

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA PINTO



CALOGÊNESE E INDUÇÃO DE GEMAS AXILARES EM MOGNO  
(*Swietenia macrophylla* King)

CURITIBA  
2012

FERNANDA PINTO

CALOGÊNESE E INDUÇÃO DE GEMAS AXILARES EM MOGNO  
(*Swietenia macrophylla* King)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marguerite G.G. Quoirin

Coorientadores: Prof Dr. Henrique Soares Koehler

Dr<sup>a</sup> Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA  
2012



*Aos meus amados pais, Gercino e Neuci,  
pelo amor incondicional e exemplo de vida.*

*Ofereço*

*Ao meu amado marido Braz Junior  
e a minha linda e especial  
filha Maria Fernanda, que sempre  
estiveram comigo até mesmo  
nos momentos mais difíceis  
que colaborando com mais do que  
compreensão, amor e carinho  
durante esta difícil etapa  
de nossas vidas.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-graduação em Agronomia- Produção Vegetal pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, Professora Marguerite, pela orientação e incentivo constantes, e confiança.

Ao professor Henrique, meu coorientador, pelo auxílio estatístico.

À Dr<sup>a</sup> Juliana Degengardt pela coorientação e ensinamentos.

À Embrapa Florestas (Colombo-PR) pelo fornecimento de material vegetal.

À banca de pré-defesa, composta pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Fortes Ribas, Prof. Dr Luis Antonio Biasi, Dr<sup>a</sup> Juliana Degenhardt e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marguerite Quoirin, por todas as sugestões e observações. Sei que todos contribuíram muito para a melhoria deste trabalho.

À banca de defesa, composta pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Damiani Prof. Dr Luis Antonio Biasi, Dr<sup>a</sup> Juliana Degenhardt e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marguerite. A ajuda foi de grande valia.

À minha “maninha” do coração, Yohana de Oliveira por toda a paciência, ensinamentos e amizade constantes. Devo a ela o aprendizado e grande amor pela pesquisa.

Às minhas grandes novas amigas: Mariana, Francine, Magda Fernanda e Hágata. Com elas, os momentos difíceis se tornaram bem mais brandos e alegres.

Aos amigos do laboratório, em especial a Val, Cissa, Mari, Cassi, Carol, Lais, Giovana e Roberson, que fizeram do laboratório minha “casa” fora de casa.

Aos meus braços direitos e grandes amigas Marcelle e Cassiana, não tenho palavras para agradecer toda a ajuda para que esse trabalho fosse concluído.

À Lucimara, nossa secretária da Pós-Graduação, que não poderia estar fora dos agradecimentos. Obrigada port toda a paciência ao responder os e-mails.

Aos meus queridos irmãos, Luis Antonio, Vanessa, Caio e Wiliam, pelas risadas e momentos de descontração.

Aos meus familiares e amigos que mandaram energias positivas e torceram pelo final feliz.

Ao nosso técnico de laboratório, Carlos, que sempre me ajudou nos procedimentos do laboratório.

A todos que de alguma forma ajudaram para que este trabalho fosse realizado e concluído.

E por último, mas não menos especial, a Deus, que sempre esteve ao meu lado, me iluminando, confortando e me ensinando.

**OBRIGADA!**

“Crescer significa mudar e mudar envolve riscos, uma passagem do conhecido para o desconhecido e por isso nos causa tanto medo.”

Patricia Couceiro

“O que sabemos é uma gota,  
e o que ignoramos é um Oceano.”  
Isaac Newton

# CALOGÊNESE E INDUÇÃO DE GEMAS AXILARES EM MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi estabelecer métodos de regeneração de brotações adventícias e axilares *in vitro* de mogno. Segmentos de epicótilos foram inoculados em meio MS com 0,25; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25  $\mu\text{M}$  de TDZ, ambos com 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA, e controle sem regulador. Segmentos foliares foram cultivados em meio MS contendo 0,5; 0,75 ou 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, sob irradiância de 0,73  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (penumbra); 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ, sob irradiância de 0,73 e 37  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e 1,11; 2,22; 4,44 e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP com 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA na penumbra, e em meio controle sem regulador. Para regeneração de brotações adventícias, calos de epicótilos cultivados em meio MS com 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ foram transferidos para o mesmo meio com 1,11; 2,22; 4,44 ou 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP na penumbra e controle sem regulador. Foram avaliadas porcentagem de formação, oxidação, consistência e coloração dos calos e formação de brotações adventícias. Calos de diferentes consistências e colorações foram obtidos. Os calos de epicótilos cultivados na presença de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP eram compactos (76,4%) e, com 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, friáveis (91,5%). Em explantes foliares, os melhores resultados de calogênese foram obtidos com 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ na penumbra, onde 90% dos explantes formaram calos e 77,8% eram friáveis. Com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA, a porcentagem de explantes formando calos foi de 93,3%, todos friáveis. Houve formação de 3,33% de gemas adventícias no meio contendo 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP. Para multiplicação de gemas axilares, foram utilizados segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro*, inoculados em meio MS contendo 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP combinada com várias concentrações de CIN (0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0  $\mu\text{M}$ ) e controle sem regulador. Em outro experimento, foram utilizados meios MS e SH com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,2  $\mu\text{M}$  de 2-iP com diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  (MS: 220, 440 e 880  $\text{mg.L}^{-1}$ , SH: 100, 200 e 400  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e um tratamento sem  $\text{CaCl}_2$ . Foram avaliados número, massa fresca e porcentagem de oxidação dos brotos. No primeiro experimento, nos meios contendo várias concentrações de CIN combinada a BAP, houve intensa oxidação em 90% dos explantes e 10% formaram brotações pouco vigorosas, impossibilitando o subcultivo. No experimento com os meios MS e SH, houve diferenças significativas para o número de brotos, massa fresca das brotações e número de folhas. Sintomas de clorose foliar foram observados nas maiores concentrações de  $\text{CaCl}_2$ . Em conclusão, intensa calogênese foi obtida em ambos os tipos de explantes, na presença de diferentes concentrações de TDZ ou BAP, combinadas ou não com ANA; a regeneração de gemas adventícias foi muito baixa. Houve a formação de calos somente na penumbra. Apesar do elevado número de brotos axilares obtidos nos tratamentos com  $\text{CaCl}_2$ , estes, quando subcultivados em mesmo meio de origem, sofreram intensa oxidação, impossibilitando o subcultivo. Portanto, não foi possível estabelecer um método eficiente de multiplicação de brotações axilares.

Palavras-chave: brotações axilares,  $\text{CaCl}_2$ , clorose, mogno.

# CALLOGENESIS AND AXILLARY SHOOT INDUCTION OF MAHOGANY (*Swietenia macrophylla* King)

## ABSTRACT

The aim of this work was to establish methods of adventitious and axillary shoot regeneration for mahogany. Epicotyl fragments were inoculated in MS medium supplemented with 0, 0.25, 0.5 and 1.0  $\mu\text{M}$  BAP and 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.25  $\mu\text{M}$  TDZ, both along with 0.5  $\mu\text{M}$  NAA and a control without growth regulators. Leaves were cultivated in MS medium with 0, 0.5, 0.75 and 1.0  $\mu\text{M}$  TDZ under an irradiance of 0.73  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 0.75  $\mu\text{M}$  TDZ under an irradiance of 0.73 and 37  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and 0, 1.11, 2.22, 4.44 and 8.88  $\mu\text{M}$  BAP with 0.1  $\mu\text{M}$  NAA under an irradiance of 0.73  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . In order to regenerate adventitious shoots, callus originated from epicotyl explants, initially cultivated in 1.0  $\mu\text{M}$  TDZ, were transferred to medium supplemented with 0, 1.11, 2.22, 4.44 and 8.88  $\mu\text{M}$  BAP. Incidence of callus, its consistency and color, and also the number of adventitious shoots formed were recorded after 30 days of culture. In the experiments of axillary shoot formation, the number of shoots, their weight, levels of oxidation and contamination were evaluated. In all experiments, except in shoot regeneration, statistically significant differences were reached. Different consistencies and colors of callus were reached. Most of the calluses from epicotyl segments cultivated with 1.0  $\mu\text{M}$  BAP were compact (76.4%) and with 1.0  $\mu\text{M}$  TDZ most of them were friable (91.5%). The best results were obtained with 0.75  $\mu\text{M}$  TDZ under low light irradiance, 90% of production of callus, of which 77.8% were friable. With 4.44  $\mu\text{M}$  BAP and 0.1  $\mu\text{M}$  NAA the percentage of friable callus was 93.3%. Two adventitious buds were obtained (3.33%) with 2.22  $\mu\text{M}$  BAP. For induction of axillary shoots, nodal segments from *in vitro* cultivated plants were inoculated in MS medium with 2.5  $\mu\text{M}$  BAP combined with the following concentrations of KIN: 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 and 2.0  $\mu\text{M}$ . In another experiment, MS and SH media were used with 2.5  $\mu\text{M}$  BAP and 2.2  $\mu\text{M}$  2-iP with modification of  $\text{CaCl}_2$  concentrations: 0, 0.5x, 1x and 2x that of normal medium concentrations. In the first experiment with several concentrations of KIN in combination with BAP there was an intense oxidation in 90% of the explants. Only 10% of them produced weak shoots which did not permit any subculture. In the experiment with MS and SH media, when  $\text{CaCl}_2$  was twice the normal concentration, there was a higher number of shoots (6.8 in SH and 7.8 in MS) and higher weight of shoots (1.27g in SH and 1.63g in MS) than in the other concentrations. When shoots were subcultured in the same media they suffered intense oxidation that did not allow their subculture. In conclusion, callogenesis was reached in both kinds of explants in some TDZ or BAP concentrations, combined or not with ANA. Calluses were formed only in the shadow. Leaf chlorosis symptoms were observed in high concentrations of  $\text{CaCl}_2$ . Despite the great number of axillary shoots obtained in  $\text{CaCl}_2$  treatments, when they were subcultured in the same medium they suffered intense oxidation that did not allow their subculture. Thus it was impossible to establish an efficient method of axillary shoot multiplication.

Keywords: axillary shoot,  $\text{CaCl}_2$ , chlorosis, mahogany.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – *Swietenia macrophylla* : a) ASPECTO DE UM INDIVÍDUO ADULTO DE EM AMBIENTE NATURAL, b) ASPECTO DAS FOLHAS DE, c) FRUTOS IMATUROS, d) FRUTOS MADUROS E e) SEMENTES ALADAS RETIRADAS DO FRUTO.....18

FIGURA 2 - ZONAS DE OCORRÊNCIA DO MOGNO NA AMÉRICA DO SUL, Fonte: GROGAN, 2002.....19

FIGURA 3 – CONSISTÊNCIA DOS CALOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILOS DE *S. macrophylla* AOS 30 DIAS DE CULTIVO *in vitro* :a) CALO FRIÁVEL NA PRESENÇA DE 1,0  $\mu\text{M}$  DE TDZ, b) CALO COMPACTO NA PRESENÇA DE 1,0  $\mu\text{M}$  DE BAP; SEGMENTOS FOLIARES: c) CALO COMPACTO OBTIDO NA PRESENÇA DE 0,5  $\mu\text{M}$  DE TDZ, d) CALO FRIÁVEL OBTIDO NA PRESENÇA DE 0,75  $\mu\text{M}$  DE TDZ, e) APRESENTANDO NECROSE EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 0,1; 0,25 OU 1,25  $\mu\text{M}$  DE TDZ, e) CALOS CREME E FRIÁVEIS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES EM MEIO MS ADICIONADO DE 4,44  $\mu\text{M}$  DE BAP E 0,1  $\mu\text{M}$  DE ANA. g) BROTOS ADVENTÍCIOS REGENERADOS A PARTIR DOS CALOS CREME E FRIÁVEIS.....49

FIGURA 4 – ASPECTO DE BROTAÇÕES DE *S. macrophylla* FORMADAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS APÓS 30 DIAS DE CULTIVO *in vitro*. a) CULTIVADO EM MEIO MS COM 440 mg. L<sup>-1</sup> DE CaCl<sub>2</sub>, b) CULTIVADO EM MEIO SH COM 200 mg. L<sup>-1</sup> DE CaCl<sub>2</sub>, c) CULTIVADO EM MEIO MS SEM CaCl<sub>2</sub>, d) CULTIVADO EM MEIO SH SEM CaCl<sub>2</sub>, e) CULTIVADO EM MEIO MS COM 880 mg. L<sup>-1</sup> DE CaCl<sub>2</sub>, f) CULTIVADO EM MEIO SH COM 400 mg. L<sup>-1</sup> DE CaCl<sub>2</sub>. BARRA 1CM.....72

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS DE EPICÓTILOS DE <i>Swietenia macrophylla</i> .....	37
TABELA 2- EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE <i>Swietenia macrophylla</i> .....	38
TABELA 3 – EFEITO DE COMBINAÇÕES DE BAP OU TDZ E ANA NA CALOGÊNESE DE EPICÓTILOS DE <i>Swietenia macrophylla</i> AOS 30 DIAS DE CULTIVO <i>in vitro</i> EM MEIO DE CULTURA MS.....	41
TABELA 4 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE THIDIAZURON (TDZ) NA FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE <i>Swietenia macrophylla</i> APÓS 30 DIAS DE CULTURA <i>in vitro</i> EM MEIO MS.....	43
TABELA 5–EFEITO DE COMBINAÇÕES DE BAP E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE <i>Swietenia macrophylla</i> APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS.....	45
TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES DE CaCl <sub>2</sub> UTILIZADAS PARA A INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES DE <i>Swietenia macrophylla</i> .....	63
TABELA 7 – MÉDIA DE NUMERO DE BROTOS FORMADOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA MS OU SH SUPLEMENTADOS COM 2,5 µM DE BAP E 2,22 µM DE 2-iP E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CaCl <sub>2</sub> .....	67
TABELA 8 – MÉDIA DA MASSA FRESCA DOS BROTOS FORMADOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA MS OU SH SUPLEMENTADOS COM 2,5 µM DE BAP E 2,22 µM DE 2-iP E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CaCl <sub>2</sub> .....	69
TABELA 9 – MÉDIA DO NÚMERO DE FOLHAS DOS BROTOS FORMADOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA MS OU SH SUPLEMENTADOS COM 2,5 µM DE BAP E 2,22 µM DE 2-iP E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CaCl <sub>2</sub> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
B5	Meio de cultura de Gamborg et al (1967)
CA	Carvão ativado
CIN	Cinetina
CV	Coeficiente de variação
JARDS	Meio de cultura de Correira et al (1995)
DAP	Diâmetro da altura do peito
M	molar ou mol.L <sup>-1</sup>
$\mu$ M	micromolar ou $\mu$ mol.L <sup>-1</sup>
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
MS/2	Meio MS com a concentração dos sais reduzida à metade
MT	Murashige e Tucker (1969)
PVP	Polivinilpirrolidona
QL	Meio de cultura de Quoirin e Lepoivre (1977)
SH	Meio de cultura de Schenk e Hildebrandt (1972)
SH/2	Meio SH com a concentração dos sais reduzida à metade
TDZ	Thidiazuron
v/v	Relação volume/volume
ZEA	Zeatina
White	Meio de cultura de White (1943)
WPM	Meio de cultura Woody Plant Medium de Lloyd e Mc Cown (1980)
2-IP	Isopentenil adenina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ESPÉCIE .....	17
2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MOGNO .....	19
2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE MOGNO.....	20
2.4 MICROPROPAGAÇÃO .....	21
2.5 MEIO DE CULTURA E REGULADORES VEGETAIS.....	22
2.6 CALOGÊNESE E DIFERENCIAÇÃO .....	24
2.7 CULTURA DE TECIDOS DE MOGNO.....	24
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>3. CALOGÊNESE E ORGANOGÊNESE INDIRETA A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILOS E FOLHAS DE PLÂNTULAS GERMINADAS in vitro DE <i>Swietenia macrophylla</i> KING .....</b>	<b>32</b>
RESUMO.....	32
ABSTRACT .....	33
3.1 INTRODUÇÃO .....	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.2.1 Material vegetal .....	35
3.2.2 Condições da cultura <i>in vitro</i> .....	36
3.2.3 Efeito do tipo e de combinações de reguladores vegetais na calogênese e organogênese de epicótilos de <i>Swietenia macrophylla</i> King.....	36
3.2.4 Efeito do tipo, das concentrações de reguladores vegetais e da irradiância na calogênese e organogênese de segmentos foliares de <i>Swietenia macrophylla</i> King.....	37
3.2.5 Efeito da concentração de BAP na indução de brotos adventícios em calos de <i>Swietenia macrophylla</i> King .....	38
3.2.6 Delineamento experimental e análise estatística .....	38
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.3.1 Efeito do tipo e de combinações de reguladores vegetais na calogênese e	

organogênese de segmentos de epicótilos de <i>Swietenia macrophylla</i> King ....	39
3.3.2 Efeito do tipo, de concentrações de reguladores vegetais e da irradiância na calogênese e organogênese de segmentos foliares de <i>S. macrophylla</i> .....	42
3.3.3 Efeito da concentração de BAP na indução de brotos adventícios em calos de <i>S. macrophylla</i> .....	47
3.4 CONCLUSÕES .....	51
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>4 INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BROTAÇÕES AXILARES DE <i>Swietenia macrophylla</i> KING A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS.....</b>	<b>57</b>
RESUMO.....	57
ABSTRACT .....	58
4.1 INTRODUÇÃO .....	59
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	61
4.2.1 Material vegetal .....	61
4.2.2 Condições de cultura <i>in vitro</i> .....	62
4.2.3 Efeito de diferentes combinações de cinetina e BAP na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Swietenia macrophylla</i> King.....	62
4.2.4 Efeito de diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Swietenia macrophylla</i> King .....	63
4.2.5 Delineamento experimental e análise estatística .....	64
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Swietenia macrophylla</i> King .....	64
4.3.2 Efeito de diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> e de dois meios de cultura na indução de brotos em segmentos nodais de <i>S. macrophylla</i> King. ....	66
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A madeira do mogno é hoje uma das mais valorizadas internacionalmente, podendo alcançar US\$ 850,00 o metro cúbico, sendo considerada por muitos a mais importante espécie florestal explorada na região amazônica (MIRANDA e MIRANDA, 2000). Entretanto, o Brasil ainda é considerado um país ecologicamente vulnerável. No balanço de 2002, o país mostrou recordes nada invejáveis. Naquele ano foi realizada a maior apreensão de madeiras cortadas ilegalmente em toda a história do Brasil, na sua maior parte mogno, uma das espécies madeireiras mais visadas e ameaçadas (MEDEIROS et al., 2004).

