

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

**Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia  
seriada e micropropagação**

**Wirifran Fernandes de Andrade**

**Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Ciências. Área de concentração:  
Recursos Florestais com opção em  
Silvicultura**

**Piracicaba  
2010**

Wirifran Fernandes de Andrade  
Biólogo

**Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia  
seriada e micropropagação**

Orientador:  
Prof. Dr. **ANTÔNIO NATAL GONÇALVES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Ciências. Área de concentração: Recursos Florestais  
com opção em Silvicultura

Piracicaba  
2010

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

Andrade, Wirifran Fernandes de

Indução do rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação / Wirifran Fernandes de Andrade. - - Piracicaba, 2010.  
75 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Árvores florestais 2. Clonagem 3. Enxertia (Fitotecnia) 4. Maturação vegetal  
5. Micropropagação vegetal 6. Teca I. Título

CDD 634.97338  
A553i

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

A Deus;

A família;

Ao Eduardo Villaça, pela força no início de tudo.

DEDICO



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador e amigo Professor Antônio Natal Gonçalves pela orientação e conselhos;

Ao Professor Joadil Gonçalves de Abreu da Universidade Federal do Mato Grosso que auxiliou nas análises estatísticas;

Ao Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP;

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

Aos Professores Marcílio de Almeida, João Aléxio Scarpate Filho, Luiz Antônio Gallo pelas sugestões e discussões;

As Biólogas Cristina Vieira de Almeida e Diva Correia e ao Biólogo Vanderlei Antônio Stefanuto pelo apoio.

A Floresteca S.A e Bioteca Ltda. pela oportunidade de crescimento profissional e também pelo apoio nas experimentações;

E aos amigos que durante esta passagem me apoiaram.



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | 9  |
| ABSTRACT.....  | 11 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....  | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 15 |
| 1.2 Hipóteses.....   | 17 |
| 1.3 Objetivos.....   | 17 |
| 1.3.1 Geral.....   | 17 |
| 1.3.2 Específicos.....   | 17 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 19 |
| 2.1 Tectona grandis e importância econômica.....                                   | 19 |
| 2.2 Maturação e rejuvenescimento.....  | 21 |
| 2.3 Propagação de Tectona grandis .....  | 30 |
| 2.4 Morfogênese e BAP.....   | 35 |
| 2.5 Micropropagação de Tectona grandis.....  | 37 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 41 |
| 3.1 Material genético .....  | 41 |
| 3.2 Macropropagação.....   | 41 |
| 3.3 Micropropagação.....   | 42 |
| 3.3.1 Resgate do meristema.....  | 42 |
| 3.3.2 Estabelecimento da cultura.....  | 44 |
| 3.3.3 Multiplicação/Rejuvenescimento.....  | 45 |
| 3.3.4 Enraizamento das microestacas.....   | 45 |
| 3.4 Definição dos tratamentos, delineamento experimental e análise estatística.... | 46 |
| 3.5 Minijardim clonal.....   | 47 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 49 |
| 4.1 Macropropagação.....   | 49 |
| 4.2 Micropropagação.....   | 52 |
| 4.2.1 Resgate do meristema.....  | 52 |
| 4.2.2 Estabelecimento da cultura.....  | 53 |



|  |    |
|--|----|
| 4.2.1 Número de folhas, número de nós e tamanho dos explantes..... | 54 |
| 4.2.3 Multiplicação/rejuvenescimento.....                          | 57 |
| 4.3 Enraizamento.....  | 62 |
| 4.4 Minijardim clonal.....   | 64 |
| 5 CONCLUSÕES.....  | 67 |
| REFERÊNCIAS.....   | 69 |

