meios de cultura utilizados, necessitando de um tempo maior para se estabelecerem após sua implantação *in vitro*. Para o clone 61 as curvas de tendência começaram a apresentar uma inclinação mais visível a partir dos 21 dias, exceto para o meio MS. Semelhantemente o clone 62 apresentou essa ascensão entre 14 e 21 dias. Em contrapartida, para o clone 68, a inclinação nas curvas começou a ocorrer mais cedo, entre 7 e 14 dias (Figura 6), não esquecendo também que ele apresentou um comportamento parecido no ganho de matéria seca para os 6 meios de cultura utilizados, quando observamos suas curvas de tendência. O mesmo não ocorreu para os clones restantes.

Lima (2004) verificou que a produção de massa seca, em 21 dias de cultivo, variou em função da concentração de potássio ( $1,37 \leq K \leq 22,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) utilizada no meio de cultura JADS, como também em função dos clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, sendo estes mais eficientes para a utilização de potássio na menor concentração testada.

Talvez o comportamento de crescimento mais uniforme e a maior capacidade de estabelecimento após a implantação do clone 68 possam ser explicados devido aos seus explantes

serem visivelmente mais vigorosos e robustos que os dos clones 62 e 61, sendo esse último o menos vigoroso deles. O vigor se resume em quantidade de reservas presentes nos tecidos da planta, conseqüentemente se essas reservas são altas, darão ao vegetal uma melhor capacidade de estabelecimento no ambiente.

Os meios que demonstraram um maior potencial para o aumento no PMS, levando-se em conta a linha de tendência, ou seja, seus valores estimados em uma projeção, o clone 61 teve o meio Básico, o clone 62 foi o meio M3 e o clone 68 repetiu o meio M3. Contudo em valores reais finais do PMS (49 dias), somente o clone 62 não continua com o mesmo meio, tendo agora, M4 como o mais responsivo.

Generalizando, o meio M3 foi único que não proporcionou um comportamento ruim para todos os clones, pois mesmo para o clone 61, ele está na segunda posição, logo após o meio Básico (Figura 4). Em contrapartida o meio M1 foi aquele com pior desempenho para todos os clones.

## **4.2 Interpretação da Taxa de Crescimento Relativo (TCR) para os clones de teca**

Por meio da secagem da matéria fresca, obteve-se o peso de matéria seca e a partir disso foi calculada a TCR para cada meio de cultura dentro de cada clone estudado.

### **4.2.1 Clone 61**

De maneira geral, observa-se que na comparação dos 6 meios de cultura entre si dentro de cada semana do experimento, separadamente, não existiu uma diferença significativa na TCR proporcionada pelos meios, pois todos receberam a mesma classificação “a” pelo Teste de Tukey a 5% (Figura 7).

Devido ao que foi apresentado no parágrafo anterior, faz-se a seguir a discussão dos resultados estatísticos gerados a partir da autocomparação de cada meio durante as 7 semanas de avaliação (Figura 7).



Neste clone nota-se que para o meio MS, sua TCR diferiu significativamente apenas durante S1 (A), se comparado com as semanas S2, S3, S6 e S7 (B). Contudo, para S4 e S5, houve uma posição mediana (AB). Na autocomparação, o meio Básico apresentou TCR mais alta na S1 e mais baixa em S2, S4 e S7, as posições intermediárias ficaram com S3, S5 e S6.