O mogno tem dificuldades de se regenerar após práticas de exploração, que geralmente são seletivas e irracionais, que dizimam diversas árvores adultas, diminuindo assim a disponibilidade de sementes (LOPES, 2000) e acarretando em perdas de recursos genéticos. O governo brasileiro, reconhecendo o risco de extinção de algumas espécies, dentre elas o mogno, decretou em 2000 a Lei nº 3.559, proibindo a exploração e comercialização da madeira da mesma.

A única maneira de evitar sua extinção e o desaparecimento das reservas naturais seria o incentivo ao reflorestamento, mas este tem sido limitado devido aos ataques severos de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae). A clonagem de espécies criticamente ameaçadas tem sido indicada como estratégia de conservação com potencial para implantar reflorestamentos comerciais, dinamizar programas de melhoramento genético e desenvolver técnicas de controle silvicultural (MEDEIROS et al., 2004). No entanto, pesquisadores vêm encontrando diversas dificuldades em estabelecer procedimentos para obter um protocolo eficiente de propagação *in vitro* do mogno, como mostra a escassez de trabalhos publicados nessa linha de pesquisa (COUTO et al., 2004).

A cultura de tecidos pode ser uma alternativa viável como ferramenta para a propagação de espécies de interesse econômico como o mogno, pois por meio desta é possível a obtenção de altas taxas de multiplicação em espaço e tempo reduzido quando comparado as técnicas convencionais de

propagação, pois segundo Albarrán et al. (1997), a aplicação de técnicas de biotecnologia vegetal pode contribuir para a propagação *in vitro* do mogno quando emprega-se a organogênese ou embriogênese somática.

Perante o exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de regeneração indireta de gemas adventícias a partir de epicótilos e folhas, e de indução de gemas axilares a partir de segmentos nodais de plântulas cultivadas *in vitro*, visando à indução de brotações múltiplas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ESPÉCIE

O mogno (*Swietenia macrophylla* King) pertence à família Meliaceae, é uma espécie de grande importância econômica devido à sua madeira, que é durável e muito apreciada para a fabricação de móveis de luxo e artigos de decoração. É uma espécie heliófita de copa dominante atingindo altura de até 70 metros (média 30-40 m) e DAP de até 3,5 m (DAP médio 0,7-1,3 m) (Figura 1a). Possui sapopemas basais e a casca é parda avermelhada escura. As folhas do mogno são compostas, (Figura 1b) e os frutos são grandes e lenhosos, com cerca de 12 a 18 cm de comprimento. As sementes são aladas e a quantidade pode variar entre 45 e 60 (LORENZI, 1996). A germinação é hipógea e criptocotiledonar (ALVARENGA e FLORES, 1988)

A madeira do mogno é considerada moderadamente pesada, variando de 0,55 a 0,70 g.cm<sup>3</sup>. A coloração do cerne varia do castanho avermelhado a castanho escuro. O cheiro é bastante característico, o gosto é amargo, a superfície possui um brilho bastante característico e, geralmente, é lisa ao tato (GASPARETTO, 1998). Devido às características físicas da madeira, o manuseio é fácil e bastante apreciado na fabricação de móveis finos, trabalhos arquitetônicos, ornamentações e na fabricação de instrumentos musicais, principalmente o piano (HOLDRIDGE, 1973).

A área de ocorrência do mogno inicia-se na Península de Yucatán no México (latitude de 23° N), passando pela Costa Atlântica da América Central, até o sul da Amazônia através da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e a porção oriental da Amazônia brasileira (latitude máxima 18° S) (LAMB, 1966; PENNINGTON et al., 1981; COLON, 1994). Sua população no Brasil é superior à de todos esses países combinados, sendo da ordem de 74% da população da espécie (COLON, 1994). Existem três espécies de mogno, *Swietenia macrophylla*, *S. mahogani* e *S. humili*, sendo que *S. macrophylla* tem predominância absoluta na área de ocorrência. Recebe várias denominações como caoba na Espanha, Peru e Porto Rico, mara na Bolívia, mahogany nos países de língua inglesa, aguano ou mogno no Brasil e acajou na França (LAMB, 1966).

No Brasil, a zona de ocorrência natural do mogno é o sul da Amazônia, cobrindo cerca de 1,5 milhão de km<sup>2</sup>. Essa zona estende-se do centro leste do Pará, passando pelo sul do Estado, noroeste do Tocantins, noroeste de Mato Grosso, sudeste do Amazonas até a maior parte de Rondônia e Acre (LAMB, 1966; BARROS, 1992) (Figura 2).

Por possuir substâncias tanantes, no Acre, a casca do mogno é usada, como tintura de roupas e em curtume (DEUS et al., 1993). A árvore também é muito ornamental, podendo ser usada, com sucesso, na arborização de parques e de grandes jardins (LORENZI, 1992). O mogno tem sido utilizado na arborização urbana de Brasília, DF, (WALTER e SALLES, 2000) e de Manaus, AM, (PRANCE e SILVA, 1975).

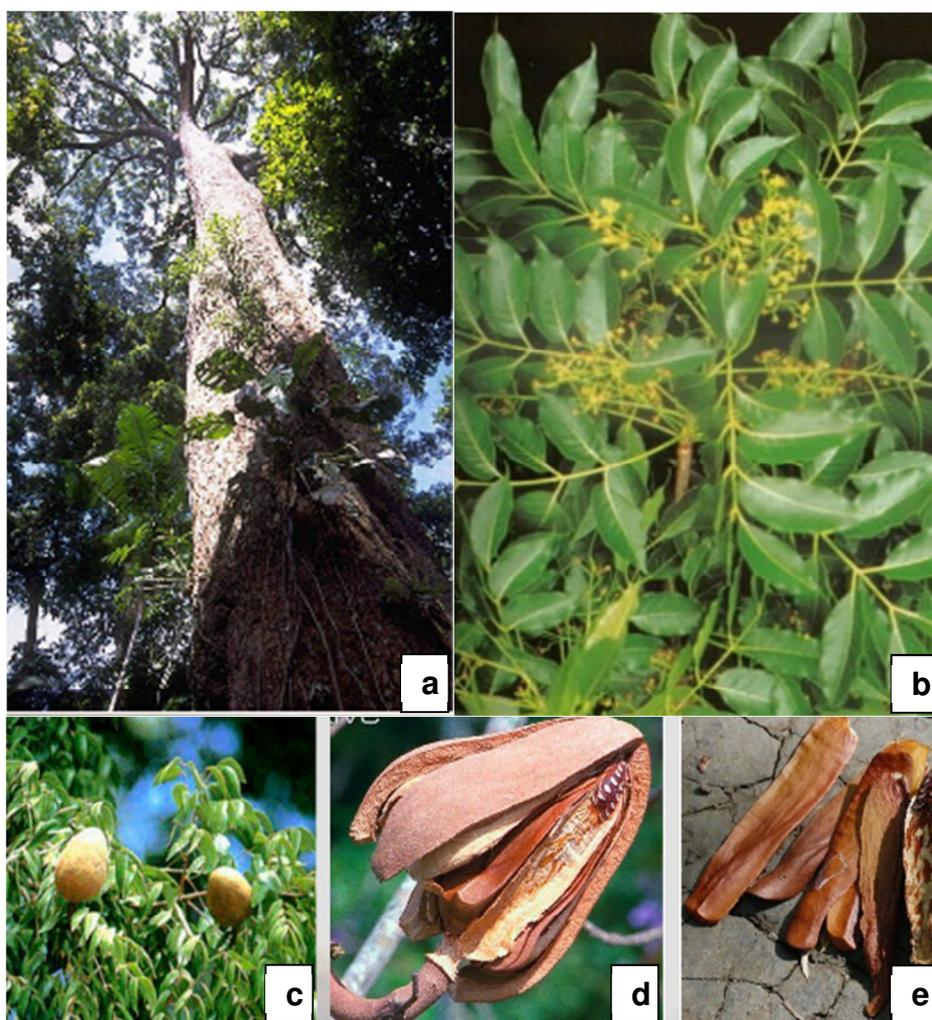


FIGURA 1 – *Swietenia macrophylla*: a) INDIVÍDUO ADULTO EM AMBIENTE NATURAL, b) ASPECTO DAS FOLHAS, c) FRUTOS IMATUROS, d) FRUTOS MADUROS E e) SEMENTES ALADAS RETIRADAS DO FRUTO.



FIGURA 2 - ZONAS DE OCORRÊNCIA DO MOGNO NA AMÉRICA DO SUL.  
Fonte: GROGAN, 2002.

## 2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MOGNO

A germinação das sementes de mogno ocorre rapidamente no sub-bosque, após o início da estação chuvosa (MORRIS et al., 2000). A regeneração natural de mogno ocorre tanto em pastagens abandonadas quanto em Florestas Secundárias (GERHARDT e FREDREKSSON, 1995). Entretanto, pode ocorrer atraso na germinação em ambientes secos, como as clareiras criadas por distúrbios (GROGAN, 2001). No entanto, o conhecimento sobre a taxa e o padrão anual de produção de fruto em árvores e populações de mogno é muito escasso. Estudos realizados no sul do Para evidenciaram que a fecundidade aumenta de acordo com o diâmetro do tronco (GULLISON et al., 1996, SNOOK, 1998). De acordo com estes autores, a taxa de produção de fruto é muito baixa, ou seja, nem toda árvore de grande porte produz fruto abundante e algumas das árvores de porte médio estão entre os indivíduos mais fecundos. Assim, a produção interanual varia largamente no mesmo indivíduo, bem como entre as populações de mogno.

A longevidade da semente é outra questão que deve ser destacada pois

sob uma armazenagem inadequada o poder germinativo a semente diminui ou esta se torna inviável. De acordo com Vianna (1943) a questão da longevidade da semente de mogno já foi objeto de estudo de alguns pesquisadores. Marrero (1943) recomenda o armazenamento das sementes da espécie a baixas temperaturas, para a conservação da viabilidade da semente por mais de 3 meses e até um ano. Vivekanandan (1978) verificou que as sementes perdem rapidamente a viabilidade quando armazenadas à 30°C e recomenda que elas sejam colocadas em sacs plásticos, com temperatura de 15°C, para a conservação da viabilidade por um período bastante longo.

Na germinação de sementes de mogno *in vitro*, encontra-se na literatura divergência quanto à porcentagem de germinação, concentração de hipoclorito de sódio e tempo de exposição ao agente desinfestante.

Kalil Filho et al. (2000) obtiveram até 100% de germinação quando as sementes foram desinfestadas com 1% de hipoclorito de sódio por 5 minutos e inoculadas *in vitro* na ausência de luz. Para Couto et al. (2004), a maior porcentagem de germinação (48%) foi obtida quando as sementes foram desinfestadas em solução de 2,5% de hipoclorito de sódio por um período de 30 minutos, e colocadas em contato com o meio com concavidade voltada para baixo. Já Lameira et al. (2006) concluíram que sementes de mogno tem uma germinação rápida, levando apenas 6 dias para germinar. Esses autores também verificaram que o melhor substrato para a germinação *in vitro* foi a vermiculita, em temperatura de 25 °C e na ausência de luz.

### 2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE MOGNO

Tem-se buscado alternativas para estabelecer metodologias eficientes tanto para a conservação da espécie quanto para a reprodução de germoplasma de qualidade superior. A primeira alternativa foi tentar desenvolver métodos para a propagação vegetativa da espécie. Dentre os métodos de propagação vegetativa recomendados para espécies tropicais para produção de madeira, destaca-se o enraizamento de estacas utilizando reguladores vegetais.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos utilizando essa técnica, porém as taxas de enraizamento foram muito baixas, podendo-se citar Cabral (1986), Miranda e Miranda (2000) e Santos (2002).

#### 2.4 MICROPROPAGAÇÃO

Esta técnica se baseia na proliferação de gemas pré-formadas, reproduzindo *in vitro* um fenômeno natural, levando a um sistema com grande facilidade de controle, além de possibilitar fidelidade genética muito alta. As gemas pré-formadas, pelo fato de possuírem determinação para o crescimento vegetativo, se satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas. De forma geral, este sistema de micropropagação é mais simples que outros dois sistemas, além de a propagação ser relativamente rápida e as plantas resultantes desse processo apresentarem bom crescimento, provavelmente devido ao rejuvenescimento promovido por sucessivos subcultivos do material.

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares constitui-se num sistema de propagação *in vitro*, que compreende as fases de iniciação e estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação e alongamento, enraizamento e a aclimação *ex vitro*. Para as espécies lenhosas, entre os meios de cultura básicos mais utilizados nas diferentes fases da propagação *in vitro* estão o MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), o JADS (CORREIA et al., 1995), o White (WHITE, 1943), o B5 (GAMBORG et al., 1968), o QLP (QUOIRIN E LEPOIVRE, 1977) e o WPM (LLOYD e McCOWN, 1981).

Entre as aplicações da propagação *in vitro* pela micropropagação na área florestal, destacam-se aquelas relacionadas com a: (1) conservação de germoplasma *in vitro*; (2) aceleração dos programas de melhoramento pela multiplicação de clones superiores, visando à produção de mudas, ao rejuvenescimento de clones selecionados e ao potencial de obtenção de sementes sintéticas (embriões somáticos); (3) limpeza clonal, na obtenção de culturas livres de microrganismos patogênicos, visando atender à demanda por um processo de propagação clonal sustentável; (4) possibilidade de patenteamento de processos/ materiais obtidos por meio da biotecnologia; (5)

possibilidade de servirem como base para outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética (PENCHEL et al., 2007; XAVIER et al., 2009).

Em vista da potencialidade da aplicação das técnicas de propagação *in vitro* em espécies florestais, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de tornar esta tecnologia acessível e economicamente viável. No entanto, algumas desvantagens e dificuldades deste processo podem ser enumeradas, como o alto investimento em instalações e treinamento de pessoal, a necessidade de desenvolvimento de protocolos diferenciados para diferentes espécies ou grupos de clones, a recalcitrância das culturas à propagação *in vitro* de espécies lenhosas e os riscos da contaminação acidental das culturas por microrganismos (Xavier et al. 2007). Além desses fatores, devido ao fato de as espécies florestais serem relativamente pouco domesticadas, avanços biotecnológicos relativos à propagação *in vitro* têm sido pouco expressivos, se comparados com outras culturas de expressão agrícola; entretanto, é reconhecido o grande potencial de impacto da utilização desta biotecnologia na silvicultura clonal e na indústria de base florestal (PENCHEL et al., 2007, XAVIER et al., 2009).

## 2. 5 MEIO DE CULTURA E REGULADORES VEGETAIS

Os meios de cultura utilizados na cultura de tecidos possuem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, suprindo as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998). São compostos basicamente por macronutrientes (N, P, Ca, K, Mg e S), micronutrientes (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl e Mo), sacarose como a principal fonte de carbono, reguladores vegetais, vitaminas e compostos orgânicos cuja principal função é servir de fonte de nitrogênio (CALDAS et al., 1998).