## RESUMO

### **Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da enxertia seriada e micropropagação no rejuvenescimento de matrizes adultas de *Tectona grandis*. A experimentação foi realizada nas empresas Floresteca S.A e Bioteca Ltda, Mato Grosso, utilizando três materiais genéticos diferente, sendo dois clones, com 35 anos idade e mudas de semente. Como técnica de macropropagação optou-se pela enxertia seriada com delineamento inteiramente aleatorizado com três tratamentos representados pelos materiais genéticos com sete repetições. Para micropropagação, utilizou-se meio MS modificado. O experimento *in vitro* foi dividido em etapas: resgate do meristema com delineamento inteiramente aleatorizado, com os tratamentos sendo três materiais genéticos com trinta repetições; estabelecimento da cultura com os tratamentos arranjados em fatorial 3x5 sendo três materiais genéticos com cinco concentrações de BAP, totalizando quinze tratamentos com cinco repetições; multiplicação/rejuvenescimento com delineamento inteiramente aleatorizado, com os tratamentos arranjados em fatorial 3x5 sendo três materiais genéticos com cinco subcultivos, totalizando quinze tratamentos com três repetições e enraizamento das microestacas. Para macropropagação, o parâmetro avaliado foi a percentagem de pega dos enxertos. Para micropropagação, na fase de resgate, avaliou-se o número de meristemas viáveis; na fase de estabelecimento da cultura, avaliou-se o tamanho, número de nós e número de folhas dos explantes; e na fase de multiplicação/rejuvenescimento, avaliou-se o desenvolvimento de brotos nos sucessivos subcultivos. Os enxertos das mudas obtidas por semente apresentaram brotação aos sete dias de enxertados comparados aos clones que iniciaram as brotações aos quinze dias de enxertados. A sobrevivência dos meristemas apicais introduzidos que não apresentaram oxidação ou contaminação foi superior a 84%. A concentração de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP foi a mais significativa na fase de estabelecimento da cultura. O número de brotação e o rejuvenescimento do material adulto aumentaram à medida que aumentou o número de subcultivos, bem como a percentagem de enraizamento. O estabelecimento de minijardim clonal de *Tectona grandis* é possível mediante uso de brotações rejuvenescidas *in vitro*.

Palavras-chaves: Maturação; Juvenilidade; Fase de mudança; Produção clonal



## ABSTRACT

### **Induction of rejuvenation of teak (*Tectona grandis* L. f) through serial grafting and micropropagation**

The aim of this study was to evaluate the effect of serial grafting and micropropagation in rejuvenation of *Tectona grandis*. The experiments were carried out in Floresteca SA and Bioteca Ltda. companies, Mato Grosso, using two clones and seedlings. The clones were 35 years old and the seedlings were six months old. Serial grafting was chosen for macropropagation technique on a completely randomized statistical design, with three treatments corresponding to genetic material with seven replications. For micropropagation, solid modified MS medium was used. The *in vitro* experiment was divided into stages: meristem rescue on a completely randomized design with the treatments corresponding to three genetic material with seven replications; establishment *in vitro* culture on completely randomized design arranged in 3x5 factorial scheme, corresponding to three genetic material with five concentrations of BAP resulting in fifteen treatments with five replications; multiplication/rejuvenation on completely randomized design arranged in 3x5 factorial scheme, corresponding to three genetic material with five subcultures concentrations of resulting in fifteen treatments with three replications on a completely randomized 3x5 and microcuttings rooting. For macropropagation, the parameter evaluated was the percentage of grafting takes. For micropropagation, in the rescue phase, it was evaluated the number of viable meristems. In the establishment phase of culture, the parameters evaluated were the size, number of nodes and number of leaves of the explants; and in the phase of multiplication/rejuvenation it was evaluated the development of the shoots in successive subcultures. The shoots sprouting from seedlings grafts at seventh day compared with grafted clones that started sprouting on the fifteenth day after grafting. The survival of apical meristems without oxidation or contamination was above 84%. The concentration of BAP ( $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) that was the most significant in the establishment phase of culture. The number of shoots produced and the rejuvenation process increases with increasing number of subcultures, as well as the percentage of rooting. The establishment of clonal minigarden of *Tectona grandis* could be possible through rejuvenation of trees *in vitro*.