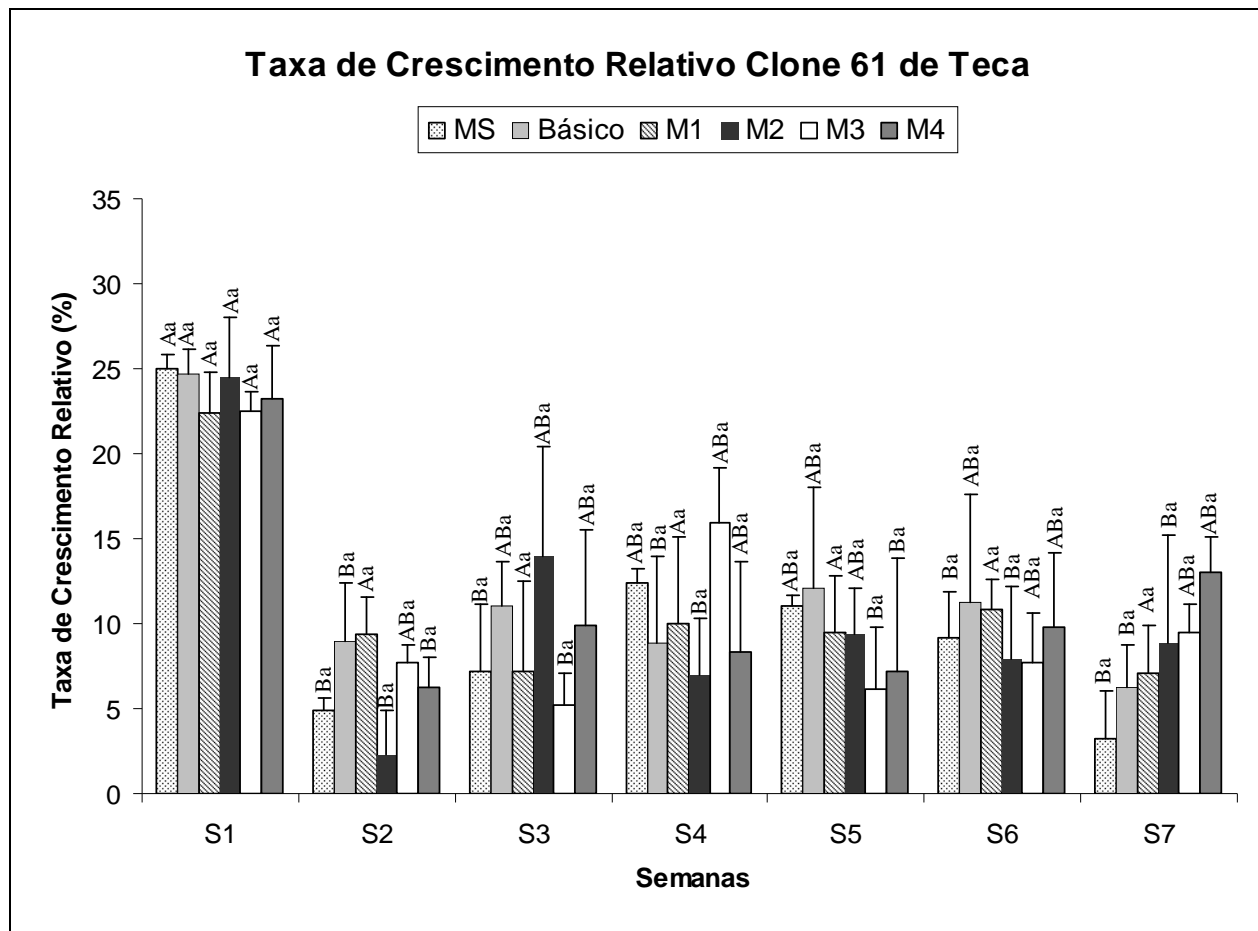


Figura 7 – Clone 61. Médias de 3 repetições para a Taxa de Crescimento Relativo (%) para cada meio de cultura (MS, Básico, M1, M2, M3, M4) em decorrência das 7 semanas do experimento (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7) e barras de erro. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas fazem a autocomparação de cada meio de cultura separadamente, no decorrer das 7 semanas. Letras minúsculas comparam os 6 meios de cultura entre si, dentro de cada semana, ou seja, dentro de cada bloco (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7)

Interessante atentar que para o meio M1 a TCR não diferiu estatisticamente durante as 7 semanas. Talvez isso possa ser explicado devido ao erro ser um pouco alto, pois as amostras utilizadas eram destrutivas, o que ocasiona uma variação grande no comportamento dos explantes. O comportamento de M2 demonstrou uma TCR significativa para S1 em relação a S2, S4, S6 e S7, já S3 e S5 estão uma posição média, correlacionando-se com as demais.

O meio M3 obteve na S1 diferença significativa em relação a S3 e S5, porém quando comparado com S2, S4, S6 e S7, o mesmo não ocorre. Para M4, existiu uma TCR significativa para S1, se comparada com S2 e S5, pois para S3, S4, S6 e S7 não se pode dizer o mesmo.

#### **4.2.2 Clone 62**

De igual modo ao clone 61, neste clone observa-se que na comparação dos 6 meios de cultura entre si dentro de cada semana do experimento, separadamente, não existiu uma diferença significativa na TCR proporcionada pelos meios, pois todos receberam a mesma classificação “a” pelo Teste de Tukey a 5% (Figura 8).

Baseado no que foi apresentado no parágrafo anterior, faz-se a seguir a discussão dos resultados estatísticos gerados a partir da autocomparação de cada meio durante as 7 semanas de avaliação (Figura 8).

Para o meio MS, a TCR intermediária ficou com S4, S5 e S6, não sendo, portanto significativa em comparação com as demais. Já S1 foi maior em relação a S2, S3 e S7. Os meios Básico, M1, M2 e M4 apresentaram o mesmo comportamento visto na TCR do meio M1 do clone 61, onde não diferiram estatisticamente durante as 7 semanas. A TCR do meio M3 mostrou diferença significativa para S1 em relação a S7, as semanas restantes (S2, S3, S4, S5 e S6) ficaram com valores médios.