Especialmente nos estudos de nutrição, o cultivo *in vitro* é muito apropriado, pois como as plantas são cultivadas em condições assépticas, é possível controlar o fornecimento de nutrientes (MERCIER, 2004). O suplemento de nutrientes no meio de cultura é essencial no sistema *in vitro* (KANASHIRO et al., 2009). Os meios de cultura utilizados, na maioria das

vezes, são baseados em formulações básicas modificadas (KANASHIRO, 2005).

Segundo Naves (2001), a escolha de um meio de cultura ideal e uma concentração de sais e vitaminas adequadas é fundamental para o cultivo *in vitro*, visto que é o meio de cultura que supre as necessidades nutricionais para o crescimento da planta *in vitro*. O balanço entre nitrogênio, fósforo e cálcio é essencial para a morfogênese e para o crescimento das plantas (RAMAGE e WILLIAMS, 2002).

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem o meio de cultura não exercem somente um efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996).

Os hormônios podem ser definidos como substâncias de origem natural (hormônios vegetais) ou sintética (reguladores vegetais), adicionadas ao meio de cultura, com a finalidade de induzir modificações nos padrões de crescimento e desenvolvimento do explante (TERMIGNONI, 2005). Dessa forma, a adição de reguladores ao meio supre prováveis deficiências das quantidades de hormônios nos explantes retirados da planta mãe, induzindo os processos de desdiferenciação e rediferenciação, com consequente formação de tecidos e órgãos.

O crescimento e o padrão de desenvolvimento da maior parte dos cultivos *in vitro* estão diretamente relacionados com a composição do meio e a concentração dos reguladores vegetais presentes no meio (CORDEIRO et al., 2004). A utilização das citocininas é indispensável à divisão celular, superação da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias. As citocininas de ocorrência natural são encontradas como moléculas livres, não ligadas a nenhuma macromolécula. A síntese ocorre nas raízes, em embriões em desenvolvimento e em tecidos de galha da coroa (RODRIGUES e LEITE, 2004). Muitos compostos químicos com atividade citocinínica tem sido sintetizados e testados. A maioria possui uma substituição do N<sup>6</sup> da aminopurina (adenina), como 6-benzilaminopurina e cinetina que são sintéticas e zeatina e isopentenil adenina, citocininas naturais (SANTIAGO et al., 2001).

As auxinas constituem outro grupo de reguladores fundamentais na indução da divisão e diferenciação celular. Atuam na expansão e no alongamento celular (GEORGE, 1996) e possuem maior aplicação na formação de raízes e calos (PASQUAL, 2001).

O tipo e a concentração dessas substâncias influenciam a multiplicação *in vitro*. Tanto para as citocininas quanto para as auxinas, normalmente, a faixa de concentração mais indicada fica entre 0,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> (MORALES et al., 1999). Outros fatores, como tipo, tamanho do explante e meio de cultura também podem influenciar a resposta morfogênica (GASPAR et al., 1996; MOREIRA-DIAS et al., 2001).

## 2.6 CALOGÊNESE E DIFERENCIAÇÃO

Um calo consiste de uma massa desorganizada de células parcialmente diferenciadas que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo e espessura da parede celular. Traqueídeos, células parenquimáticas, tecido cambial e periderme podem ser formados durante a calogênese (NARAYANASWAMY, 1977). Geralmente um calo é formado a partir de explantes de raízes, de folhas ou de caule. Ao utilizar a técnica de cultura de tecidos, a formação de calos pode ser induzida em vários tecidos ou órgãos de plantas que não são usualmente responsáveis pelo desenvolvimento de calos (STREET, 1969).

Skoog e Miller (1957) demonstraram que a formação de dois órgãos *in vitro*, caules e raízes, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina. Meios de cultura contendo um balanço auxina/ citocinina favorável à auxina promoveram a formação de raízes em calo de tabaco (*Nicotiana tabacum*). De modo inverso, balanços hormonais favoráveis à citocinina fizeram com que fossem formadas gemas caulinares. Finalmente, balanços hormonais intermediários não levaram a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e conseqüente crescimento do calo.

## 2.7 CULTURA DE TECIDOS DE MOGNO

Para a obtenção de plantas de mogno mediante processos de

micropropagação, o tipo do explante, a concentração dos reguladores e a eficiência dos procedimentos de assepsia são considerados elementares para o início da cultura de tecidos (LOPES et al., 2003).

O primeiro trabalho de cultura de tecidos em mogno foi descrito por Lee e Rao (1988). Neste, os autores relatam que obtiveram brotações adventícias a partir de segmentos de epicótilo com a utilização de 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP. Um ano mais tarde, para os autores Maruyama et al. (1989) a obtenção de brotações multiplas foi possível com a utilização de segmentos nodais cultivados em meio BTM suplementado com 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP.

Na organogênese de mogno, Valverde-Cerdas et al. (1998), cultivaram segmentos de epicótilo em meio MS com a concentração de sais reduzida pela metade e suplementado com 44,4  $\mu\text{M}$  de BAP e obtiveram uma média de formação de brotações adventícias de 2,6 por calo Rocha e Quoirin (2004) observaram a maior porcentagem (70%) de explantes foliares com calos na presença de 4,7  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA. Já Couto et al. (2006) a obtenção de calos em segmentos de epicótilo foi possível, em alta frequência, em meio contendo a combinação de dois reguladores, 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA, 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,34  $\mu\text{M}$  de ANA ou 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA. Houve diferenças de intensidade, textura e coloração em função do tipo e concentração dos reguladores vegetais utilizados.

Com relação à micropropagação da espécie, Albarrán et al. (1997) indicam que no cultivo *in vitro* de segmentos nodais em meio MS com 50% dos sais, contendo 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP e 11,42  $\mu\text{M}$  de AIA, somente 10% dos explantes desenvolveram gemas axilares. Os reguladores de crescimento utilizados e suas concentrações foram decisivos na obtenção da morfogênese. Segundo esses autores, a aplicação da biotecnologia vegetal pode contribuir com vantagens para a propagação massal de mogno *in vitro*, onde a organogênese e a embriogênese somática têm grande aplicação. Lameira et al. (2005) cultivaram segmentos nodais em meio MS suplementado com 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,37  $\mu\text{M}$  de ANA e obtiveram um número médio de brotos de 2,6 e uma taxa de enraizamento de 85% com a utilização de 21,48  $\mu\text{M}$  de ANA. Schottz et al (2007) que a melhor taxa de multiplicação foi obtida com a utilização de 2,2  $\mu\text{M}$  de 2-iP combinado com 18,51  $\mu\text{M}$  de BAP em meio MS.

## REFERENCIAS

- ALBARRÁN, J.C.; VIELMA, M.; CONTRERAS, I.G.; Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King: estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Florestal Venezolana**, v. 41, p. 111-118, 1997.
- ALVAREGA, S., FLORES, E.M. Morfología de la semilla de caobá, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). **Revista Biología Tropical**, v. 36, p.261-267, 1988.
- BARROS, P. L. C. **Natural and artificial reserves of *Swietenia macrophylla* in the brazilian Amazon – a perspective of conservation**. FCAP, Belém, 56p.,1992.
- CABRAL, I.C. **Estaquia de mogno**. Silvicultural, 41. Ed. Espec. Confresso Florestal Brasileiro, 5. Olinda, 1986.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, v.1, p.87-132, 1998.
- COLON, C. J.F. **An Assessment of Distribution and Status of Big Leaf Mahogany (*S. macrophylla* King)**. Puerto Rican Conservation Foundation and International Institute of Tropical Forestry, 1994.
- CORDEIRO, I. M. C. C., LAMEIRA, O.A.; OHOSHI, 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, p. 118-124, 2004.
- CORREIA D., GONÇALVES A.N., COUTO H.T.Z. do,RIBEIRO M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, v. 48/49, p.107-116, 1995.
- COUTO, J. M. F.,OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E. de P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, p. 633-642, 2004.
- COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E. de P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilos de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6- benzilaminopurina e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.
- DEUS, C. E. de; WEIGAND JUNIOR, R.; KAGEYAMA, P. Y.;VIANA, V. M.; FERRAZ, P. de A.; BORGES, H. B. N.; ALMEIDA, M. C.; SILVEIRA, M.;

VICENTE, C. A. R. **Comportamento de 28 espécies arbóreas tropicais sob diferentes regimes de luz em Rio Branco, Acre**. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 1993. 170 p.

FEARNSIDE, P.M. Desmatamento na Amazônia Brasileira: dinâmica, impacto e controle. **Acta Amazônica**, v. 36, p.395-400, 2006.

GAMBORG O., MILLER R., OJIMA K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research** v. 50, p.148-151, 1968.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 32, p.272-289. 1996.

GASPARETO, O. Síntese da situação domogno, a nível intenacional. Reunião do Grupo de Trabalho sobre o Mogno. **Relatório Informativo**. 01-98. Brasília, 1988, 36p.

GERHARDT, K. FREDREKSSON, D. Biomass allocation by broad-leaf mahogany seedling, *Swietenia macrophylla* King abandonadet pastureand secudary dry forest in Guanacaste, Costa Rica. **Biotropica**, v.27, p.174-182, 1995.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2<sup>d</sup>.England: Exegetics Limited, v.2, 709p, 1996.

GROGAN, J. E. Bigleaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in southeast Pará, Brazil: a life history study with management guidelines for sustained production from natural forests. Yale University School of Forestry & Environmental Studies, New Haven, CT, USA. Tese de Ph.D., 422 pp, 2001.

GULLISON, R. E., S. N. PANFIL, J. J. STROUSE & S. P. HUBBELL. Ecology and management of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in the Chimanes Forest, Beni, **Bolivia**. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.122, p. 9-34, 1996.

HOLDRIDGE, L.G. Ecologia das Meliácias Latinoamericanas. **In: FIRST SYMPOSIUM ON INTEGRATED CONROL OF HYPSPHYLA**, IICA-CTE (CATIE). Turrialba, Costa Rica, 1973, p.7-13.

KAGEYAMA, P.Y.; LEPSCH-CUNHA, N.M. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, I.E.G.; BRAULIO, F.S. (Ed.). **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. 2001.

KALIL FILHO, A.N.; GRAÇA, M.E.C.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. **In: VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS**. FOREST 2000. **Anais...** Porto Seguro, 2000, p.1013.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro***. 187p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - ESALQ, Piracicaba, 2005.

KANASHIRO, S., RIBEIRO, R.C.S., GONÇALVES, A.N., DEMETRIO, V.A., JOCYS, T., TAVARES, A.R. Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith plantlets. **Journal of Plant Nutrition**, v.33, p.867– 877, 2009.

LAMB, F. B. **Mahogany of Tropical America: its Ecology and Management**. Ann Arbor: University of Michigan. 1966. 220 pp.

LAMEIRA, O.A.; LOPES, S. da; NOGUEIRA, R.C.; CORDEIRO, I.M.C.C.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, L.R.S. Efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento sobre a micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla* King) por meio de explantes juvenis. **Cell Culture and Micropropagation**, v.1, p. 53-58, 2005.

LAMEIRA, O.A.; LOPES, S. da; LEÃO, N.VV.M.; CORDEIRO, I.M.C.C; REIS, L.R.S. Efeito de substratos na germinação *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cell Culture and Micropropagation**, v.2, p. 15-19, 2006.

LEE, S.K.; RAO, A.N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* through tissue culture. **Garden Bulletin Singapore**, v.41, p.11-18, 1988.

LOPES, S.C. **Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2000. 53f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Pelotas, 2000

LOPES, S. da C.; LAMEIRA, O.A.; FORTES, G.R.L. Comparação de procedimentos para descontaminação de explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Ciências Agrárias**, n.40, p.63-71, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

LLOYD G., MCCOWN B. Micropropagation of mountain laurel, *Kalsmia latifolia*, by use of shoot tip culture. of **International Plant Propagators's Society**. v.30, p.421-427, 1981.

MARRERO, J. A seed study of some tropical hardwood. **Caribbean Forester**, v.4, p.99, 1943.

MARUYAMA, J.E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. **Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species**. Tokyo: Forest Product Research Institute, 1989.

MEDEIROS, R.; IRVING, M.; GARAY, I. A Proteção da Natureza no Brasil: evolução e conflitos de um modelo em construção. RDE. **Revista de Desenvolvimento Econômico**, n. 9, p. 83-93, 2004.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S.A. p. 217-249, 2004.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.G.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese de internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, p.174-177, 1999.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of *Troyer citrange*. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.

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

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, p. 179-206. 1977.

NAVES, V. C. **Propagação in vitro de bromélia imperial (Ancantarea imperialis (Carrière) Harms)**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2001

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. da. **Árvores de Manaus**. Manaus: INPA, 1975. 312 p.

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

PENCHEL R.M., OTONI W.C., XAVIER A. 2007. **Tecnologia de biorreatores e propagação in vitro**, pp. 75-92. In: A. BORÉM (ed). Biotecnologia Florestal, Viçosa: UFV, 2007.

PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T.; TAYLER, D. A. H. Meliaceae. Flora Neotropica Monograph, v.28, p. 1-472, 1981.

QUORIN M., LEPOIVRE P. Étude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus* sp. **Acta Horticulture**. v.78, p.437-442,1977.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In**

**Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v.38, p.116–124, 2002.

ROCHA, S.C. da; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 14, p. 91-101, 2004.

RODRIGUES, T.J.D.; LEITE, I.C. **Fisiologia Vegetal**. Jaboticabal, Fenep, 2004.78 p.

SANTIAGO, E.J.A. Meios de cultura: cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.3, p. 22-35, 2001.

SANTOS, G. A. **Propagação vegetativa de mogno, cedro-rosa, jequitibá rosa e angico vermelho por miniestaquia**. Viçosa, 2002, 75f. Monografia (Graduação). Universidade Federal de Viçosa.

SCHOTTZ, E. de S., KALLIL FILHO, A.N.; TRACZ, A.L.; KOEKLER, H.; RIBAS, L.L.F.; QUOIRIN, M. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) from juvenile shoots. **Ciência Florestal**, v.17, p.109-117, 2007.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-231, 1957.

SNOOK, L. K. Catastrophic disturbance, logging and the ecology of mahogany (*Swietenia macrophylla* King): grounds for listing a major tropical timber species in Cites. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 122, p. 35-46, 1996.

STREET, H.E. **Growth in organized and inorganized systems. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants**. *In* Plant Physiology, a treatise, v. VB, ed. F.C. Steward. New York: Academic, p.3-224, 1969.

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

UHL, C. e VIEIRA, I.C.G. Ecological impacts of selective logging in the Brazilian Amazon: a case study from the Paragominas regions of the state of Pará. **Biotropica**, v. 21, p.98-106, 1989.

VALVERDE-CERDAS, L.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v.42, p.225-228, 1998.

VIANNA, N.G. Armazenamento de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Silvicultural**, v.28, p539-540, 1983.

VIVEKANAND, K. Retencion of viability of mahogany seed throught cold storage. **The Sri Lanka Forester**, v.13, p.67-68, 1978.

WALTER, B. M. T.; SALLES, P. de A. Flora do Distrito Federal: Meliaceae. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51., 2.000, Brasília. **Resumos**. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 2.000. p. 247.

WHITE, P.R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**. v.30, p.33-36, 1943.

WHITMORE, J. L. *Swietenia macrophylla* and *S. humilis* (caoba, mahogany). In: D. H. Janzen. **Costa Rican Natural History**. University of Chicago Press. Chicago, IL, USA, p. 331-333, 1983.

XAVIER A., OTONI W.C., PENCHEL R.M. **Micropropagação e enxertia in vitro de espécies florestais**, pp. 55-74. In: A. BORÉM (ed). Biotecnologia Florestal. Viçosa: [s.n.]. 2007.

XAVIER A., WENDLING L., SILVA R.L. **Sivicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV p. 272, 2009.

### **3. CALOGÊNESE E ORGANOGÊNESE INDIRETA A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILOS E FOLHAS DE PLÂNTULAS GERMINADAS *in vitro* DE *Swietenia macrophylla* KING**

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de regeneração indireta de brotações adventícias para mogno. Segmentos de epicótilos foram inoculados em meio MS suplementado com 0,25; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25  $\mu\text{M}$  de TDZ, ambos combinados com 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA, assim como em meio controle sem regulador. Os segmentos foliares foram cultivados em meio MS contendo 0,5; 0,75 ou 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, sob irradiância de 0,73  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (penumbra); 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ sob irradiância de 0,73 e 37  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e 1,11; 2,22; 4,44 e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP adicionado de 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA na penumbra, assim como em meio controle sem regulador. Para a regeneração de brotações adventícias, foram utilizados calos formados em explantes de epicótilos cultivados em meio MS adicionado de 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, transferidos para o mesmo meio básico com 1,11; 2,22; 4,44 ou 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP e cultivados na penumbra. O tratamento controle não continha regulador. Após 30 dias de cultivo, calos de diferentes consistências e colorações foram obtidos. Calos formados a partir de epicótilos cultivados na presença de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP eram em sua maioria compactos (76,4%) e, na presença de 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, eram friáveis (91,5%). Em explantes foliares, os melhores resultados foram obtidos na presença de 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ no escuro, onde 90% dos explantes formaram calos e 77,8% destes eram friáveis. Na presença de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA, a porcentagem de explantes formando calos foi de 93,3% e todos eram friáveis. Houve formação de 2 gemas (3,33%) após transferência para meio contendo 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP. Em conclusão, a calogênese foi obtida em ambos os tipos de explante, segmentos foliares e epicótilos, variando conforme a concentração de TDZ ou de BAP, combinadas ou não com ANA. Houve formação de calos somente na penumbra. A organogênese indireta foi muito baixa.