Key words: Maturation; Juvenility; Phase change; Clonal production



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIA - ácido 3-indolacético

AIB - ácido indolbutírico

ANA - ácido naftalenoacético

BAP - 6-benzilaminopurina ou 6-benziladenina

BOD - estufa incubadora tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio)

GA<sub>3</sub> - ácido giberélico

TDZ - tidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tiadizol-5-il)uréia)

2ip - isopenteniladenina

Cm - centímetro(s)

mg.L<sup>-1</sup> - miligrama(s) por litro

mL - mililitro(s)

mm - milímetro(s)

MS - meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)

°C - grau(s) Celsius



## 1 INTRODUÇÃO

*Tectona grandis* pertence à família Lamiaceae, comumente conhecida como teca, sendo originária da Índia, Myanmar, Laos e Tailândia. A demanda internacional por madeira de alta qualidade desta espécie resultou em um esgotamento da floresta natural que cada vez mais dispõe de proteção de órgãos responsáveis para conservação da biodiversidade *in situ* (GOH; MONTEUUIS, 2005), bem como a tornou a espécie madeireira mais valiosa na atualidade por sua durabilidade e resistência. A madeira pode ser usada para a confecção de móveis finos, esquadrias, pisos, construção naval, painéis, lâminas faqueadas e lambris.

A demanda por madeira de teca vem aumentando progressivamente, devido ao aumento do consumo, decorrente da elevação do padrão de vida nos países do Sudeste Asiático; a escassez de outras madeiras tropicais de qualidade; a crescente conscientização ambiental do consumidor europeu e norte-americano, preocupado com a preservação da floresta tropical e o mercado brasileiro que, por si, oferece um grande potencial de consumo futuro.

As plantações no Brasil estão concentradas no Estado do Mato Grosso, onde estima-se que a área de cultivo chegue a 40 mil hectares (IPEF, 2005). A baixa qualidade da semente e percentagem de germinação, além da variabilidade no desenvolvimento e qualidade das plantas entre indivíduos da mesma progênie, afeta a viabilidade da propagação (PALANISAMY; SUBRAMANIAN, 2001). Plantações clonais de genótipos criteriosamente selecionados poderiam apresentar a solução mais adequada na implantação de florestas, principalmente no estabelecimento de pomares de sementes, e na produção de indivíduos superiores com características desejáveis, previamente selecionadas (GOH; MONTEUUIS, 1999).

A propagação de *Tectona grandis* ainda é realizada por sementes de fontes não selecionadas. Um problema para o cultivo de teca no país está na falta de informações sobre a variabilidade genética das sementes disponíveis, bem como baixa taxa de germinação destas. Influenciada por vários fatores como pericarpo espesso que limita a entrada de água e oxigênio para a semente, imaturidade fisiológica da semente e



inibidores químicos presentes no pericarpo (GUPTA et al., 1980; KUMAR, 1992; KAOSA; SUANGTHO; KJAER, 1998; ENTERS, 2000; GYVES; ROYANI ; RUGINI, 2007).

A propagação vegetativa é de fundamental importância nos programas de melhoramento florestal (GERA; GERA; SINCH, 2000) permitindo produção massal das árvores selecionadas em tempo e espaço reduzido conservando as características desejáveis. Esta alternativa oferece certas vantagens em relação à propagação tradicional por semente, por exemplo, consegue-se capturar o componente genético total (VIET, 1996). Entretanto, o processo de maturação comum em espécies lenhosas aumenta com o seu desenvolvimento ontogenético e constitui a principal barreira para a propagação vegetativa utilizando matrizes adultas o que reflete na redução; retardamento do desenvolvimento das raízes; ou até mesmo na perda da capacidade de enraizamento (HIGASHI; SILVEIRA, 2002; DAQUINTA et. al., 2002; WENDLING; XAVIER, 2001; GREENWOOD, 1995; BONGA, 1993; HANCKETT; MURRAY; SMITH, 1992; HACKETT, 1987). O uso da propagação vegetativa de *T. grandis* é altamente dependente do grau de maturidade fisiológica e do estado nutricional do material vegetal (PALANISAMY; SUBRAMANIAN, 2001). Este é o principal entrave para o sucesso da propagação clonal de *Tectona grandis*.