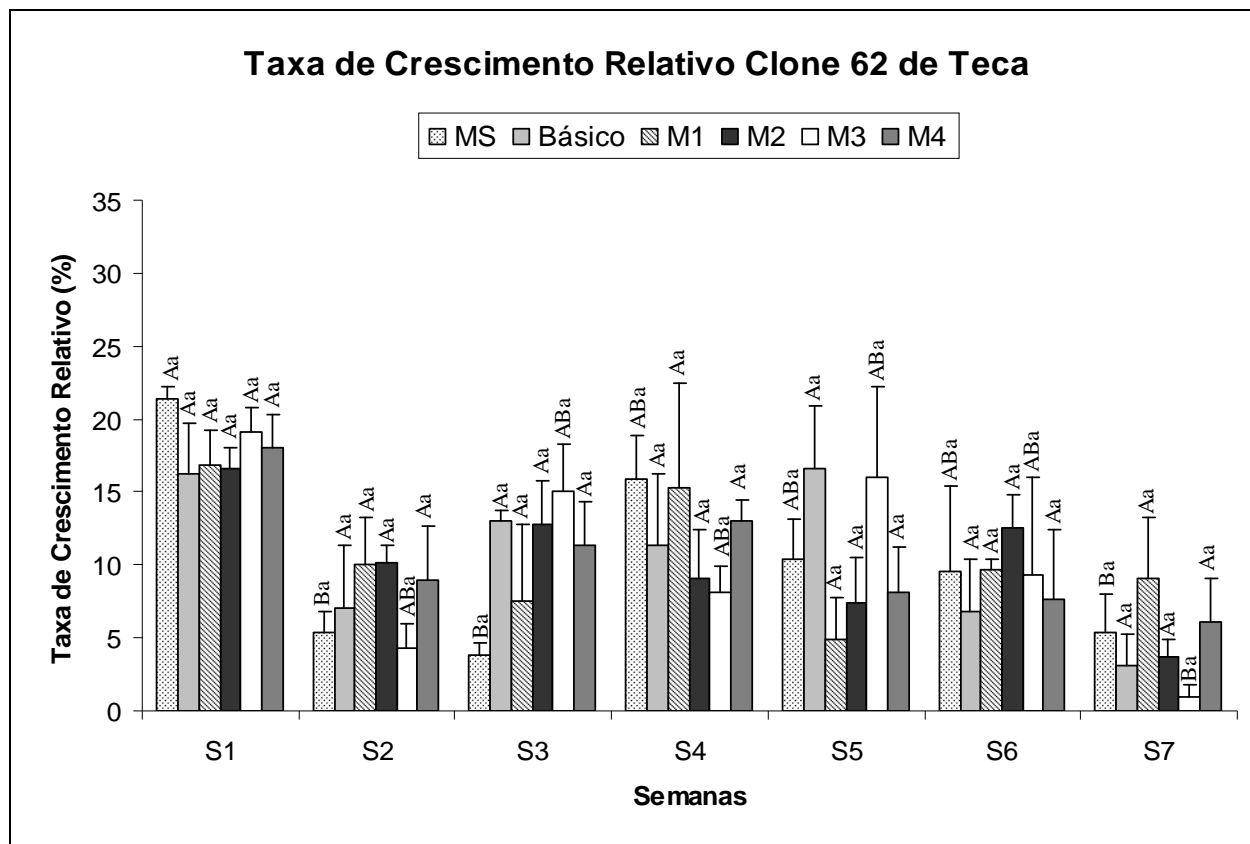


Figura 8 – Clone 62. Médias de 3 repetições para a Taxa de Crescimento Relativo (%) para cada meio de cultura (MS, Básico, M1, M2, M3, M4) em decorrência das 7 semanas do experimento (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7) e barras de erro. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas fazem a autocomparação de cada meio de cultura separadamente, no decorrer das 7 semanas. Letras minúsculas comparam os 6 meios de cultura entre si, dentro de cada semana, ou seja, dentro de cada bloco (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7)

#### 4.2.3 Clone 68

Para este clone observa-se também que na comparação dos 6 meios de cultura entre si dentro de cada semana do experimento, separadamente, não existiu uma diferença significativa na TCR proporcionada pelos meios, pois todos receberam a mesma classificação “a” pelo Teste de Tukey a 5% (Figura 9).

Levando em consideração o que foi apresentado no parágrafo anterior, faz-se a seguir a discussão dos resultados estatísticos gerados a partir da autocomparação de cada meio durante as 7 semanas de avaliação (Figura 9).