Palavras-chave: ANA, BAP, mogno, TDZ.

### **3. *In vitro* CALLOGENESIS AND INDIRECT ORGANOGENESIS FROM EPICOTYL AND FOLIAR SEGMENTS OF *Swietenia macrophylla* KING PLANTLETS**

#### **ABSTRACT**

The aim of this work was to establish a method for indirect adventitious shoot regeneration. Epicotyl segments were inoculated in MS medium supplemented with 0.25, 0.5 and 1.0  $\mu\text{M}$  BAP and 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.25  $\mu\text{M}$  TDZ, both with 0.5  $\mu\text{M}$  NAA and a control without growth regulators. Leaf segments were cultivated in MS medium with 0, 0.5, 0.75 and 1.0  $\mu\text{M}$  TDZ under an irradiance of 0.73  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , with 0.75  $\mu\text{M}$  TDZ under an irradiance of 0.73 and 37  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; and 0, 1.11, 2.22, 4.44 and 8.88  $\mu\text{M}$  BAP supplemented with 0.1  $\mu\text{M}$  NAA under an irradiance of 0,73  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . In order to regenerate adventitious shoots, calluses originated from epicotyls initially cultivated in 1.0  $\mu\text{M}$  TDZ were transferred into MS medium supplemented with 1.11, 2.22, 4.44 and 8.88  $\mu\text{M}$  BAP or without BAP. Incidence of callus, its consistency and color, and also the number of adventitious shoots formed were recorded after 30 days of culture. Most of the calluses from epicotyl segments cultivated in medium containing 1.0  $\mu\text{M}$  BAP were compact (76.4%) and those on 1.0  $\mu\text{M}$  TDZ mostly friable (91.5%). The best results were obtained with 0.75  $\mu\text{M}$  TDZ under low irradiance: 90% of explants produced callus, of which 77.8% were friable. With 4.44  $\mu\text{M}$  BAP and 0.1  $\mu\text{M}$  ANA the percentage of friable callus was of 93.3%. Two adventitious buds (3.33%) were formed on medium containing 2.22  $\mu\text{M}$  BAP. In conclusion, organogenesis was reached in both explant types in some TDZ or BAP concentrations, combined or not with ANA. Calluses were formed only under the lowest irradiance. Indirect organogenesis was very low.

Keywords: BAP, mahogany, NAA, TDZ.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos é considerada uma das técnicas mais importantes para a propagação de espécies lenhosas e nas últimas décadas vem sendo utilizada com sucesso (LANDA et al., 2000). A organogênese pode ser feita por via direta ou indireta; esta última, pela formação de calos, é considerada de grande potencial para a propagação em massa (PIERIK, 1987; LANDA et al., 2000).

A morfogênese é a consequência da integração entre os processos de divisão e diferenciação celular. Os genes responsáveis pela diferenciação de tecidos e órgãos se localizam nas células somáticas e, sob condições adequadas de cultivo, são expressos (GUERRA et al., 1998). A atividade e expressão morfogenética de certos genes podem seguir diferentes rotas: organogênese, calogênese ou embriogênese somática, sendo o controle da morfogênese realizado por fatores internos, como características genotípicas e condições fisiológicas, e fatores externos, a exemplo dos meios de cultura e reguladores vegetais (TRAN THANH VAN, 1980).

Diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* podem ser encontradas ao se variar a composição nutricional do meio de cultura. No entanto, os componentes mais otimizados em meios de cultura são os reguladores (PERES, 2000), particularmente o balanço entre auxina e citocinina (HANDRO e FLOH, 1990). Meios de cultura contendo um balanço auxina/citocinina favorável à auxina promovem a formação de raízes, enquanto que balanços hormonais favoráveis à citocinina fazem com que se formem gemas adventícias e finalmente, balanços hormonais intermediários não levam a uma diferenciação das células e sim a uma multiplicação delas e em consequência à formação de calos (SKOOG e MILLER, 1957).

Em algumas espécies, a indução de calos é possível apenas com 2,4-D, enquanto outras necessitam da combinação de diferentes reguladores, como AIA, BAP e ANA (NEWMAN et al., 1996). Huetteman e Preece (1993) citam o TDZ como um indutor para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0  $\mu\text{M}$ . WILHELM (1999) indica que concentrações mais altas dessa citocinina proporcionam a produção de calos mais volumosos.

Na organogênese *in vitro*, são vários os fatores que afetam a regeneração, entre os quais: a espécie, a cultivar, os componentes nutricionais do meio de cultura, os reguladores, o ambiente de cultivo e o tipo de explante (RAO et al.,1996). A escolha do explante ideal é, frequentemente, dada pela capacidade deste de se regenerar *in vitro* (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Geralmente, em tecidos jovens a chance de sucesso é maior, pois a sua capacidade organogenética é maior (PERES, 2000).

Na regeneração de plantas lenhosas via calogênese, os explantes mais utilizados são as folhas e entrenós de plantas que se desenvolveram *in vitro* (DE BONDT et al., 1996). Apesar de grandes avanços das técnicas de cultura de tecidos, o estabelecimento de protocolos que estimulem a organogênese e/ou embriogênese em plantas lenhosas é muito limitado, fato que se deve a recalcitrância da maioria dessas espécies, como por exemplo o mogno. Em muitas espécies lenhosas, estas técnicas têm permitido a obtenção de calos, a partir dos quais é possível obter brotações ou induzir respostas morfogênicas e produzir plantas em grande escala.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do tipo de explante, de reguladores vegetais e da intensidade de luz na calogênese e organogênese *in vitro* de *Swietenia macrophylla*.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

### 3.2.1 Material vegetal

As sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) utilizadas foram fornecidas pela Embrapa Florestas e coletadas na cidade de Vilhena,

Rondônia.

As sementes passaram por um pré-tratamento em solução de tiofanato-metílico (2%) por 40 min sob agitação constante. Em câmara de fluxo laminar, foram esterilizadas em etanol 70% com 0,1% de Tween 20<sup>®</sup> por 1 min. Logo após foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 min e finalmente submetidas a três lavagens em água estéril para a remoção de traços das soluções desinfestantes. A semeadura foi realizada em câmara de fluxo laminar e as sementes foram colocadas em frascos de 300 ml contendo 40 ml de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e vedadas com tampas de polipropileno.

Após 30 dias da germinação *in vitro*, retirou-se segmentos de epicótilo e de folhas que foram utilizados nos experimentos descritos abaixo.

### 3.2.2 Condições da cultura *in vitro*

Os explantes foram cultivados em placas de Petri de vidro (20X100 mm) contendo 25 ml de meio de cultura, vedadas com filme plástico de PVC, sendo mantidas em sala climatizada, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e irradiância de  $0,73$  ou  $37 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.3 Efeito do tipo e de combinações de reguladores vegetais na calogênese e organogênese de epicótilos de *Swietenia macrophylla* King

Como explantes foram utilizados segmentos de epicótilos com 0,5 cm de comprimento excisados de plântulas, conforme descrito no item 3.2.1. O meio de cultura básico foi constituído pelos sais, vitaminas e compostos orgânicos do meio MS com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de mio inositol e  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar (Vetec<sup>®</sup>). O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$  por 20 min. Os meios foram acrescidos de diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ), zeatina (ZEA) ou 6-benzilaminopurina (BAP) combinados ou não com ácido naftaleno acético (ANA) conforme indicado na Tabela 1. O PVP

(polivinilpirrolidona) foi testado somente no experimento 2. Todas as culturas foram mantidas sob luz fluorescente do tipo “luz do dia” e irradiância de  $0,73 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (penumbra).

A cada 30 dias foram realizadas avaliações e transferências para novo meio de cultura. Foram avaliadas: porcentagem de sobrevivência, contaminação (fúngica e bacteriana), formação de calos, oxidação total e formação de gemas adventícias, coloração e consistência dos calos (friável ou compacto).

TABELA 1- EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS DE EPICÓTILOS DE *Swietenia macrophylla*

Experimentos	Reguladores vegetais e PVP
1	0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25 $\mu\text{M}$ de TDZ
2	0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25 $\mu\text{M}$ de TDZ + 1 $\text{gL}^{-1}$ de PVP
3	0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25 $\mu\text{M}$ de TDZ+ 0,5 $\mu\text{M}$ de ANA e 0,25; 0,5 e 1,0 $\mu\text{M}$ de BAP + 0,5 $\mu\text{M}$ de ANA
4	0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0, 4,0 e 5,0 $\mu\text{M}$ de ZEA + 0,1 $\mu\text{M}$ de ANA.

### 3.2.4 Efeito do tipo, das concentrações de reguladores vegetais e da irradiância na calogênese e organogênese de segmentos foliares de *Swietenia macrophylla* King

Como explantes foram utilizados segmentos foliares com  $0,25 \text{ cm}^2$  de área, excisados de plântulas germinadas *in vitro*. O meio de cultura básico foi aquele descrito em 3.2.1. Os tratamentos foram constituídos de diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) ou 6-benzilaminopurina (BAP), combinados ou não com ácido naftaleno acético (ANA) e condições de luz conforme descrito na Tabela 2.

TABELA 2- EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE *Swietenia macrophylla* King.

Experimentos	Reguladores vegetais	Irradiância ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )
1	0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25 $\mu\text{M}$ de TDZ	0,73
2	0; 0,5; 0,75 e 1,0 $\mu\text{M}$ de TDZ	0,73
3	0 e 0,75 $\mu\text{M}$ de TDZ	0,73 e 37.
4	0; 1,11; 2,22; 4,44 e 8,88 $\mu\text{M}$ de BAP + 0,1 $\mu\text{M}$ de ANA	0,73

### 3.2.5 Efeito da concentração de BAP na indução de brotos adventícios em calos de *Swietenia macrophylla* King

Calos formados no experimento 3 da Tabela 1 (a partir de calos de epicótilos de consistência friável e coloração creme), com 30 dias de cultivo em meio de cultura inicial contendo 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ + 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA, foram transferidos para meios de regeneração, constituído pelo meio de cultura básico acrescido de diferentes concentrações de BAP ( 1,11; 2,22; 4,44 e 8,88  $\mu\text{M}$ ). O tratamento controle foi constituído pelo meio MS sem adição de reguladores. Foram cultivados sob irradiância de 0,73  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições (placas de Petri) por tratamento e explantes por placa. Os experimentos foram repetidos 3 vezes e a média das repetições foi analisada.

As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e

comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados de porcentagem foram transformados em arcoseno  $\sqrt{x}/100$ . Foi utilizado o programa estatístico Assistat<sup>®</sup> versão 7.6 beta atualizada (SILVA e AZEVEDO, 2002).

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Efeito do tipo e de combinações de reguladores vegetais na calogênese e organogênese de segmentos de epicótilos de *Swietenia macrophylla* King

Nos experimentos 1 (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25  $\mu\text{M}$  de TDZ), 2 (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,25  $\mu\text{M}$  de TDZ com PVP), e 4 (0,5; 1,0; 2,0; 3,0, 4,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  de ZEA + 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA), apesar do uso de antioxidante e a cultura ter sido deixada na penumbra houve necrose total dos explantes. Semelhantemente, em um estudo com pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), nem a ausência de luz nem a utilização de antioxidantes evitaram a oxidação dos explantes (WERNER, 2009). Caso semelhante foi observado por Biasi et al. (1994) que, ao trabalharem com a propagação de abacateiro *in vitro*, relataram que os antioxidantes (ácido ascórbico ou ácido cítrico nas concentrações de 100 e 200  $\text{mg L}^{-1}$ ) não foram eficientes para essa cultura.

Necrose e oxidação dos explantes costumam ser relatadas como um dos aspectos mais importantes relacionados com a cultura de tecidos de algumas espécies de plantas, em especial as espécies lenhosas

No experimento 3, para todas as variáveis analisadas, houve diferença estatística significativa entre os tratamentos aplicados (Anexos 2 a 4). Quando foi combinada a auxina com as diferentes concentrações de citocininas, não foi observado o aparecimento de necrose ou oxidação dos explantes. Os tratamentos mais eficientes para a formação de calos foram: 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,25; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ com 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Calos formados na presença de TDZ e de BAP eram diferentes na cor, textura e consistência. Quando eram provenientes dos tratamentos com BAP,

eram em sua maioria compactos e de coloração verde e, visualmente, tinham aspecto vítreo (Figura 3a e Tabela 3). Já os calos dos tratamentos com TDZ eram de coloração creme e às vezes marrom, extremamente friáveis e ao observá-los em microscópio estereoscópico, continham estruturas globulares (Figura 3b e Tabela 3).

Nesse experimento, aos 30 dias, embora o tipo de regulador tenha influenciado a coloração e a consistência dos calos, não foi observada a formação de brotos adventícios. Calos verdes foram obtidos em todas as concentrações de BAP e as percentagens não apresentaram diferenças significativas entre si. Embora as concentrações de 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00  $\mu\text{M}$  de TDZ não tenham apresentado diferenças significativas com relação à formação de calos creme, na concentração de 1,00  $\mu\text{M}$  de TDZ os calos formados foram mais volumosos quando comparados aos calos formados nas demais concentrações (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram obtidos por Alves et al. (2004), testando a regeneração *in vitro* por organogênese a partir de explante caulinar de três clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Esses autores obtiveram melhores resultados de calogênese nos tratamentos com a combinação de TDZ e ANA nas concentrações de 2,27 $\mu\text{M}$  e 0,54  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Os explantes do tratamento controle não apresentaram nem oxidação nem a formação de calos e, por esse motivo, os dados correspondentes não foram adicionados na análise estatística.

TABELA 3 – EFEITO DE COMBINAÇÕES DE BAP OU TDZ E ANA NA CALOGÊNESE DE EPICÓTILOS DE *Swietenia macrophylla* AOS 30 DIAS DE CULTIVO *in vitro* EM MEIO MS SOB IRRADIANCIA DE 0,73  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Concentração de BAP ou TDZ ( $\mu\text{M}$ ) + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA	Explantes com calos (%)	Calos verdes e compactos (% dos calos)	Calos creme e friáveis (% dos calos)
0,25 BAP	33,3 c	73,3 a	26,7 c*
0,50 BAP	85,0 ab	74,5 a	25,5 c
1,00 BAP	91,6 a	76,4 a	23,6 c
0,10 TDZ	60,0 bc	22,7 b	77,3 ab
0,25 TDZ	85,0 ab	21,7 b	78,3 ab
0,50 TDZ	90,0 a	29,6 b	70,4 ab
1,00 TDZ	98,3 a	6,8 c	91,5 a
1,25 TDZ	26,7 c	16,7 b	83,3 a
<b>Média Geral</b>	6,89	2,83	4,10
<b>CV (%)</b>	18,27	41,51	29,63

\*Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= Coeficiente de variação

Calos friáveis e de coloração creme como os obtidos no presente trabalho podem ser considerados organogênicos e, de maneira geral, podem ser identificados pela coloração. Segundo Ipekci e Gozukirmizi (2005) e Arunyanart e Chaitrayagun (2005), as porções translúcido-brancas ou amareladas dos calos são consideradas friáveis e com potencial para se converterem em órgãos ou embriões.

Cerqueira et al. (2002) observaram que a coloração e a consistência de calos de erva-de-touro (*Tridax procumbens*) cultivados *in vitro*, dependeram tanto da concentração como do tipo do regulador utilizado no meio de cultura, sendo que a cor verde foi a predominante e está relacionada com os reguladores BAP e ANA. Resultado similar foi obtido no presente trabalho onde, em todas as concentrações de BAP utilizadas em combinação com ANA, a coloração verde foi predominante.

Couto et al. (2006) utilizaram a mesma espécie e o mesmo tipo de

explante utilizado no atual estudo e relataram que as combinações de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,34  $\mu\text{M}$  de ANA, 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,37  $\mu\text{M}$  de ANA provocaram formação de calos friáveis somente nas extremidades dos epicótilos. Almeida (2002) realizou um trabalho para definir protocolos de regeneração de plantas para as laranjas 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e limão 'Cravo' (*Citrus limona* L. Osbeck), utilizando segmentos de epicótilo cultivados em meio MT. Esse autor obteve melhores resultados na organogênese utilizando 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP para laranjas e 2,22 – 5,55  $\mu\text{M}$  de BAP para limão 'Cravo'. Apesar de no presente trabalho ter se usado concentrações bastante semelhantes de BAP, a regeneração de gemas adventícias não foi atingida.