Várias publicações discutem o potencial da micropropagação da teca, principalmente utilizando material vegetal juvenil como propágulos, porém poucas são as informações utilizando material adulto e na maioria dos casos não se aplicam à produção em larga escala. Nas Américas, especialmente na Costa Rica, as pesquisas têm apresentado resultados promissores, atualmente dispõe de uma área de 25,6 mil hectares destinados a programas de reflorestamentos e plantações florestais (ABDELNOUR; MUNOZ, 2005). No Brasil, informações científicas, tecnológicas sobre os sistemas de propagação vegetativa são escassas com relação à silvicultura da *Tectona grandis* - ou estão sob domínio de algumas empresas privadas - mesmo com o crescimento das áreas plantadas no Centro-Oeste e Norte do Brasil que chega alcançar aproximadamente 100 mil hectares.

Espera-se que o estudo possa servir de referência para futuros trabalhos que visem à produção de mudas de *Tectona grandis* por meio de propagação, utilizando matrizes adaptadas às condições edafoclimáticas do Brasil.

## 1.2 Hipóteses

- A enxertia seriada e a micropropagação rejuvenescem matrizes adultas de *Tectona grandis*;
- Existe diferença na resposta morfogênica entre os materiais genéticos.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Geral

Indução do rejuvenescimento de matrizes adultas de *Tectona grandis* por meio de enxertia seriada e cultura de meristema.

### 1.3.2 Específicos

Macropropagação:

- Estudar o efeito da enxertia seriada no rejuvenescimento das matrizes adultas;
- Definir o número ideal de enxertias para rejuvenescimento das matrizes.
- Verificar se há diferença entre os clones testados no processo de rejuvenescimento.

Micropropagação:

- Resgate do meristema – Avaliar a percentagem de sobrevivência dos meristemas;
- Estabelecimento da cultura *in vitro* - Determinar a dosagem de citocinina mais adequada para o desenvolvimento inicial do meristema;
- Multiplicação/rejuvenescimento – Determinar o tempo necessário para rejuvenescimento de matrizes adultas de *Tectona grandis*, bem como o

número ideal de subcultivos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Tectona grandis* e importância econômica

Teca (*Tectona grandis*) pertencente à família Lamiacea atualmente é a espécie arbórea mais valorizada no mercado florestal em todo o mundo. A área de ocorrência natural situa-se no Sudeste Asiático, especialmente na Índia, Laos, Tailândia e Mianmar (Burma). Foi introduzida em Java e Indonésia aproximadamente 500 anos atrás. Sua dispersão estende-se de 700 até 1.300 metros acima do nível do mar. Cresce melhor em localidades com chuva anual de 1.250 a 3.750 mm, temperatura mínima de 13° a 17°C e temperatura máxima de 39° a 43°C, porém não resiste a geadas.

A teca foi introduzida nas Américas primeiramente em Trinidad e Tobago no ano de 1913, posteriormente no ano de 1926 foi introduzida no Panamá. A introdução na América do Sul foi entre 1926 e 1936 na Venezuela, Brasil e Argentina (Mello, 1963). No Brasil, temos registro de plantio em 1930 no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e no Horto Florestal de Rio Claro em São Paulo. Entre os anos de 1930 e 1960 foram feitos diferentes testes de procedências principalmente no Mato Grosso, na região de Cáceres. Nesta região, o ciclo de corte atinge apenas 25 anos. Nos países de origem, a rotação para a produção de madeira de valor situa-se em torno de 70 a 80 anos, atingindo em povoamentos naturais mais de 100 anos.

Trata-se de uma espécie pioneira, heliófita, caducifólia podendo alcançar até 50 metros de altura. O tronco é geralmente cilíndrico e freqüentemente bifurcado, podendo chegar a 2.5 metros de diâmetro. A casca atinge 15 mm de espessura. As folhas de disposição oposta em pares, coriáceas e possuem comprimento de 30 a 60 cm e larguras entre 20 e 35 cm. Os limbos são elípticos, pilosos e verruculosos na face inferior. As flores brancas dispõem em panículas de até 35 cm. Os frutos de forma cilíndrica e de cor marrom possuem diâmetros de cerca de 1 cm; apresentam quatro locos, mas produzem geralmente entre uma a três sementes. Desenvolve sistema radicular superficial (VEIT, 1996).