A TCR para o meio MS foi significativa na S1 em relação às 6 semanas restantes. Com o meio Básico isto não ocorreu, pois ele diferiu somente entre S1 (A) e S7 (B), as demais semanas (S2, S3, S4, S5 e S6) ficaram com valores estatísticos médios.

O meio M1 obteve significância para a S1 em comparação com S2, S6 e S7, deixando S3, S4 e S5 numa posição intermediária. Com M2 houve também uma TCR maior em S1 quando relacionada com S2, S5, S6 e S7, as semanas S3 e S4 ficaram na média.

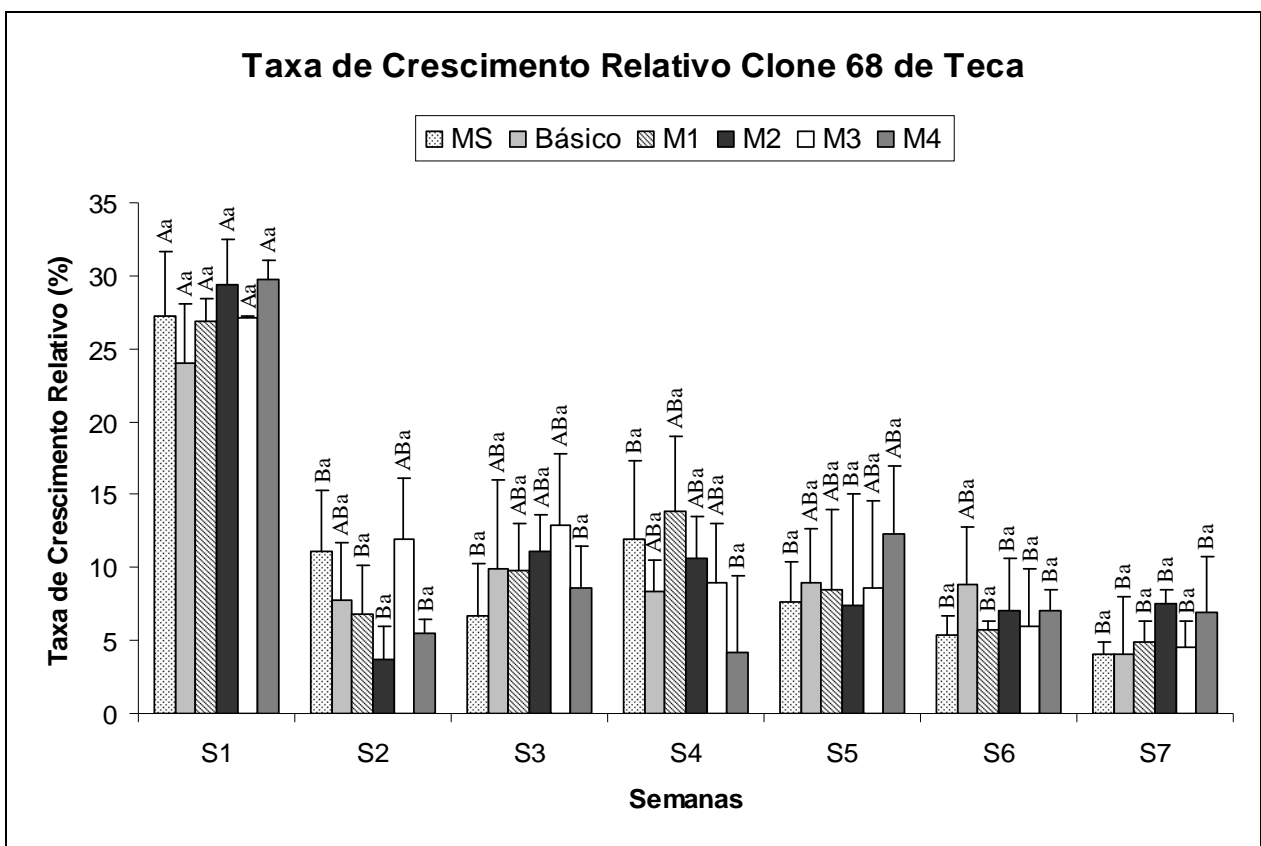


Figura 9 – Clone 68. Médias de 3 repetições para a Taxa de Crescimento Relativo (%) para cada meio de cultura (MS, Básico, M1, M2, M3, M4) em decorrência das 7 semanas do experimento (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7) e barras de erro. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas fazem a autocomparação de cada meio de cultura separadamente, no decorrer das 7 semanas. Letras minúsculas comparam os 6 meios de cultura entre si, dentro de cada semana, ou seja, dentro de cada bloco (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S7)

Para M3, a diferença significativa fica na S1 quando comparada com S6 e S7. As outras semanas (S2, S3, S4 e S5) se correlacionaram estatisticamente com as 3 citadas anteriormente. O

meio M4 mostrou apenas uma semana (S5) com valor intermediário aos demais e a significância, novamente estava na S1 em relação a S2, S3, S4, S6 e S7.