### 3.3.2 Efeito do tipo, de concentrações de reguladores vegetais e da irradiância na calogênese e organogênese de segmentos foliares de *S. macrophylla*

No experimento 1, nas concentrações intermediárias de TDZ (0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$ ), houve formação de calos de coloração verde e creme e de consistência compacta ou friável (dados não mostrados). Nas culturas onde foram utilizados 0,1; 0,25 e 1,25  $\mu\text{M}$  de TDZ (dados não mostrados) ocorreu necrose dos tecidos (Figura 3e), em 95 a 100% dos explantes, refletindo numa resposta menos favorável com relação à formação de calos. Esses resultados foram a base para a instalação do experimento 2 onde foi incluída a concentração de 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ. No caso do guaranazeiro, mesmo com a utilização de antioxidantes no meio de cultura, a oxidação foi um dos entraves constantes no estabelecimento e na manutenção dos experimentos (ANGELO et al., 2010). Esses resultados são compatíveis com aqueles descritos por Da Silva et al. (2008), para laranja-azedada, nos quais a utilização de TDZ na ausência de luz provocou a morte dos explantes. No tratamento controle, não houve nem a formação de calos nem a necrose; os explantes permaneceram verdes ao longo de 4 meses e depois desse período foram descartados.

No experimento 2, para todas as variáveis analisadas, observou-se diferenças estatísticas (Tabela 4, Anexos 5 a 8). A concentração de TDZ na qual houve a maior produção de calos (90%) foi de 0,75  $\mu\text{M}$ . Desses calos 77,8% apresentaram coloração creme e consistência friável. Na concentração

de 0,5  $\mu\text{M}$  de TDZ, 50% dos explantes formaram calos e destes, 60% eram de coloração verde e de consistência compacta (Figura 3c). Com 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, ocorreu um decréscimo na formação de calos (31,7%) uma vez que a maioria dos explantes oxidou. Porém, ao contrário do que ocorreu na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de TDZ, a formação de calos friáveis e creme foi superior (68,4%) à formação de calos compactos e verdes (42,1%) (Figura 3d). Essa variação de cores também foi observada por Landa et al. (2000) em pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb) e por Kielse et al. (2007) em angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*).

TABELA 4 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE THIDIAZURON (TDZ) NA FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE *Swietenia macrophylla* APÓS 30 DIAS DE CULTURA *in vitro* EM MEIO MS SOB IRRADIANCIA DE 0,73  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Concentração de TDZ ( $\mu\text{M}$ )	Explantes com calos (%)	% de calos verdes e compactos	% de calos creme e friáveis	% de necrosados explantes
0,50	50 b	60,0 a	40,0 b	15,0 b*
0,75	90,0 a	22,2 b	77,8 a	6,70 b
1,00	31,7 b	42,1 a	68,4 b	68,4 a
<b>Média geral</b>	<b>5,72</b>	<b>2,11</b>	<b>3,72</b>	<b>2,61</b>
<b>CV (%)</b>	<b>23,37</b>	<b>37,36</b>	<b>39,74</b>	<b>61,09</b>

\*Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= Coeficiente de variação

Em segmentos foliares de duas meliáceas exóticas, *Khaya nyasica* e *Toona ciliata*, a maior taxa de calogênese foi obtida com as concentrações de 0,45  $\mu\text{M}$  (37,5% e 67%) e 1,14  $\mu\text{M}$  (44,5% e 67%), de TDZ (Daquinta et al., 2003). Apesar dos autores terem utilizado concentrações bastante semelhantes às desse estudo, os resultados obtidos por eles foram inferiores aos do presente ensaio, onde se utilizou 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ e a taxa de calogênese obtida foi de 90%. No entanto, os autores não relataram nem a coloração nem a consistência dos calos obtidos.

No presente trabalho, não houve a diferenciação dos calos em gemas adventícias, confirmando as observações de Huetteman e Preece (1993) de que o aumento na concentração de TDZ tende a estimular a formação de calos

à custa do crescimento de brotos axilares e adventícios. Para esses últimos e de acordo com Laszloffy et al. (1992), a presença de altas concentrações de citocininas no meio induz a excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas. No caso do presente trabalho, apesar de não terem sido adicionadas concentrações consideradas elevadas por muitos autores, uma hipótese a ser considerada, é de que a concentração de regulador vegetal requerida para a formação de calos em explantes foliares de mogno seja menor pois, possivelmente, a concentração endógena de hormônio é elevada.

Os resultados do experimento 2, constituíram a base para o experimento 3 em que os explantes foram submetidos a duas irradiâncias distintas, 0,73 e 37  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . No experimento 3, os resultados foram semelhantes aos encontrados no experimento 2, na concentração de 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ e 93,3% de explantes formaram calos sob irradiância de 0,73  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (dados não mostrados). Sabe-se que a luz influi na regulação da morfogênese e atua como fonte de energia para a realização da fotossíntese (HARTMANN e KESTER, 1990). Tanto a formação da parte aérea quanto da raiz é influenciada pelo regime de luz (durante os períodos luminosos ou fotoperíodo) a que os explantes são expostos. No entanto, ao expor os explantes à irradiâncias distintas, essa diferença de luminosidade teve influência somente na formação de calos.

Castro et al. (2009) relatam que folhas são os melhores explantes para a indução de calos em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e que os melhores resultados foram obtidos na ausência de luz. Porém, Werner et al. (2009) não verificaram diferenças significativas na porcentagem de formação de calos em folíolos jovens e juvenis de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) cultivados na luz e no escuro.

No experimento 4, após 30 dias de cultivo, observou-se diferenças significativas entre os tratamentos, havendo uma alta taxa (93,3%) de formação de calos no tratamento com 4,44 de  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA (Anexos 9 e 10, Tabela 5). Em moreira (*Maclura tinctoria*), espécie nativa que apresenta dificuldades de propagação sexuada, Gomes (1999) observou um efeito positivo da combinação entre auxinas e citocininas na indução de calos em segmentos foliares.

TABELA 5 – EFEITO DE COMBINAÇÕES DE BAP E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE *Swietenia macrophylla* APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS SOB IRRADIANCIA DE  $0,73 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

CONCENTRAÇÃO DE BAP ( $\mu\text{M}$ ) + 0,1 $\mu\text{M}$ ANA	FORMAÇÃO DE CALOS (%)	NECROSE (%)
1,11	16,7 c	65,0 a*
2,22	60,0 b	40,0 a
4,44	93,3 a	6,70 b
8,88	28,3 c	71,7 a
<b>Média geral</b>	<b>4,96</b>	<b>4,62</b>
<b>CV (%)</b>	<b>26,10</b>	<b>44,96</b>

\* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= Coeficiente de variação

O tratamento controle não foi incluído na análise estatística, pois não ocorreu a formação de calos, tampouco oxidação ou necrose dos explantes. No tratamento com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA, os calos formados a partir de folhas cobriam cerca de 75% dos segmentos foliares (Figura 3f). Diferentemente dos calos formados a partir de segmentos de epicótilos, que tinham diferenças de coloração e consistência, em segmentos foliares houve somente a formação de calos creme, friável e granular. Os parâmetros coloração e textura de calos têm sido utilizados como indicativos da capacidade regenerativa do material vegetal (RODRIGUES et al., 2009). Calos de consistência semelhante foram obtidos por Figueiredo (2007), em folhas de *Passiflora gibertii*, onde observou que calos de coloração clara e consistência granular possuíam maior potencial organogenético.

O efeito positivo da combinação entre ANA e BAP na formação de calos também foi observado por Landa et al. (2000), os quais induziram calogênese em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) utilizando 10,74  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, obtendo aproximadamente 91% de explantes com calos. Apesar da porcentagem de formação de calos se assemelhar bastante com as obtidas em mogno (93%), com a mesma concentração de BAP, o presente estudo utilizou uma concentração de ANA bem inferior, apenas 0,1  $\mu\text{M}$ , mostrando que para mogno, possivelmente os

níveis endógenos de hormônios devem ser um pouco mais elevados.

Na cultura de explantes foliares de mogno, ainda não foi possível a formação de brotos adventícios. Outros trabalhos indicam a formação de calos, como, por exemplo, o de Venkateswaran et al. (1988) que, além de pedaços de folhas, cultivaram tecido cotiledonar em meio MS modificado e acrescido de 9,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA e também observaram a formação de calos. Albarrán et al. (1997) obtiveram a maior formação de calos em segmentos foliares de mogno cultivados em meio MS com a concentração de sais reduzida pela metade e combinando 0,09  $\mu\text{M}$  de TDZ e 22,6  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

Rocha e Quoirin (2004) relataram que a maior porcentagem (70%) de explantes foliares com calos foi observada quando esses explantes foram cultivados em meio MS contendo  $\frac{3}{4}$  da concentração de sais original e suplementado com 4,7  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA. No trabalho desses autores, os explantes foram folhas de plantas mantidas em casa de vegetação com idade variando entre 30 e 210 dias. No atual trabalho com mogno, foram utilizadas somente folhas de plântulas oriundas de germinação *in vitro* e com idade de até 45 dias. Essa diferença de idade dos explantes pode ter afetado as respostas organogênicas, pois os autores relatam que explantes com 210 dias de idade desenvolveram raízes adventícias após 60 dias de cultivo *in vitro* na presença de 2,3  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA. Os explantes com 60 dias de idade cultivados por 30 dias em meio contendo 4,7 ou 9,3  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,11 ou 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA também formaram raízes.

Em outros trabalhos com espécies da família Meliaceae, como *Naregamia alata*, a organogênese foi direta a partir de segmentos foliares cultivados em meio MS suplementado com 4,9  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,8  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub> (SHAJI et al., 1997). Também em explantes foliares, brotos adventícios se desenvolveram quando os explantes foram cultivados em meio MS contendo 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,57  $\mu\text{M}$  de AIA (SALVI et al., 2001).

Em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), Nogueira et al. (2007) observaram que a maior formação de calos ocorreu no meio MS acrescido de 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e que, ao testar a sua interação com BAP e TDZ, não houve um incremento na calogênese. Já Rodrigues et al. (2009) obtiveram a maior formação de calos em explantes cotiledonares de nim (*Azadirachta indica*) em meio WPM adicionado de 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 9,04  $\mu\text{M}$

de 2,4-D.

Alves (2010) relatou a formação de calos friáveis em pecíolos, folhas e estípulas de embaúba (*Cecropia glaziovii*) em meio contendo 22,6  $\mu\text{M}$  de 2,4-D combinado com 4,44 ou 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP. O mesmo autor observou que os calos originados dos pecíolos eram de coloração amarela clara.

### 3.3.3 Efeito da concentração de BAP na indução de brotos adventícios em calos de *S. macrophylla*

Após 30 dias de cultivo, no meio MS contendo 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP foi observada a formação de 2 gemas adventícias a partir de 2 explantes entre 60 (3,33 %) (Figura 3g), o que sugere um campo com potencial para futuras investigações.

Diferentemente, Lee e Rao (1988) relatam a regeneração de brotos adventícios de mogno a partir de calos friáveis oriundos de segmentos nodais. Os explantes foram cultivados em meio MS com a concentração de sais reduzida à metade e a concentração de nitrato de amônia modificada para 2  $\text{g.L}^{-1}$ , e adicionando 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP. Essa concentração de BAP também foi utilizada neste trabalho para a regeneração de brotações adventícias, no entanto não houve diferenciação de gemas a partir dos calos. Acredita-se que o balanço hormonal adequado não tenha sido alcançado ou que a idade ou até mesmo o genótipo dos explantes tenha influenciado a resposta.

Êxito na regeneração de brotos adventícios de mogno foi relatado por Valverde-Cerdas et al. (1998), que obtiveram essa regeneração a partir de epicótilos cultivados em meio MS suplementado com 44,4  $\mu\text{M}$  de BAP, no qual, dos 15 explantes inoculados, 8 responderam positivamente. Alves (2010) obteve a regeneração de calos friáveis de embaúba (*Cecropia glaziovii*) cultivando os explantes em meio contendo somente 0,46  $\mu\text{M}$  de zeatina ou esta concentração combinada com 4,52 ou 22,6  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

Lane e McDougald (1982) ressaltaram que a quantidade de BAP requerida é diferente para cada cultivar e que a BAP fornecida de maneira exógena está diretamente ligada com a quantidade endógena de citocinina que

cada cultivar possui. Vale salientar que o presente estudo utilizou como fonte de material vegetal plântulas de sementes germinadas *in vitro*, cuja variabilidade genética e qualidade podem ter sido uns dos muitos fatores que afetaram a falta de brotações adventícias.

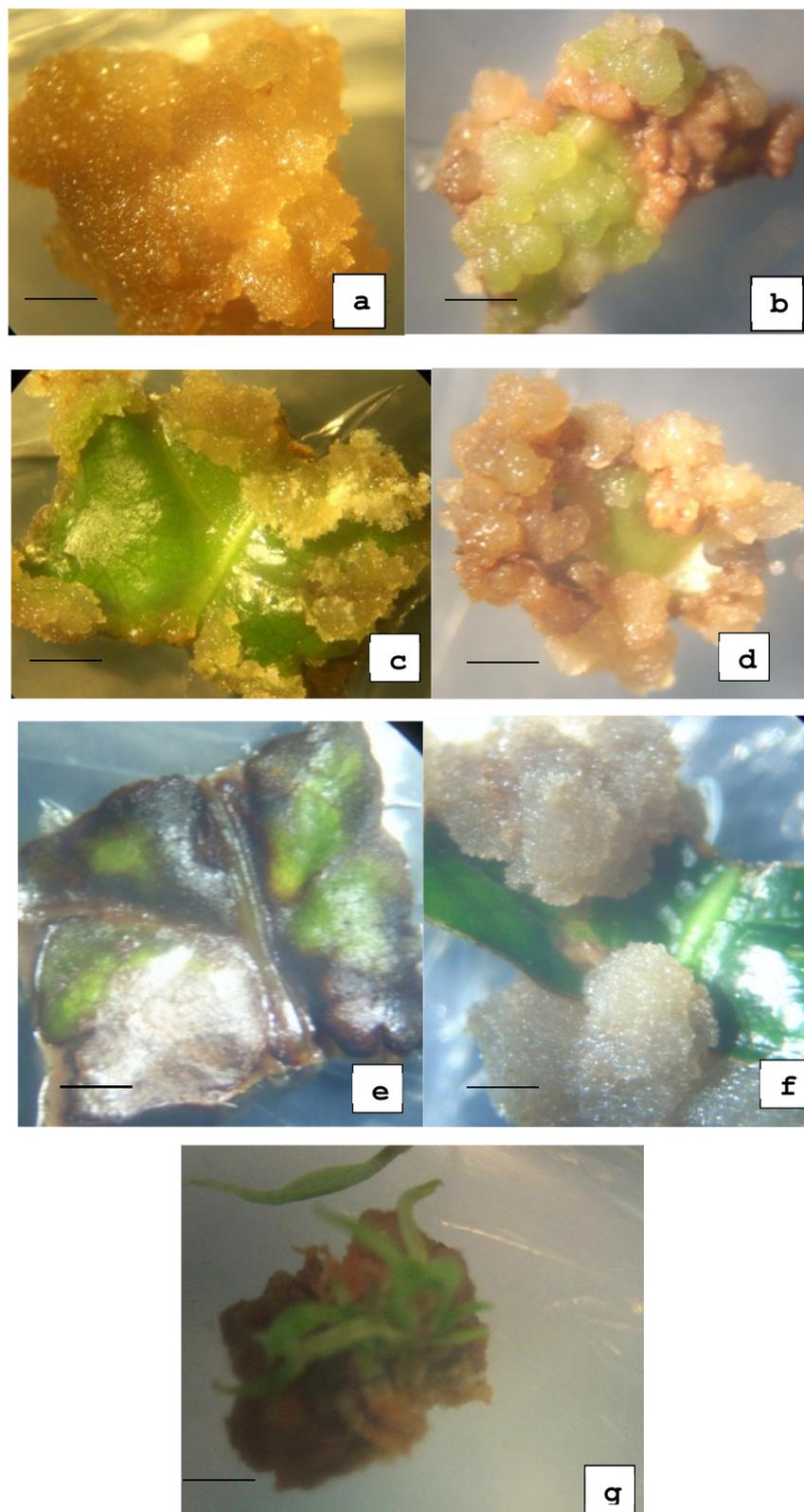


FIGURA 3 – ASPECTO DOS CALOS OBTIDOS A PARTIR DE EXPLANTES DE *Swietenia macrophylla* AOS 30 DIAS DE CULTIVO *in vitro*. SEGMENTOS DE EPICÓTILOS: a) CALO FRIÁVEL NA PRESENÇA DE 1,0 μM DE TDZ, b) CALO COMPACTO NA PRESENÇA DE 1,0 μM DE BAP; SEGMENTOS FOLIARES: c) CALO COMPACTO OBTIDO NA PRESENÇA DE 0,5 μM DE TDZ, d) CALO FRIÁVEL OBTIDO NA PRESENÇA DE 0,75 μM DE TDZ, e)

APRESENTANDO NECROSE EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 1,25 $\mu$ M DE TDZ, f) CALOS CREME E FRIÁVEIS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES OBTIDO NA PRESENÇA DE 4,44  $\mu$ M DE BAP E 0,1  $\mu$ M DE ANA. g) GEMA ADVENTÍCIA REGENERADA A PARTIR DE CALOS CREME E FRIÁVEIS OBTIDO NA PRESENÇA DE 2,22  $\mu$ M DE BAP BARRA: 1 cm.