O melhor crescimento para teca registra-se, de um modo geral, em solos bem

drenados e oxigenados, com pH aproximadamente neutro; não tolera águas estagnadas ou pântanos. Frutifica pela primeira vez com a idade de 5 a 6 anos. As sementes matem o poder germinativo até 1 ano desde que seja conservadas em local frio em sacas de juta. A germinação processa-se lentamente e com grande irregularidade. Nas sementes viáveis, inicia-se cerca de 10 dias após a semeadura, variando até três meses. Segundo Masilamani e Dharmalingam (1998), a presença de inibidores germinação no mesocarpo constitui uma barreira fisiológica e a dureza no endocarpo uma barreira física para a taxa de germinação mantendo-se em torno de 60% no ano pós-coleta (KAOSA; SUANGTHO; KJAER, 1998).

Segundo a FAO (2003), a área total com plantações de teca é de aproximadamente 2.252,54 milhões de hectares, sendo 94,71% na Ásia, 3,63% na África, 0,12% na Oceania e 1,55% nas Américas. Não há levantamento atual da área reflorestada mundial, pois somente no Brasil a área já passa dos 60.000 hectares localizados na região Centro Oeste.

As principais características da teca são: durabilidade, estabilidade, facilidade de pré-tratamento, resistência natural ao ataque de fungos, insetos, pragas e brocas. Densidade média de 0,65 g/cm<sup>3</sup>. Desenho e cor são outros aspectos qualitativos importantes. É usada para a confecção de móveis finos, inclusive para jardim, esquadrias, pisos, bancadas para laboratório, moldes industriais, em construção naval e decoração interior e exterior (GOH, & GALIANA, 2000).

A teca é durável, pois seu cerne não é atacado por cupins, carunchos ou outros insetos. É imune à ação dos fungos apodrecedores de madeira, podendo ser enterrada, exposta ao tempo ou à água do mar, sem sofrer danos. A durabilidade do cerne deve-se a “tectoquinona”, um preservativo natural contido nas células da madeira.

A produção mundial é de, aproximadamente, três milhões de metros cúbicos por ano, sendo que a maior parcela é consumida pelo mercado interno dos países produtores. O mercado internacional consome cerca de 500 mil metros cúbicos podendo alcançar preços até três vezes ao do mogno, pode ser utilizada na produção de móveis, esquadrias de alto padrão, embarcações e decoração (VIEIRA, et al., 2002).

A tora de desbaste, com diâmetros entre 15 e 20 centímetros, pode se comercializada no exterior a preços que variam de US\$ 700 e US\$ 1.200 por metro cúbico. Segundo a OIMT (Organização Internacional de Madeiras Tropicais), o preço médio da venda para toras de Mianmar, com diâmetro de 48 centímetros e quarta classe de qualidade, alcançou 1.868 dólares por metro cúbico. Mesmo toras de menor diâmetro, colhidos no desbaste, encontram aceitação no mercado externo. Empresas brasileiras têm vendido lotes de toras de 25 diâmetro a preços de até 850 dólares o metro cúbico.

## 2.2 Maturação e rejuvenescimento

As primeiras tentativas de estudo de rejuvenescimento em espécies lenhosas foram feitas por volta de 1950 utilizando práticas hortícolas. Doorenbos (1955) induziu folhas jovens em enxertos maduros de *Hedera helix*, essa espécie passou a ser usada como modelo para estudos posteriores. Franclet (1956) foi um dos pioneiros no rejuvenescimento de Eucaliptus utilizando podas sucessivas em material adulto de aproximadamente 40 anos de idade conseguindo aumento na capacidade de enraizamento das estacas. Em 1958, Muzik e Cruzado conseguiram rejuvenescer matrizes adultas de *Hevea brasiliensis* por meio de enxertias sucessivas em porta-enxertos juvenis. O mesmo autor também obteve possível rejuvenescimento em *Cupressus dupreziana* com mais de mil anos onde enxertou estacas em porta enxertos juvenis de semente e obteve novas acículas e brotações e as quais foram enraizadas (FRANCLET, 1969).