#### 4.2.4 Geral

Resumidamente, em uma visão global dos três clones, observa-se um padrão inicial nas barras de todos os meios de cultura, pois na semana S1 todos os clones demonstraram uma taxa de crescimento maior do que no restante das semanas. Esse fato explica-se devido a S1 ser a semana de estabelecimento dos explantes, portanto é o momento no qual as plantas absorvem mais água e nutrientes do meio de cultura e as médias de TCR são mais elevadas.

Correia (2006) encontrou o mesmo padrão em seu estudo com *Eucalyptus grandis* para meios de cultura suplementados com os nutrientes N, P, K, Ca, Mg e S. As maiores médias das taxas de crescimento relativo foram obtidas entre 0 e 7 dias para todos os nutrientes, o experimento foi conduzido durante os 21 dias.

Levando-se em consideração as 7 semanas, não há um padrão na TCR para nenhum meio de cultura em nenhuma semana ou clone, portanto não foi possível fazer uma nítida distinção do comportamento deles no decorrer do tempo. Isso pode ser explicado, pois existe uma dificuldade na padronização dos explantes e a forma de amostragem é destrutiva. Outro motivo pode ser o tempo de experimento (49 dias), pois, na fase final a TCR tende a se estabilizar. Os meios de cultura não estavam totalmente esgotados em nutrientes e ainda existia espaço para crescimento nos recipientes (Figura 10).



Figura 10 – Clone 62 de teca em meio MS aos 49 dias de cultivo exemplificando sua aparência sadia e o espaço para crescimento, ainda restante no recipiente

Nota-se para todos os clones de teca, que pelo Teste de Tukey não houve diferença significativa na TCR entre os meios de cultura, quando comparados entre si, dentro de cada semana do experimento. Isso deixa claro que nenhuma das composições nutricionais dos meios de cultura foi mais eficiente do que a outra no quesito de oferecer TCR diferenciada.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Faz-se necessário, maiores estudos com meio de cultura para *Tectona grandis*, pois os materiais relacionados a esse assunto são escassos.

Para dar continuidade ao estudo com teca propõe-se abordar outros aspectos como:

- Testar outras composições nutricionais em os meios de cultura;
- A teca apresenta uma dificuldade de formar “tufos” de explantes, como acontece para o eucalipto, a descoberta de uma combinação de fitorreguladores que proporcionassem uma multiplicação lateral nos explantes ou calos de teca dentro do meio de cultura, facilitaria sua micropropagação, pois daí haveria mais explantes por plântula multiplicada.





## 6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos evidenciaram que ocorrem variações no metabolismo entre clones distintos de *Tectona grandis*, mesmo sendo testados sob os mesmos meios de cultura.

- Em relação ao PMS dos clones 61, 62 e 68:

Clone 61: O meio de cultura com a concentração e balanço nutricional mais eficientes foi o Básico, induzindo crescimento diferenciado nas brotações dos explantes.

Clone 62: O meio de cultura com a concentração e balanço nutricional mais eficientes foi o M4, induzindo crescimento diferenciado nas brotações dos explantes. Porém, quando se atenta para sua linha de tendência, M3 foi o mais responsivo.

Clone 68: O meio de cultura com a concentração e balanço nutricional mais eficientes foi o M3, induzindo crescimento diferenciado nas brotações dos explantes.

- Em relação à TCR dos clones 61, 62 e 68:

Pode-se afirmar que não houve um meio de cultura que proporcionasse uma TCR com diferença significativa para nenhum dos 3 clones durante as 7 semanas de avaliação. Os meios de cultura não causaram um padrão comportamental sobre os explantes, pois o mesmo meio em semanas diferentes apresentava uma variação maior ou menor na TCR das plantas.



## REFERÊNCIAS

ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2010 ano base 2009**. Brasília, 2010. 140 p.

BONGA, J.M. Plant propagation through tissue culture, emphasising woody species. In: PLANT CELL CULTURES: RESULTS AND PERSPECTIVE, 1980, Amsterdam, Holland. **Plant Cell Cultures: Results and Perspectives (Developments in plant biology)**... Amsterdam, Holland: Elsevier Science Ltd/North Holland, 1980. p. 235-264.

BONGA, J.M.; ADERKAS, P. von **In vitro culture of trees**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers., 1992. 236 p.