### 3.4 CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- Os dois tipos de explantes utilizados, segmentos de epicótilos e segmentos foliares, são eficientes para a formação de calos.
- As concentrações dos reguladores mais eficientes para a formação de calos a partir de epicótilos são 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,25; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, ambos combinados com 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA.
- Segmentos foliares cultivados sob irradiância luminosa de 0,73  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  em meio MS contendo 0,75  $\mu\text{M}$  de TDZ apresentam alta porcentagem de formação de calos.
- A formação de calos a partir de epicótilos só acontece na penumbra.
- A taxa de organogênese é muito baixa.

## REFERENCIAS

ALBARRÁN, J.C.; VIELMA, M.; CONTRERAS, I.G.; Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King: estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Forestal Venezolana**, v. 41, p. 111-118, 1997.

ALMEIDA, W.A.B. de; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, v.59, p.35-40, 2002.

ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.421-430, 2004.

ALVES, M.N. Tissue culture of *Cecropia glaziovii* Sneth (Urticaceae) vegetative micropropagation and plant regeneration from callus. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, p. 1245-1252, 2010.

ANGELO, P.C da S.; MORAIS, L.A.C.; SOUSA, N.R.; QUISEN, R.C. Indução de *calli* em explantes de guaranazeiro visando a embriogênese somática. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.16, p. 133-137, 2010.

ARUNYANART, S.; CHAITRAYAGUN, M. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). **Scientia Horticulturae**, v.105, p.411-420, 2005.

BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KAMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 1051-1058, 1994.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa - CNPH, v.2, p.679-735,1999.

CASTRO, A. H. F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; VITOR, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 385-390, 2009.

CERQUEIRA, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; de MORAIS, A.R.; de CASTRO, N.E.A.; CARDOSO, M das G.; LAMEIRA, O.A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 301-308, 2002.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E. de P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilos de mogno (*Swietenia*

*macrophylla* King) com uso de 6- benzilaminopurina e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.

DAQUINTA, M. M.; CID, Y.; LEZCANO, D.; PINA, R.; RODRÍGUEZ, Y.; M, ESCALONA. Calogénesis en Meliáceas exóticas (*Khaya nyasica* Stapf. y *Toona ciliata*). **Biotecnología Vegetal**, v. 3, p. 123-125, 2003.

DA SILVA, R.P.; MENDES, B.M,J,; MOURÃ FILHO, F.A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1331-1337, 2008.

DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I. et al. *Agrobacterium* – mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.15, p.549-554, 1996.

FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* sp.** Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*).** 1999. 92f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, p.533-568, 1998.

GROGAN, J.E.; BARRETO, P.; VERRISSIMO, A. **Mogno na Amazônia Brasileira: ecologia e perspectiva de manejo.** Belém: Imazon, 2006.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP / Embrapa – CNPH, 1990. p.203–212.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Propagación de plantas, principios y prácticas.** Continental, 1990, 760p.

HUETTEMAN, C.A., PREECE, J.E. Thiadizuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 105-119, 1993

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.79, p.341-345, 2005.

KIELSE, P.; FRANCO, E.T.H.; PARANHOS, J.T.; LIMA, A.P.S de. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v.39, p.1098-1104, 2009.

LANDA, F. de S. L; PAIVA, R.; PAIVA, de O.; BUENO FILHO, J.S. de S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.56-63, 2000.

LANE, W. D.; McDOUGALD, J. M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 62, p. 689-694, 1982.

LASZLOFFY, K.; KADER, A.M.A.; MATHE, A. *In vitro* propagation of 'Julyred' apple. **Acta Horticulturae**, n.300, p.149-154, 1992.

LEE, S.K.; RAO, A.N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King through tissue culture. **Garden's Bulletin**, v.4, p. 11-18, 1988.

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

MARUYAMA, E,; ISHII, K.; SAITO, A,; MIGITA, K. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Peru-Amazon forest. **Journal of Agricultural Science**, v. 33, p. 346-349, 1989.

MIRANDA, E. M.; MIRANDA, H. R.; **Propagação vegetativa de Mogno (*Swietenia macrophylla* King) por enraizamento de estacas semilenhosas em câmara úmida**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000 15p. (Embrapa Acre, Circular Técnico, 32).

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

NEWMAN, P.O.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*), somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl segments induced with Benzylaminopurine. **International Journal of Plant Science**, v.157, p.554-560, 1996.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. de; SOARES, G.A.; SOARES, F.P.; CASTRO, A.H.F.; PAIVA, P.D. de O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A.Juss.). **Ciência e**

**Agrotecnologia**, v. 31, p. 366-370, 2007.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Universa**, v. 8, p. 181-195, 2000.

PIERIK, R.L.M. **In vitro Propagation of Higher Plants**. Martinus Nijhoff Publisher, 1987.

RAO, C.D.; GOH, C.J.; KUMAR, P.P. High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Pawlonia* spp. cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.16, p.204-209, 1996.

ROCHA, S.C. da; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 14, p. 91-101, 2004.

RODRIGUES, M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; MARTINOTTO, C.; SILVA JUNIOR, J.M. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**, v. 33, p.21-26, 2009.

SALVI, D.N.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S.; EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.65, p.159-162, 2001.

SARWAR, M.; SKIRVIN, R.M. Effect of thidiazuron and 6- benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.68, p.95-100, 1997.

SHAJI, J.; SONIYA, E.V.; VALSALA, K.; AIR, G.M. *In vitro* adventitious shoots formation from mature leaves and leaf derived calli of *Naregamia alata* W & A. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.35, p. 1249-1251, 1997.

SILVA, F. de A. S. e. AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, p71-78,2002.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-231, 1957.

TRAN THANH VAN, K. Control of morfogenesis by inhrent and exogenously applied factors in thin cell layer. **International Review of Cytology**, v. 11A, p. 175-194, 1980.

VALVERDE-CERDAS, L.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla*. **Revista de Biologia Tropical**, v.42, p.225-228, 1998.

VENKETESWARAN, S.; DIAS, M.A.D.L.; SULTANBAWA, F.; MEYERS, V.V. Tissue culture studies on mohagany tree, *Swietenia macrophylla* King. In: AHUJA, M.R (Ed). **Somatic cell genetics of woody plants**, p. 147-153, 1988.

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

WILHELM, E. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 57-60, 1999.

#### **4 INDUÇÃO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES AXILARES DE *Swietenia macrophylla* KING A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS**

##### RESUMO

O mogno, devido a sua madeira durável, é uma espécie muito apreciada para a fabricação de móveis e artigos de decoração de luxo. Devido à intensa exploração de reservas naturais, pesquisadores florestais têm buscado alternativas para seu cultivo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um método de multiplicação *in vitro* de mogno. Para isso, foram utilizados segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* inoculados em meio MS contendo 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP combinada com várias concentrações de CIN: 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0  $\mu\text{M}$  assim como um controle sem CIN. Em outro experimento, foram utilizados os meios MS e SH com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,2  $\mu\text{M}$  de 2-iP suplementados com diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ : para o meio MS, 220, 440 e 880  $\text{mg.L}^{-1}$  e, para o meio SH, 100, 200 e 400  $\text{mg.L}^{-1}$ , assim como um tratamento sem a adição de  $\text{CaCl}_2$ . O tratamento controle foi com a concentração normal de cada meio de cultura (MS 440  $\text{mg.L}^{-1}$  e SH 200  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi avaliado o número de brotos, a massa fresca dos brotos, a porcentagem de oxidação. No primeiro experimento, onde foram utilizadas várias concentrações de CIN combinadas a BAP, houve intensa oxidação em 90% dos explantes e 10% formaram brotações pouco vigorosas, não sendo possível realizar o subcultivo. No experimento utilizando os meios MS e SH, sintomas de clorose foliar foram observados nas maiores concentrações de  $\text{CaCl}_2$  dos meios de cultura. Apesar do elevado número de brotos (6,8 no meio SH e 7,8 no meio MS) obtidos nos tratamentos com o dobro da concentração de  $\text{CaCl}_2$  (400  $\text{mg.L}^{-1}$  e 880  $\text{mg.L}^{-1}$ ), quando estes foram subcultivados em mesmo meio de origem, sofreram intensa oxidação, impossibilitando o subcultivo, portanto, não foi possível estabelecer um método eficiente para a multiplicação massal de brotações.

Palavras-chave: brotações axilares,  $\text{CaCl}_2$ , clorose, mogno.

#### 4 *IN VITRO* AXILLARY SHOOT INDUCTION FROM NODAL SEGMENTS OF *Swietenia macrophylla* KING

##### ABSTRACT

Mahogany has a durable wood and is usually used in furniture factories. Due to intense exploration of natural resources, forestry researchers are interested in finding some alternatives for mahogany propagation. The aim of this work was to establish an *in vitro* multiplication method for this species. Nodal segments from *in vitro* cultivated plants were inoculated in MS medium supplemented with 2.5  $\mu\text{M}$  BAP combined with the following concentrations of KIN: 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 and 2.0  $\mu\text{M}$  and a control without KIN. In another experiment, the MS and SH media with 2.5  $\mu\text{M}$  BAP and 2.2  $\mu\text{M}$  2-iP were supplemented with the following  $\text{CaCl}_2$  concentrations: 220, 440 and 880  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (for MS medium) and 100, 200 and 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (for SH medium), apart from a treatment without  $\text{CaCl}_2$ . After 30 days of *in vitro* culture the number of shoots, weight and percentage of oxidation and contamination were evaluated. In the first experiment, where several KIN concentrations combined with BAP were used, there was a high oxidation level (in 90% of explants) and 10% of them presented weak shoots, thus the subculture was not possible. In MS/SH experiment, foliar chlorosis symptoms were observed in high concentrations of  $\text{CaCl}_2$ . Despite the high number of shoots (6.8 in SH and 7.8 in MS) obtained in treatments with double  $\text{CaCl}_2$  concentrations (400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for SH and 880  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for MS), when they were subcultured in the same medium they suffered intense oxidation that did not allow their subculture. For this reason, the establishment of an efficient method for massal multiplication of axillary shoots was not possible.

Keywords: Axillary shoots,  $\text{CaCl}_2$ , chlorosis, mahogany.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Swietenia macrophylla* King, o mogno, da família das Meliáceas, tem madeira de valor elevado devido às suas características físicas e anatômicas, constituindo-se em uma das principais fontes de madeira para exportação nos trópicos da América Latina.

Apesar de haver uma área de dispersão muito grande, com cerca de 150 milhões de hectares, a exploração seletiva pode afetar a integridade das populações. Existe uma clara tendência para a diminuição do número de árvores de mogno, especialmente de dimensões comerciais. Alguns países da América Central apresentam redução das populações originais. Em Guanacaste, Costa Rica, as populações de *S. macrophylla* têm diminuído consideravelmente (GERHARDT, 1996). Na Guatemala, a espécie está em perigo de extinção, assim como no Panamá, onde se encontra completamente exterminada em regiões acessíveis de fácil exploração (PATIÑO, 1996).

A micropropagação teve um forte impacto sobre a produção de plantas em larga escala e inúmeros protocolos foram estabelecidos visando a produção comercial de mudas assim como a preservação de espécies que se encontram ameaçadas de extinção (SOUZA e PEREIRA, 2007). Isto ocorreu devido ao fato desta técnica estar embutida nos programas de melhoramento que, na maioria das vezes, objetivam a manutenção ou a maximização do valor genético do clone a ser propagado, permitindo acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (JOSHI et al., 2003). Baseando-se no fenômeno da totipotência das células vegetais, onde cada célula é capaz de gerar uma planta nova idêntica geneticamente à planta-mãe, livre de contaminações, a técnica permite a produção de mudas saudáveis em espaço físico reduzido, além de ser altamente conveniente para a manutenção de coleção de plantas de genótipos diferentes (OLIVEIRA et al., 2007).

A escolha adequada do meio de cultura é um fator relevante para a micropropagação, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração dos explantes (RAMAGE e WILLIAMS, 2002). Além dos sais minerais, os nutrientes essenciais do meio de cultura incluem uma

fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento (GAMBORG e SHYLUK, 1981).

Na literatura, são encontrados trabalhos que relatam a necessidade de modificação do meio de cultura ou a utilização de meios diferentes ao MS, para que se possa melhorar ou resolver questões particulares de cada cultura. O suplemento de macro e micronutrientes no meio de cultura é parte essencial no sistema de cultivo *in vitro*. Atualmente, os meios utilizados são baseados nas modificações empíricas de algumas formulações básicas e em exigências nutricionais de plantas inteiras. As necessidades consideradas ideais variam amplamente entre os genótipos das plantas e sistemas de cultura (WILLIAMS, 1993).

Durante o cultivo *in vitro* de determinadas espécies, são encontradas algumas alterações na capacidade regenerativa da planta. A causa pode estar no uso de um meio de cultura inadequado para essa cultura, na falta ou excesso de algum nutriente. Para a cultura *in vitro* de mogno, existem alguns trabalhos que relatam a necessidade de modificações na composição do meio de cultivo ou a utilização de meios alternativos ao meio MS. Como exemplo, Lee e Rao (1988) relataram a modificação da concentração de nitrato de amônio do meio MS de 1,65 para 2 g.L<sup>-1</sup>. Maruyama e Ishii (1997) utilizaram o meio WPM na fase de indução e multiplicação dos brotos axilares. Um grupo Japonês (Patent nº JP09019229) relatou em uma patente que foram utilizados os meios B<sub>5</sub> (GAMBORG et al., 1968) e MS com as concentrações de sais originais e modificadas. Valverde-Cerdas et al. (1998), utilizaram o meio MS mas com a concentração de sais reduzida à metade. Schottz et al. (2007), ao tentarem estabelecer um protocolo de multiplicação *in vitro* de brotações axilares e reduzir ou eliminar a clorose foliar, utilizaram vários meios de cultura, como WPM, QL, B<sub>5</sub> e MS, esse último com várias diluições. Esses autores relataram que o tamanho das brotações formadas era pequeno e a clorose foliar presente na cultura.

Dentre os nutrientes minerais utilizados está o cálcio (Ca). A maior parte das funções realizadas por esse elemento está associada à manutenção da estabilidade da membrana, à estabilidade da parede celular e, conseqüentemente, o Ca<sup>2+</sup> é essencial para a absorção seletiva de íons (MARENCO e LOPES, 2009). O Ca<sup>2+</sup>, por estar presente na estrutura da

parede celular, tem uma baixa mobilidade; por isso, quando a planta está em deficiência, os sintomas aparecem nas folhas novas (PRADO, 2008). O íon  $Cl^-$  é essencial na fotossíntese via regulação estomática. Esse elemento possui uma grande mobilidade na planta e os sintomas de deficiência não são fáceis de identificar e os mais comuns consistem na redução do tamanho da folha e clorose (VITTI et al., 2006). A necrose apical está relacionada com diversos fatores, dentre eles o cálcio e o boro, e para este existem numerosas referências bibliográficas onde o aumento da concentração de Ca no meio de cultura tende a aliviar a incidência da necrose apical em inúmeras espécies (GARCIA et al., 2011). Em mogno, a clorose foliar já foi relatada por Schottz et al. (2007), no entanto sem a ocorrência de necrose.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo comparar dois meios de cultura (MS e SH) na multiplicação *in vitro*, variando somente as concentrações de cloreto de cálcio, testar os reguladores BAP e 2-iP e, em um segundo experimento, induzir a formação de brotações axilares em meios contendo diferentes concentrações de CIN associada a BAP.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

### 4.2.1 Material vegetal

As sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) utilizadas foram fornecidas pela Embrapa Florestas e coletadas na cidade de Vilhena, Rondônia.

As sementes passaram por um pré-tratamento em solução a 2% de tiofanato-metílico por 40 min sob agitação constante. Em câmara de fluxo

laminar, realizou-se um processo de assepsia em etanol 70% com 0,1% de Tween 20<sup>®</sup>, logo após foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 min e, pra finalizar, submetidas a três lavagens em água estéril para a remoção de traços das soluções desinfestantes. A semeadura foi realizada em câmara de fluxo laminar e as sementes foram inoculadas em frascos contendo 40 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semi-sólido.