Especificamente no ano de 1978, Boulay conseguiu resultado satisfatório na multiplicação de clones maduros de *Sequoia sempervirens* este possivelmente é o primeiro registro de rejuvenescimento *in vitro*. A partir daí, vários experimentos utilizando a cultura de tecidos com meios e concentrações de fitoreguladores foram desenvolvidos nos estudos de maturação/rejuvenescimento.

Poucas espécies são facilmente propagadas utilizando propágulos maduros. O maior problema para a propagação de matrizes adultas de espécies arbóreas é a

dificuldade de enraizamento. Essa dificuldade está diretamente ligada ao processo chamado de maturação, sendo necessário rejuvenescer as matrizes antes de iniciar qualquer trabalho de propagação (BECK; DUNLOP; STADEN, 1998; GIRI; SHYAMKUMAR; ANJANEYULU, 2003). O rejuvenescimento consiste na utilização de tratamentos ou técnicas que façam com que a planta passe de um estado maduro para o estado juvenil.

Maturação em plantas lenhosas compreende um processo pouco entendido até o presente momento. A começar pela falta de consenso entre as definições de adulto e maturação. Segundo Hackett (1992), maturação seria o envelhecimento do meristema (Ciclofise); Brink (1962), citado por Husen (2006), refere-se como sendo a fase de mudança e Frotanier e Jonkers (1976) citado por Monteuuis (1989) como envelhecimento. Esse último dividiu o fenômeno em idade cronológica, que seria o tempo transcorrido desde a germinação até o estágio atual de desenvolvimento; Idade ontogenética, que seria as sucessivas fases de desenvolvimento e; Idade fisiologia que corresponde ao estado fisiológico da planta ou da porção dentro da planta a qual vai determinar as mudanças na morfologia foliar, florescimento, diminuição da capacidade de brotação e enraizamento, dentre outras.

Segundo Hartmann e Kester's (1997), a fase de maturação corresponde a qual os meristemas têm potencial para desenvolver gemas florais e conseqüentemente frutos e sementes. Ainda associa à fase características do desenvolvimento da planta: o momento que inicia o florescimento; a mudança na morfologia das folhas e outras estruturas e; a diminuição no potencial de regeneração.

O grau de maturação dentro das plantas mantém um gradiente (Figura 1) (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Tecidos mais próximos a base, ou seja, ontogeneticamente jovens apresentam maior juvenilidade e o potencial de enraizamento estaria preservado. Enquanto partes mais distantes e periféricas corresponderiam à maior grau de maturação, ontogeneticamente mais velhos (HACKETT, 1985), bem como a resposta ao enraizamento dos propágulos é diretamente influenciada pela posição na copa de onde os "ramets" são coletados. Está

é a razão porque plantas produzidas por sementes apresentam características juvenis na região basal porque os meristemas mais próximos à base formaram-se em épocas mais próximas à germinação do que os das regiões terminais (HARTMANN et al., 2002).

Essa premissa é levada em consideração quando se pretender propagar vegetativamente (BECK, et al., 1998; WENDING& XAVIER, 2001).