BRAVO, C.D.V. **Controle genético e histogênese na regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis***. 2005. 80p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura e Manejo Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CARDIM, D.C. **Crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro***. 2006. 45 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus spp. in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CORREIA, D. **Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis in vitro***. 2006. 175p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; ESCALONA, M. Mofogénesis in vitro de Teca (*Tectona grandis* L.). **Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales**., Madrid, v. 11, n.1, p. 137-144, 2002.

DINIZ, J.D.N.; GONÇALVES, A.N.; HERNANDEZ, F.F.F.; TORRES, A.C. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa agropecuária brasileira: Fruticultura**, Brasília, v.34, n.7, p. 1201-1209, jul. 1999.

DUPUY, B.; VERHAEGEN, D. Le teck de platation *Tectona grandis* en Cote-d’Ivoire. **Bois et Forests des Tropiques**, Montpellier, n. 235, p. 9-24, 1993.

FAO, 1998. Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/005/AC773E/ac773e02.gif>>. Acesso em: 29 jul. 2011.

GABRIEL, M.V. **Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro***. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura e Manejo Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GOH, D.K.S.; GALIANA, A. Vegetative propagation of teak. **JIRCAS Working Report**, Tsukuba, n. 16, p. 35-44, 2000.

GOH, D.K.S.; MONTEUUIS, O. Vegetative propagation of teak. **ITTO Newsletter**. 2004. Disponível em: <<http://www.itto.int>>. Acesso em: 22 dez. 2009.

HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N. **Omissão dos nutrientes minerais na produção de matéria seca, aspectos nutricionais e bioquímicos em *Eucalyptus grandis* Hill (Ex Maiden) cultivado *in vitro***. 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

HOEKSTRA, P.E. Air layering of slash pine. **Forest Science**, Oxfordshire, n. 3, v. 4, p. 344-349, 1957.

HONG, S.O. Vegetative propagation of plant material for seed orchards with special reference to graft – Incompatibility Problems. **Forestry Communication Bulletin**, London, Britain, HSM. n. 54, p. 38-48, 1975.

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. 242 p.

KADAMBI, K.; DABRAL, S. Air layering in forestry practice. **Indian Forester**, Dehradun, n. 80, p. 721-724, 1954.

KAOSA-ARD, A. **Teak (*Tectona grandis* Linn. f.) nursery techniques, with special reference to Thailand**. Denmark: Danida Forest Seed Center, Nov. 1986. 42p.(Seed leaflet, 4A)

KAOSA-ARD, A.; SUANGTHO, V.; KJAER, E. D. Experience from Tree Improvement of Teak (*Tectona grandis*) in Thailand. **Technical Note Danida Forest Seed Centre**, n. 50, 1998.

KRISHNAPILLAY, B. Silviculture and management of teak plantations. **Unasyuva**, Rome, v. 51, n. 201, p. 14-21, 2000.

LIMA M.L. **Respostas de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a dose de potássio *in vitro***. 2004. 73 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MATRICARDI, W.A.T. **Efeito dos fatores do solo sobre desenvolvimento da teca (*Tectona grandis* Linn. f.) cultivada em Grande Cáceres – Mato Grosso**. 1989. 185 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

- MIRANDA, C.S. de. **Cultura da teca (*Tectona grandis*) e *Gmelina arborea***. 1988. 6 p. Trabalho apresentado à disciplina de Culturas Florestais - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.
- MONTEUUIS, O. Recent advances in mass clonal propagation of teak. In: INTERNATIONAL WORKSHOP OF BIO-REFOR, 1994. Kangar, Malaysia. **Proceedings ...**Tawau, Malaysia: CIRAD-Forêt/Innoprise Corporation Sdn. Bhd. (ICSB), 1994. p. 117-121.
- MONTEUUIS, O.; VALLAURI, D.; POUPARD, C.; HAZARD, L.; YUSOF, Y.; LATIF, W.A.; GARCIA, C.; CHAUVIERE, M. Propagation clonale de tecks matures part bouturage horticole. **Bois et Forêts des Tropiques**, Montpellier, n. 243, p. 25-39, 1995.
- MONTEUUIS, O.; BON, M-C.; GOH, D.K.S. Teak propagation by in vitro culture. **Bois et Forêts des Tropiques**, Montpellier, v. 2, n. 256, p. 43-53, 1998.
- MONTEUUIS, O.; MAÎTRE, H-F. Advances in teak cloning. **ITTO Tropical Forest Update**, v. 3, n. 17, p. 13-15, 2007. Disponível em: <<http://www.itto.int>>. Acesso em: 22 dez. 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen. v. 3, n. 15, p. 473-97, 1962.
- NAUTIYAL, S.; RAWAT, M. S. Macropropagation of Teak (*Tectona Grandis* L. F.). **Indian Forester**, Dehradun. p. 147-151, Feb. 1994.
- SOUZA, G. M.; GONÇALVES, A. N.; MACHADO NETO, N. B. Crescimento in vitro de progênies de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. sob condições de deficiência hídrica **Scientia Agricola**, Piracicaba. v. 56, n. 3, p. 557-562, jul. 1999.
- TERRER, J.C.; TOMAS, D.F. Determination of macronutrients to be included in *in vitro* culture media according to leaf concentrations. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 4, p. 484-488, 2001.
- TEWARI, D.N. **A Monograph on Teak (*T. grandis* Linn f.)**. Dehradun: International Book Distributors, 1992. 479 p.
- THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, p. 105-121, 2009.
- TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.71, p. 109-117, 2006.
- TIWARI, S.K.; TIWARI, K.P.; SIRIL, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 1, p. 1-6, Oct. 2002.