Após 30 dias da germinação *in vitro*, os explantes foram excisados. Foram utilizados segmentos nodais de plântulas de *S. macrophylla* de 1 cm contendo de 1 a 2 nós. Foram cultivados em meios de cultura suplementados com regulador vegetal, conforme descrito abaixo nos itens 4.2.3 e 4.2.4, visando induzir o crescimento e a proliferação das gemas.

#### 4.2.2 Condições de cultura *in vitro*

Todas as culturas foram mantidas em sala climatizada, equipada com lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia”, com irradiância de 37  $\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ .

#### 4.2.3 Efeito de diferentes combinações de cinetina e BAP na multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King

Foram utilizados segmentos nodais com o ápice de *S. macrophylla*, originados de plântulas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS, com 30 dias de idade. Os tratamentos foram constituídos de meio MS com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar (Vetec<sup>®</sup>), acrescido de diferentes concentrações de CIN (cinetina): 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0  $\mu\text{M}$  combinada com 5  $\mu\text{M}$  de BAP. Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi avaliado o número de brotos, a massa fresca dos brotos, a porcentagem de oxidação e contaminação.

#### 4.2.4 Efeito de diferentes concentrações de $\text{CaCl}_2$ na multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King

Foram utilizados segmentos nodais de *Swietenia macrophylla*, originados de plântulas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS, com 30 dias de idade. Os tratamentos foram constituídos dos meios salinos MS e SH (SCHENK e HILDEBRANT, 1972), com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar (Vetec<sup>®</sup>) (Anexo 1), suplementados com vitaminas e compostos orgânicos do meio MS,  $2,5 \text{ }\mu\text{M}$  de BAP e  $2,2 \text{ }\mu\text{M}$  de 2-iP (adaptação de Schottz et al., 2007). O pH foi ajustado para 5.8 antes da autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$  por 20 min. Os tratamentos consistiram em modificações da concentração de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) dos meios MS e SH, conforme descrito na Tabela 6. O tratamento controle foi constituído da concentração normal de  $\text{CaCl}_2$  de cada meio. Após 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o número de brotos e a massa fresca dos brotos.

TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$  UTILIZADAS PARA A INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES DE *Swietenia macrophylla*.

Concentração de $\text{CaCl}_2$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	
Meio SH	Meio MS
0	0
100	220
200*	440*
400	880

\*Tratamento controle.

#### 4.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições (frascos) por tratamento e 5 explantes por frasco. Os experimentos foram repetidos 3 vezes e feita a média.

As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Foi utilizado o programa estatístico Assistat<sup>®</sup>.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King

Em todos os tratamentos deste ensaio, a combinação das citocininas BAP e CIN não foi eficiente para a formação e desenvolvimento de brotações axilares em segmentos nodais de mogno. Houve uma intensa oxidação ou a brotação era pouco alongada, e, por consequência, houve a morte de 90% dos explantes e os que foram emitidos, por causa do tamanho reduzido, não permitiram a excisão e o subcultivo (dados não mostrados).

Uma das possíveis explicações é que elevadas concentrações de citocininas ou a combinação de duas delas, podem ter causado fitotoxicidade ao explante, inibindo a formação de brotos. Esses resultados mostraram que o uso de BAP e CIN nas concentrações utilizadas inibiu a formação ou o desenvolvimento de brotações de mogno.

Resultado semelhante foi observado por Mantovani et al. (1999) que, ao cultivarem segmentos nodais de caixeta (*Didymopanax morototoni*) em meio de cultura adicionado de 44,4  $\mu\text{M}$  de BAP, observaram que as brotações não se desenvolveram adequadamente, gerando brotações com tamanhos menores que as brotações do tratamento controle. Em segmentos nodais de pau-santo (*Kielmeyera coriacea*), concentrações de BAP acima de 35,52  $\mu\text{M}$ , provocaram a formação de brotos anormais e de menor tamanho (PINTO et al., 1994).

Apesar de não terem sido adicionadas ao meio de cultura concentrações

de CIN maiores que 2,0  $\mu\text{M}$  combinadas com 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP, essa combinação pode ter se tornado tóxica aos segmentos nodais de *S. macrophylla*, ocasionando a morte ou o desenvolvimento precário das brotações. De acordo com Vieira e Monteiro (2002), as citocininas estimulam o desenvolvimento de porções de tecido meristemático, mais especificamente das gemas axilares, desencadeando o crescimento e divisões celulares que culminam no surgimento de uma brotação. Além disso, Couto et al. (2006) afirmaram que o balanço entre as quantidades de citocininas exógenas e auxinas endógenas varia conforme o tecido utilizado como explante.

Embora no presente estudo o subcultivo não ter sido possível e tanto as concentrações quanto o tipo de reguladores aqui utilizados serem diferentes, pode-se ver semelhanças com o trabalho de Rocha et al. (2007), que cultivaram segmentos nodais de canjarana (*Cabralea canjerana*) em meio MS adicionado de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e de 2-iP e obtiveram uma taxa de multiplicação relativamente baixa (1,66 brotos/explante no segundo subcultivo). Isso pode ser um indício de que houve uma inibição na formação de brotações causada pela utilização das citocininas nessa concentração no meio de cultura.

Assim como neste estudo, Brondani et al. (2009) observaram recalitrância na fase de multiplicação *in vitro* de um clone de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*. Isso evidencia a necessidade de ajustes nos protocolos de multiplicação *in vitro* para determinados genótipos que não se adaptaram às condições de cultivo. Bennett et al. (1994) observaram que clones de *E. globulus* apresentaram bom crescimento inicial em meio de cultura contendo BAP, mas esse crescimento declinou após o terceiro ou quarto subcultivo. Dibax (2007) também observou decréscimos da taxa de multiplicação de *E. saligna* à medida que a concentração de BAP aumentou.

No trabalho de List et al. (1996), visando a indução da proliferação de gemas axilares em segmentos nodais de *Melaleuca alternifolia*, também foi estudado o efeito das citocininas BAP e CIN e da combinação destas no meio MS. O melhor resultado obtido foi com a concentração de 4,5  $\mu\text{M}$  de BAP, este sendo superior ao encontrado com a utilização de CIN e esta combinada a BAP, onde foi possível produzir, em média, 5,57 brotações por segmento nodal ao final de 9 semanas de cultivo.

Embora a BAP seja a citocinina mais utilizada na maioria dos trabalhos

de micropropagação para a indução de brotações, verifica-se que existem níveis diferentes de sensibilidade às citocininas dependendo da espécie e às vezes entre diferentes genótipos. As citocininas podem, também, favorecer o alongamento dos brotos, contudo é necessário que se adicione ao meio de cultura uma quantidade adequada, sendo essa particular para cada espécie. Esses fatos puderam ser comprovados no presente trabalho, pois a concentração adequada de citocinina não foi encontrada.

#### 4.3.2 Efeito de diferentes concentrações de $\text{CaCl}_2$ e de dois meios de cultura na indução de brotos em segmentos nodais de *S. macrophylla* King.

Para a variável número de brotos, verificou-se diferença significativa entre os resultados, ao nível de 1%, tanto para o meio MS quanto para o meio SH (Anexos 11 e 12, Tabela 7). Na Tabela 7, é possível observar que na ausência de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 4c, 4d), as médias de brotações axilares formadas (2,1 para o meio SH e 3,7 para o meio MS) foram bem inferiores às médias obtidas na presença de  $\text{CaCl}_2$ .

No tratamento controle ( $440 \text{ mg.L}^{-1}$  no meio MS e  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  no meio SH), as médias do número de brotos por explante não foram diferentes estatisticamente das obtidas nas demais concentrações (Tabela 7); no entanto, houve maior número de brotações ( $6,8$  no meio SH e  $7,8$  no meio MS) e as folhas formadas eram maiores (dados não mostrados) quando se utilizou o dobro da concentração normal de  $\text{CaCl}_2$  desdes meios (Figura 4a, 4b). Isso pode ser observado tanto para o meio MS quanto para o meio SH.

Os meios MS e SH, dentre outros meios, acrescidos de diferentes concentrações de BAP e ANA foram utilizados no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de sobreiro (*Quercus suber* L.) por Manzanera e Pardos (1990). Em material de origem adulta, não houve emissão de brotações quando utilizaram o meio MS para o estabelecimento, no entanto, ao utilizarem o meio SH, 18,75% dos explantes emitiram brotações. Em outro experimento, quando utilizaram material juvenil, houve emissão de brotações em ambos os meios, no meio SH foi obtida uma porcentagem superior, atingindo 41,37%, e, no meio MS, 39,90%. Entretanto, diferentemente do presente trabalho com mogno,

houve a emissão de somente um broto por explante tanto no meio SH quanto no meio MS.

Em contrapartida, o meio MS (22,6 brotos) foi melhor para a emissão de brotações de pinus (*Pinus kesiya*) quando comparado ao meio SH (15,6 brotos), quando estes eram suplementados com 23  $\mu\text{M}$  de CIN (NANDWARI et al., 2001).

TABELA 7 – MÉDIA DE NÚMERO DE BROTOS FORMADOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA MS OU SH SUPLEMENTADOS COM 2,5  $\mu\text{M}$  DE BAP E 2,22  $\mu\text{M}$  DE 2-iP E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$ .

TRATAMENTO	Meio de cultura
<b><math>\text{CaCl}_2</math> (mg. L<sup>-1</sup>)</b>	<b>SH</b>
0	2,1 b*
100	5,0 a
200**	5,1 a
400	6,8 a
<b>Média Geral</b>	4,75
<b>CV(%)</b>	42,02
<b><math>\text{CaCl}_2</math> (mg. L<sup>-1</sup>)</b>	<b>MS</b>
0	3,7 b
220	6,4 a
440**	6,5 a
880	7,8 a
<b>Média Geral</b>	6,10
<b>CV(%)</b>	36,51

\* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*\* Tratamento controle. CV= Coeficiente de variação

Segundo Gribble et al. (2002), apesar da importância da nutrição mineral no crescimento de explantes *in vitro*, poucos estudos abordam a absorção ou a otimização dos meios utilizados. Como as plântulas *in vitro* crescem em condições especiais de fornecimento de nutrientes e podem não ter raízes, os

mecanismos de absorção mineral podem ser diferentes daqueles utilizados pelas plantas em condições *ex vitro*.

Existem diversos trabalhos na literatura mostrando que as formulações de sais originais dos meios de cultura não são adequadas e precisam de modificações. Nandwari et al. (2001) tiveram um aumento na formação de brotos em pinus (*Pinus kesiya*) quando reduziram a concentração de nitrogênio, cálcio e outros sais do meio MS. Para mogno, Lee e Rao (1988) e Tacoronte et al. (2004), aumentaram a concentração de nitrogênio do meio MS no cultivo *in vitro* de segmentos nodais e tiveram bons resultados. Theriou (1998) utilizou o meio MS para a multiplicação do porta-enxerto Mr. S 2/5 (*Prunus cerasifera*), com aumento da concentração de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}_2$ ) ou cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ao meio, e concluiu que a presença destes sais aumentou a produção de brotos *in vitro*, obtendo bons resultados. Nannetti e Pinto (1995), verificaram essa necessidade, e, além de utilizarem diferentes concentrações de citocininas, também acrescentaram diferentes níveis de nitrogênio e cálcio para o desenvolvimento de brotações de *Heliconia sp.*

Para a multiplicação do porta-enxerto Mr.S. 2/5 (*Prunus cerasifera*) Gallo et al. (2011) utilizaram várias formulações salinas, dentre elas o meio SH, com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,01$  ou  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, e observaram que o número médio de brotos não diferiu estatisticamente dos demais meios utilizados.

A presença de  $\text{CaCl}_2$  nos meios de cultura utilizados incrementou a massa fresca das brotações, apresentando diferenças estatísticas significativas (Tabela 8, Anexos 13 e 14). Para o meio SH a massa fresca obtida na ausência de  $\text{CaCl}_2$  foi a única que diferiu das obtidas nas demais concentrações, onde a média foi de  $0,75 \text{ g}$ . O mesmo não pode ser observado no meio MS, pois houve diferenças entre os resultados obtidos nas diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ . Na ausência de  $\text{CaCl}_2$ , o resultado diferiu estatisticamente das demais e também a massa fresca foi menor,  $0,62 \text{ g}$ , comparada às demais. No entanto, o resultado do tratamento controle ( $440 \text{ mg. L}^{-1}$ ) não diferiu estatisticamente dos obtidos com as concentrações de  $220 \text{ mg. L}^{-1}$  e  $880 \text{ mg. L}^{-1}$ . A maior média de massa fresca ( $1,63 \text{ g}$ ) obtida para o meio MS foi com a concentração de  $880 \text{ mg. L}^{-1}$ , entretanto, não diferiu do controle ( $1,45 \text{ g}$ ).

TABELA 8 – MÉDIA DA MASSA FRESCA DOS BROTOS FORMADOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA MS OU SH SUPLEMENTADOS COM 2,5  $\mu\text{M}$  DE BAP E 2,22  $\mu\text{M}$  DE 2-IP E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$ .

<b>TRATAMENTO</b>	<b>MEIO SH</b>
$\text{CaCl}_2$ (mg. $\text{L}^{-1}$ )	Massa fresca (g)
<b>0</b>	0,75 b*
<b>100</b>	1,09 a
<b>200</b>	1,30 a
<b>400</b>	1,38 a
<b>Média Geral</b>	1,13
<b>CV (%)</b>	19,42
<b>TRATAMENTO</b>	<b>MEIO MS</b>
$\text{CaCl}_2$ (mg. $\text{L}^{-1}$ )	Massa fresca (g)
<b>0</b>	0,62 c
<b>220</b>	1,30 b
<b>440</b>	1,45 ab
<b>880</b>	1,63 a
<b>Média Geral</b>	1,25
<b>CV (%)</b>	15,74

\* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= Coeficiente de variação

Para a variável número de folhas, diferenças estatísticas ocorreram entre as concentrações de  $\text{CaCl}_2$  para os dois meios utilizados (Anexos 15 e 16 e Tabela 9). Tanto para o meio SH quanto para o meio MS houve diferenças somente entre os resultados obtidos no meio sem  $\text{CaCl}_2$  e nas demais concentrações. No meio SH houve aumento do número de folhas de acordo com o aumento da concentração de  $\text{CaCl}_2$ . Essa tendência não pode ser observada para o meio MS, onde a maior média para o número de folhas foi obtida com a concentração normal do meio (440 mg.  $\text{L}^{-1}$ ). Pode-se observar ainda que, com 440 mg.  $\text{L}^{-1}$  (meio MS) e 400 mg.  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  (meio SH), o número médio de folhas diferiu pouco (4,8 e 3,98), mostrando que, apesar das

diferenças de composição e concentração entre os meios, essas não tiveram muita influência na formação de folhas.

TABELA 9 – MÉDIA DO NÚMERO DE FOLHAS DOS BROTO FORMADOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA MS OU SH SUPLEMENTADOS COM 2,5  $\mu\text{M}$  DE BAP E 2,22  $\mu\text{M}$  DE 2-IP E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$ .

<b>TRATAMENTO*</b>	<b>Meio</b>
<b><math>\text{CaCl}_2(\text{mg. L}^{-1})</math></b>	<b>SH</b>
0	1,06 b*
100	2,92 a
200	3,39 a
400	3,98 a
<b>Média Geral</b>	2,83
<b>CV (%)</b>	32,72
<b><math>\text{CaCl}_2(\text{mg. L}^{-1})</math></b>	<b>MS</b>
0	1,86 b
220	4,80 a
440	3,64 a
880	4,30 a
<b>Média Geral</b>	3,64
<b>CV(%)</b>	27,52

\* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= Coeficiente de variação

Entretanto, o que pode ser observado é que algumas folhas formadas a partir de brotações axilares apresentaram clorose foliar (Figura 4e, 4f). Em mogno, esse sintoma foi relatado por Schottz et al. (2007), que observaram vários graus de clorose nas folhas independente do meio utilizado. Em outra espécie da família Meliaceae, *Melia azedarach* L, Cabel (2006) também encontrou sintomas de clorose foliar durante a fase de multiplicação. Os explantes foram cultivados em meio WPM e as brotações formadas apresentavam-se pouco vigorosas e com crescimento lento, conforme foi observado com o mogno. Em *Melaleuca alternifolia*, Oliveira (2009) observou

que em todos os tratamentos, as brotações cultivadas em meio de cultura WPM semi-sólido ou líquido apresentaram brotações reduzidas, com folhas pequenas e aparência clorótica e oxidada. Esse comportamento foi observado em folhas de mogno (Figura 4 e, f) quando os explantes foram cultivados nos meios de cultura suplementados com a maior concentração de  $\text{CaCl}_2$  (880  $\text{mg.L}^{-1}$  no meio MS e 400  $\text{mg.L}^{-1}$  no meio SH). Segundo Raven et al. (2007), concentrações elevadas de Ca podem causar clorose foliar e reduzir o crescimento das plantas.