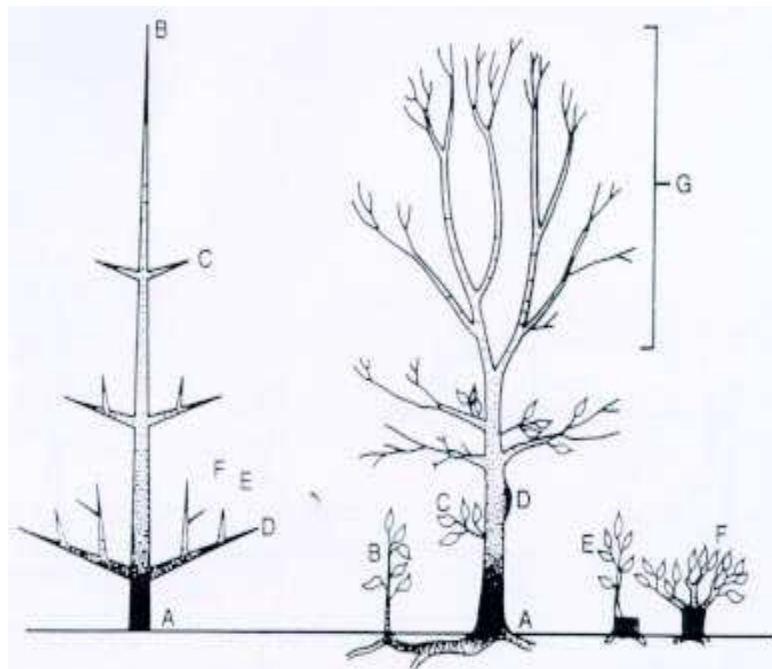


Figura 1 - Gradientes de juvenilidade-maturidade que se inicia na base da árvore. Esquerda: gradiente do estado juvenil em  $A > F > E > D > C > B$ . Direita: gradiente do estado juvenil em  $A > G$ ; B: broto originário de raízes adventícias; C: brotos epicórmicos; D: esferoblastos (adventícias); E - F: brotação de touças, onde B - F: representam brotações juvenis (HACKETT, 1985)

À medida que a árvore vai se desenvolvendo e adquirido maturidade, a habilidade de resposta dos propágulos ao enraizamento diminui. Portanto o local de onde será coletado o explante pra iniciar a cultura *in vitro* assume importância. Giri et al., (2003) sugere tratar a planta doadora de explantes com citocininas para induzir brotações epicórmicas.



Para Wareing (1959) citado por Hackett (1985), maturação é a transição da fase juvenil para adulta e envelhecimento indica a perda de vigor associado com o aumento da complexidade da planta.

Segundo Zimmerman et al. (1985), o florescimento seria o maior critério de maturação, porém essa afirmação foi considerada simplista uma vez que pode-se induzir florescimento precoce em plantas ainda juvenis.

Greenwood (1987) também adotou o termo Fase de Mudança e relatou quatro etapas distintas que ocorrem durante o processo: 1) fase embriogênica, 2) fase vegetativa juvenil, 3) fase vegetativa adulta e 4) fase adulta reprodutiva. Apesar da falta de consenso entre os autores, todos chegaram à conclusão que durante o processo de maturação há mudanças na morfologia e na complexidade do indivíduo.

Huang et al., (1990) define como a passagem progressiva da fase juvenil para a adulta tendo como marco o início do desenvolvimento sexual.

Bonga (1993) discorre que não há padrão definido para passagem da fase juvenil para adulta na maioria das espécies, pois numa mesma planta pode-se ter partes madura ou senescente, enquanto outras podem apresentar características juvenis. Para ele, uma planta juvenil tem que ter alguma parte ou célula com maior número de características juvenis que maduras. Além do mais, as mudanças podem ocorrer de forma abrupta ou gradual refletindo diretamente crescimento, morfologia foliar, filotaxia e competência reprodutiva. Diferentemente, Hackett (1985) fala que o processo nunca ocorre de forma abrupta, mas é um processo progressivo que passa por diferentes fases, mas raramente todo o indivíduo é afetado (BRAND & LINEBERGER, 1992).