VEIT, L.F. Teca, apreciada desde a antiguidade. **Silvicultura**, São Paulo, v. 12, n. 46, p. 30-32. 1992.

VEIT, L.F. Teca: uma visão geral. **Revista da Madeira**, Curitiba, v. 5, n. 30, p. 24-26, 1996.

VIEIRA, H.V.; MARTINS, E.P.; PEQUENO, P.L.L.; LOCATELLI M. **Aspectos Silviculturais da Teca (*Tectona Grandis* L.) em Rondônia**, 2002. 15 p. (EMBRAPA-CPAF Rondônia, Documentos, 68)

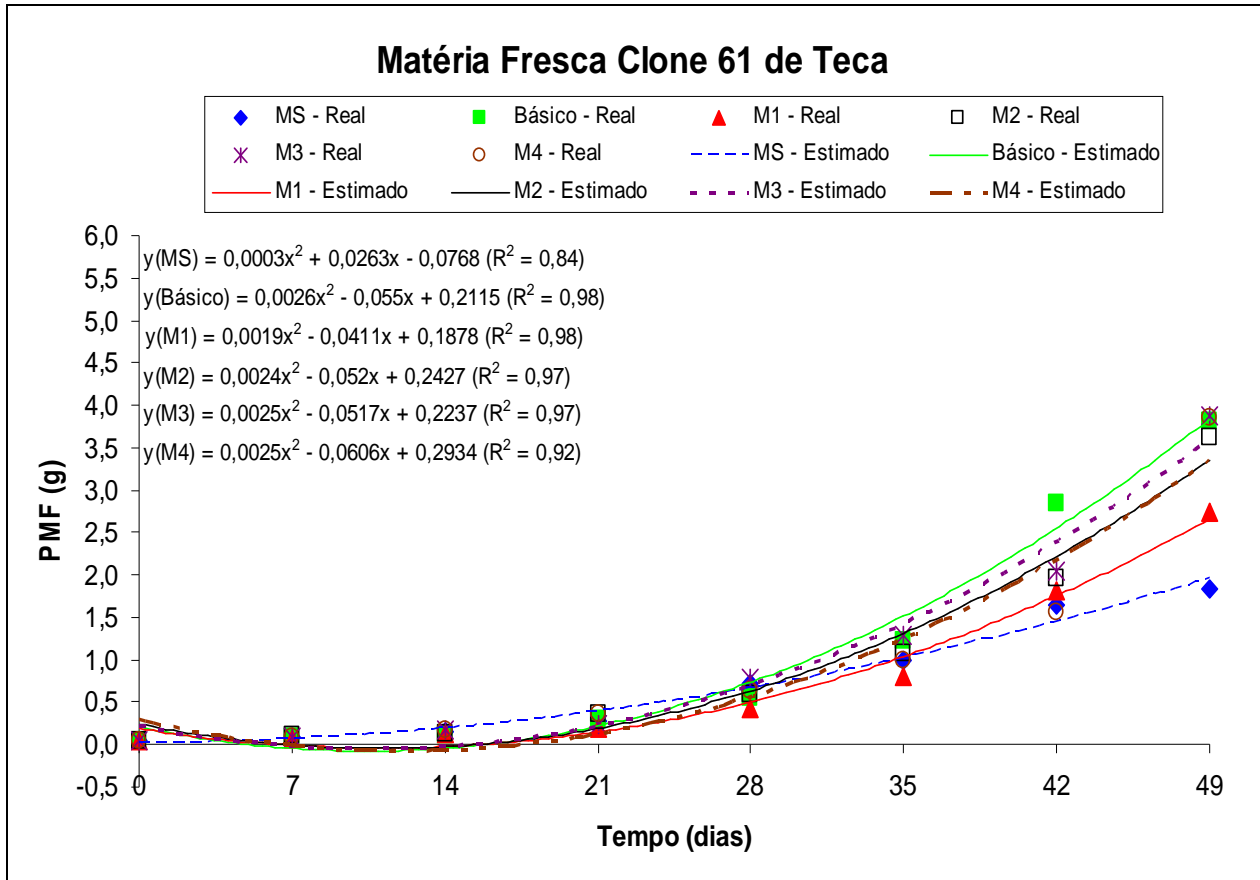
WILLIAMS, R.R. The chemical micro-environment. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 405-439.