Em ensaios anteriores, os segmentos nodais foram cultivados em meio MS com as concentrações dos reguladores descritas no item 4.2.4 (dados não mostrados) e sintomas como a necrose das folhas mais jovens e morte das gemas foram observadas. Tais sintomas podem ser devidos a falta de Ca, uma vez que esse elemento não é remobilizado na planta (VITTI et al., 2006). Para evitar esses sintomas, um suplemento de Ca foi aplicado a essa cultura e os tratamentos comparados com um controle sem Ca. Os sintomas de clorose e necrose foram observados somente na ausência de  $\text{CaCl}_2$ .

Prado (2008) relata que plantas de café (*Coffea arabica* L.) sob condições de deficiência de Ca, apresentavam redução no nível de clorofila e de proteínas solúveis. Em tecidos deficientes em Ca, o prejuízo para a integridade da membrana leva ao aumento na velocidade da respiração e na degradação de proteínas e clorofila (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Foi observado que na presença de  $\text{CaCl}_2$  houve um aumento significativo no tamanho das folhas (dados não mostrados). Esse aumento de tamanho pode estar relacionado a suplementação de cálcio, uma vez que o elemento está associado à manutenção da estabilidade da membrana e à estabilidade da parede celular. Também atua como mensageiro secundário na célula vegetal, acoplando os sinais ambientais ao crescimento e desenvolvimento da planta. Isso ocorre em função do Ca poder ligar-se com a calmodulina e juntas poder ativar numerosas proteínas envolvidas em uma variedade de processos celulares, como o alongamento e a divisão celular (ZIELINSKI, 1998).



FIGURA 4 – ASPECTO DE BROTAÇÕES DE *Swietenia macrophylla* FORMADAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS APÓS 30 DIAS DE CULTIVO *in vitro*. a) SEGMENTO NODAL CULTIVADO EM MEIO MS COM  $440 \text{ mg.L}^{-1}$  DE  $\text{CaCl}_2$ , b) EM MEIO SH COM  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  DE  $\text{CaCl}_2$ , c) EM MEIO MS SEM  $\text{CaCl}_2$ , d) EM MEIO SH SEM  $\text{CaCl}_2$ , e) EM MEIO MS COM  $880 \text{ mg.L}^{-1}$  DE  $\text{CaCl}_2$ , f) EM MEIO SH COM  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  DE  $\text{CaCl}_2$ . BARRA: 1 CM.

#### 4.4 CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- As combinações de cinetina e BAP utilizadas nesse trabalho não são eficientes para a indução de brotações axilares em segmentos nodais de mogno.
- Um grande número de brotações é formado quando os segmentos nodais são cultivados em meios MS e SH, no entanto não é possível realizar o subcultivo.
- Não há diferenças entre os resultados obtidos na indução de brotações axilares nos meios MS e SH. A utilização desses meios de cultura e a modificação das concentrações de  $\text{CaCl}_2$  desses meios não permitem eliminar a clorose foliar.

## REFERENCIAS

- BENNETT, I. J.; McCOMB, J. A.; TONKIN, C. M.; McDAVID, D.A.I. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v.74, p.53-58, 1994.
- BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; MARTINS-CORDER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, v. 28, p. 493-498, 2004.
- BRONDANI, G. E. DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNING, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, p.11-19, 2009.
- CABEL, S. R. **Micropropagação de cinamomo (*Melia azedarach* L.)**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene P5CSF129A via *Agrobacterium tumefaciens***. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3ª Ed. Revista Porto Alegre, p. 105-124, 2001.
- GALLO, C.M.; RITTERBUSCH, C.W.; FEIJÓ, A.R.; BIANCHI, V.J.; RODMANN, E.B. Influência do pH e da composição salina do meio na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto Mr. S. 2/5 (*Prunus cerasifera*). In: XIII ENPOS. **Anais . . . Pelotas: UFPel**, 2011.
- GAMBORG, L.; SHYLUCK, J.P. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures In: THORPE, T.O. **Plant tissue culture methods and applications in agriculture**. p. 21-44, 1981.
- GARCÍA, E.; LORENTE, P.; MARÍN, J.A.; ANDREU, P.; ARBELOA, A. Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados *in vitro*. **Información Técnica Económica Agraria**, vol. 107, n.4, p. 315-323, 2011.
- GERHARDT, K. Germination and development of sown mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in secondary dry forest habitats in Costa Rica. **Journal of Tropical Ecology**, v.12, p.275- 289, 1996.

GRIBBLE, K.; CONROY, J.P.; HOLFORD, P.; MILHAM, P.J. *In vitro* uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. **Australian Journal of Botany**, v. 50, p.713-723, 2002.

JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNIYAL, D. P. *In vitro* clonal propagation of mature Eucalyptus F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.

KIELSE, P.; FRANCO, E.T.H.; PARANHOS, J.T.; LIMA, A.P.S de. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v.39, p.1098-1104, 2009.

LEE, S.K.; RAO, A.N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King through tissue culture. **Garden's Bulletin**, v.4, p.11-18, 1988.

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**, v.6, p.63- 67, 2000.

LIST, S. E.; BROWN, P. H.; LOW, C. S.; WALSH, K. B. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, n. 36, p. 755-760, 1996.

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

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; RITTER, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 648-655, 2006.

MANTOVANI, N. C., FRANCO, E. T. H., GUERRA, M. P.; HOPPE, J. Micropropagação de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch., **Ciencia Florestal**, vol. 10, p. 15-33, 1999.

MANZANERA, J.A.; PARDOS, J.A. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p. 1-8, 1990.

MARRENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 3ª ed., atual. Ampl. Viçosa: Ed. UFV, 486 p., 2009.

MARUYAMA, E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. Micropropagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. **Journal of Japanese Forest Society**, v.71, p. 329–331, 1989.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. **Tissue culture studies on big-leaf mahogany *Swietenia macrophylla***. In: INTERNACIONAL WORKSHOP BIO-REFOR, 6, 1997, Brisbane. **Proceedings...IUFRO/SPDC**, 1997, p. 116-118.

NANDWARI, D.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Micropropagation of *Pinus kesiya* ex Gord (Khasia pine). **Gartenbauwissenschaft**, v. 66, p. 68-71, 2001.

NANNETTI, D.C.; PINTO, J.E.B.P. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio e cálcio combinados com BAP e TDZ no desenvolvimento de *Heliconia* sp. *in vitro*. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 1995. p.144.

NUNES, E.C et al. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, p. 259-268, 2002.

OLIVEIRA, J.K. de. **Viabilidade polínica e propagação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith**. Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) 72f. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2007.

OLIVEIRA, Y. de. **Micropropagação de *Melaleuca alternifolia* Cheel**. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) 92f. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

PATIÑO, V. F. **Recursos genéticos de especies de la familia Meliaceae en los neotrópicos: prioridades para acciones coordinadas**. Roma: FAO, 1996. 120p.

PINTO, J. E. B. P., ARELLO, E. F., PINTO, C. A. B. P., BARBOSA, M. H. P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29,867-873, 1994.

PRADO, R.M. **Nutrição de plantas**. Ed. Unesp, São Paulo, 407p., 2008.

QUOIRIN, M. LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* sp. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. ***In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant***, v.38, p.115-124, 2002.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.

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**, v. 29, p. 517-524, 2005.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, 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**, v.25, p.365-367, 2003.

SILVA, F. de A. S. e. AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, p71-78,2002 .

SCHOTTZ, E. de S., KALLIL FILHO, A.N.; TRACZ, A.L.; KOEHLER, H.; RIBAS, L.L.F.; QUOIRIN, M. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) from juvenile shoots. **Ciência Florestal**, v.17, p.109-117, 2007.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed, 2010. 719p.

TEFERA, W.; WANNAKRAIROJ, S.A. Micropropagation method for Korarima (*Aframomun corrorima*) (Braum) Jansen). **Science Asia**, v. 30, p. 1-7, 2004.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. In: ENCONTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia, **Simpósios...** Goiânia: REDBIO, 2001.

THERIOU, K. D. Response of increasing rates of NaCl or CaCl<sub>2</sub> and proline on Mr.S. 2/5 (*Prunus cerasifera*) peach rootstock cultured *in vitro*. **Advances in Horticultural Science**, v.12, p.169-174, 1998.

VIEIRA, E.L; MONTEIRO, C.A. **Hormônios vegetais**. In: Introdução à fisiologia vegetal. Maringá, Eduem. p.79-104, 2002.

VITTI, G.C.; LIMA, E.; CICARONE, F. **Cálcio, magnésio e enxofre**. In: Nutrição mineral de plantas. Editor Manlio Silvestri Fernandes. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 431 p., 2006.

WILLIAMS, R.R. Factors determining mineral uptake *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 289, p.165-169, 1993.

ZIELINSKI, R.E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p. 327-335, 1998.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

A indução de calos em explantes de mogno é possível cultivando segmentos de epicótilos e folhas em meio contendo várias combinações de TDZ e ANA.

A regeneração de brotações adventícias em alta frequência a partir de calos friáveis não é possível, nas concentrações de BAP adotadas.

É possível induzir o desenvolvimento de brotações axilares, mas não sua multiplicação *in vitro*, uma vez que os tratamentos adotados (combinações de BAP e CIN no meio MS e de BAP e 2-IP nos meios MS e SH) não permitem o subcultivo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de TDZ e ANA permitiu que 91,5% dos segmentos de epicótilo formassem calos friáveis aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Pela coloração e consistência dos calos, acredita-se que sejam organogênicos. Para segmentos foliares, o uso de apenas TDZ foi eficiente para a formação de calos (90% dos explantes). Com a combinação de BAP e ANA, também foi possível obter uma alta porcentagem de explantes formando calos (93,3%).

No período em que esse trabalho foi realizado, não foi possível obter brotações adventícias desses calos; porém, pelos resultados obtidos, acredita-se que este trabalho tenha apontado um caminho a ser seguido e melhorado.

Recomenda-se que, para melhorar essa fase, façam-se testes de pré-tratamentos dos explantes no escuro e exposição destes à várias irradiâncias para observar as respostas morfogênicas.

Recomenda-se a utilização de diferentes meios de cultura na organogênese, como por exemplo, os meios WPM, SH, DKW e diluições destes.

Diferentes concentrações de reguladores vegetais, tanto dos já utilizados

com diferentes meios de cultura, idades de explantes, irradiâncias, quanto combinações ainda não utilizadas deveriam ser testadas.

Recomenda-se ainda, a realização de cortes histológicos dos calos e brotações regeneradas para verificar se estes são morfológicamente normais e a partir de que estruturas dos calos os brotos são formados.

Para a micropropagação, se sugere que seja utilizada outra combinação de reguladores vegetais, de citocininas ou citocinina combinada com auxina.

Quanto à clorose, uma análise foliar de nutrientes seria indicada para verificar qual elemento está faltando ou se está em concentração inadequada, de maneira a poder modificar a composição do meio de cultura.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA MS E SH

	MS (mg.L <sup>-1</sup> )	SH (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>		
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650	-
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	-	300
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900	2500
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170	-
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440	200
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370	400
<b>Micronutrientes</b>		
<b>Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	27,80	15
<b>Na<sub>2</sub> EDTA</b>	37,30	20
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,20	5
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	22,30	10
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8,60	1
<b>KI</b>	0,83	1
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,25	0,1
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0,025	0,1
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0,025	0,2
<b>Substâncias orgânicas do meio MS (mg.L<sup>-1</sup>)</b>		
<b>Tiamina.HCl</b>	0,1	
<b>Piridoxina.HCl</b>	0,5	
<b>Acido Nicotinico</b>	0,5	
<b>Glicina</b>	2	
<b>Mio-inositol</b>	100	
<b>Sacarose</b>	30000	

ANEXO 2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE BAP E TDZ EM COMBINAÇÃO COM ANA NA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALO A PARTIR DE EPICÓTILOS DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	7	5.54060	0.79151	16.1437 **
Resíduo	40	1.96118	0.04903	
Total	47	7.50177		
Média	1.09			
CV (%)	20,13			

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

ANEXO 3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE BAP E TDZ EM COMBINAÇÃO COM ANA NA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS A PARTIR DE EPICÓTILOS DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	7	1.66337	0.23762	29.7699 **
Resíduo	40	0.31928	0.00798	
Total	47	1.98265		
Média	0,87			
CV (%)	10,20			

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

ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE BAP E TDZ EM COMBINAÇÃO COM ANA NA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS COMPACTOS A PARTIR DE EPICÓTILOS DE MOGNO

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	7	5.22826	0.74689	22.9957 **
Resíduo	40	1.29919	0.03248	
Total	47	6.52745		
Média	0,63			
CV (%)	28,40			

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

ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE TDZ NA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO TOTAL DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	2	2.01740	1.00870	26.6874 **
Resíduo	15	0.04086	0.04086	
Total	17	2,63028		
Média	0,92			
CV	22.03			

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

ANEXO 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE TDZ NA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS COMPACTOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	2	0.51409	0.25704	10,7188*
Resíduo	15	0.35971	0,02398	
Total	17	0.87379		
Média	0,71			
CV (%)	21,83			

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F

ANEXO 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE TDZ NA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	2	0.50601	0.25301	10.5496**
Resíduo	15	0.35974	0.02398	
Total	17	0.86575		
Média	0,87			
CV (%)	17,86			

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

ANEXO 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE TDZ NA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO EM SEGMENTOS FOLIARES DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	2	1.63701	0.81896	13.7732**
Resíduo	15	0.89190	0.05946	
Total	17	2.52982		
Média	0,44			
CV (%)	55,33			

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

ANEXO 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE BAP E ANA NA PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	3.64365	1.21455	26.5485 **
Resíduo	20	0.91497	0.04575	
Total	23	4.55862		
Média	0.79			
CV	26,95			

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

ANEXO 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DE BAP E ANA NA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE MOGNO.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	2.65954	0.88651	10.0122**
Resíduo	20	1.77087	0.08854	
Total	23	4.43042		
Média	0.71			
CV	41,80			

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

ANEXO 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$  NO NÚMERO DE BROTOB OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOGNO CULTIVADOS DE MEIOS DE CULTURA MS NA PRESENÇA DE  $2,5 \mu\text{M}$  DE BAP E  $2,2 \mu\text{M}$  DE 2-iP.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	89.00000	29. 66667	5.9798*
Resíduos	36	178.60000	4. 96111	
Total	39	267.60000		
Média	6,10			
CV	37.51			

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F

ANEXO 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$  NO NÚMERO DE BROTOB OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOGNO CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA SH NA PRESENÇA DE  $2,5 \mu\text{M}$  DE BAP E  $2,2 \mu\text{M}$  DE 2-iP.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	114.10000	38. 03333	9.5481**
Resíduos	36	143.40000	3.98333	
Total	39	257.50000		
Média	4,75			
CV	42.02			

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

ANEXO 13 - ANALISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$  NA MASSA FRESCA DOS BROTOB OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOGNO CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS NA PRESENÇA DE  $2,5 \mu\text{M}$  DE BAP E COMBINADO  $2,2 \mu\text{M}$  DE 2-iP.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	5.87240	1. 95747	50.4653**
Resíduos	36	1.39638	0.03879	
Total	39	7.26878		
Média	1,25			
CV	15.74			

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

ANEXO 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$  NA MASSA FRESCA DOS BROTOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOGNO CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA SH NA PRESENÇA DE  $2,5 \mu\text{M}$  DE BAP E  $2,2 \mu\text{M}$  DE 2-iP.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	2.31910	0.77303	11.3150**
Resíduos	36	2.45949	0.06832	
Total	39	4.77859		
Média	1,13			
CV	23.09			

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

ANEXO 15 - ANÁLISE DE VARIACIA DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$  NO NÚMERO DE FOLHAS DOS BROTOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOGNO CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS NA PRESENÇA DE  $2,5 \mu\text{M}$  DE BAP E  $2,2 \mu\text{M}$  DE 2-iP.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	50.93600	16.97867	16.9223**
Resíduos	36	36.12000	1.00333	
Total	39	87.05600		
Média	3,64			
CV	27.52			

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

ANEXO 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE  $\text{CaCl}_2$  NO NÚMERO DE FOLHAS DOS BROTOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOGNO CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA SH NA PRESENÇA DE  $2,5 \mu\text{M}$  DE BAP E  $2,2 \mu\text{M}$  DE 2-iP.

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M.	F
Tratamentos	3	47.76875	15.92292	18.4762**
Resíduos	36	31.02500	0.86181	
Total	39	78.79375		
Média	2,25			
CV	28.22			

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