**ANEXOS**

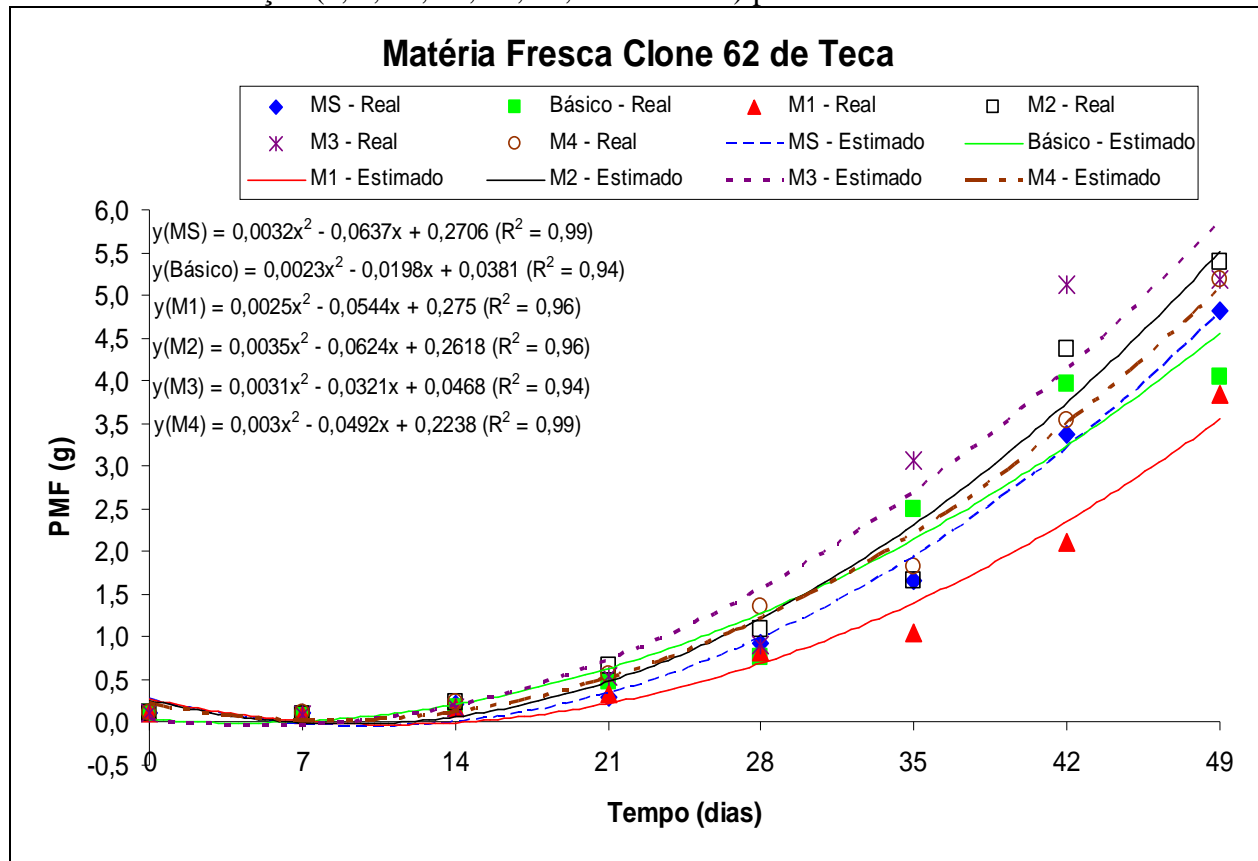




ANEXO A - Valores reais e estimados para o peso de matéria fresca (PMF), em gramas (g), para os meios de cultura MS, Básico, M1, M2, M3 e M4 em função das 8 épocas de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias) para o clone 61 de teca



ANEXO B - Valores reais e estimados para o peso de matéria fresca (PMF), em gramas (g), para os meios de cultura MS, Básico, M1, M2, M3 e M4 em função das 8 épocas de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias) para o clone 62 de teca



ANEXO C - Valores reais e estimados para o peso de matéria fresca (PMF), em gramas (g), para os meios de cultura MS, Básico, M1, M2, M3 e M4 em função das 8 épocas de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias) para o clone 68 de teca