Valdes et al., (2002) define como uma evolução gradual paralela ao envelhecimento e desenvolvimento das plantas. Além das características morfológicas há numerosas alterações fisiológicas, anatômicas e bioquímicas que estão associadas ao fenômeno (BONGA, 1993; GREENWOOD, 1995; HUSEN; PAL, 2006; ROBINSON; WAREING, 1969). Ballester et al., (1999) encontraram diferença anatômica entre estacas de 80 anos de idade de *Castanea sativa* coletadas da copa e da base

rejuvenescidas *in vitro*. Após rejuvenescimento, o xilema e floema secundário apresentavam-se mais desenvolvido nas microestacas maduras, bem como houve divisão periclinal das células do câmbio, principalmente no sentido do floema. Nos dois tipos, foram observadas alta atividade celular, porém a presença de meristemóides e primórdios radiculares só foram observados nas estacas coletadas da base supondo uma maior capacidade de resposta organogenética neste tipo de material.

Estas alterações não ocorrem apenas no hábito de crescimento, mas afeta diretamente no potencial de propagação, redução na competência dos tecidos à organogênese e baixo potencial de enraizamento (GREENWOOD, 1987; MONTEUUIS, 1989; VALDES; CENTENO; ESPINEL; FERNÁNDEZ, 2002; Huang et al., 1990).

A possibilidade que a maturação resulte da alteração de genes específicos ou do funcionamento dos mesmos também foi discutida levando a considerar se há diferença nos tecidos juvenis e maduros entre o conteúdo de DNA no núcleo celular. Nagl (1979) (citado por BONGA, 1993), encontrou 71% mais DNA em células maduras, enquanto Domoney e Timmis (1980) não observaram nenhuma. Hackett (1985) propôs que a base para a regulação da maturação seria a metilação de genes regulatórios.

Para Monteuis (1989), o processo de maturação em plantas seminais inicia-se com o desenvolvimento de uma pequena região de células meristemáticas derivadas da porção apical do embrião. Ainda ressalta que todos os órgãos que serão originados dessa porção apresentarão características que foram previamente determinadas nas células no meristema. Os meristemas apicais desde a embriogênese possuem capacidade de resposta juvenil diminuindo com o desenvolvimento ontogenético da árvore, porém durante a quebra de dormência das gemas exibe todo seu potencial juvenil. Neste caso, o tamanho do explante e a época de coleta seriam os pontos cruciais no sucesso no rejuvenescimento. Com o menor tamanho do explante, diminuiria a ação das substâncias inibidoras e o bom estado fisiológico da “ortet” resultaria em maiores respostas morfogênicas. Esta habilidade de resposta, chamada por Huang et al, (1991) de plasticidade ocorre porque no mesmo meristema há camadas de células maduras e juvenis que estão sob influência dos outros tecidos da planta.

Em 1997, Perrin et al., determinou o nível endógeno de zeatina em brotações rejuvenescidas *in vitro* e não tratadas de *Hevea brasiliensis* e constatou que o nível de zeatina das brotações tratadas era maior do que as não rejuvenescidas e conseqüentemente a resposta organogênica superior, assumindo assim, que o nível endógeno de citocininas pode ser um confiável marcador bioquímico para rejuvenescimento.

Para Valdés et al. (2002), o conteúdo endógeno de reguladores de crescimento é o fator mais importante na regulação da maturação, pois há influência destes no ciclo mitótico no meristema, o qual é responsável pela estabilidade genética tanto da fase juvenil quanto da madura; segundo a autora, faltam estudos específicos em fisiologia da maturação para determinar marcadores fisiológicos para eventos que o acompanham o processo de desenvolvimento das plantas lenhosas. Neste trabalho, o nível de citocininas foi analisado em brotos axilares e terminais de *Pinus radiata*. Houve decréscimo do nível endógeno em ambos os brotos com o aumento das idades das plantas.

Husen (2006) também corrobora com a idéia da dependência de reguladores de crescimento no processo de rizogênese quando justifica o aumento no uso da concentração de auxina à medida que aumenta a idade da matriz, segundo ele, esta necessidade é devido à diminuição endógena dos reguladores ou aumento de inibidores de enraizamento.

Diferentemente, Ballester et al., (1999) em seu trabalho com *Castanea sativa* de 80 anos de idade, encontrou alta concentração de auxinas (AIA) em estacas coletadas da copa da árvore e concluiu que o nível de auxina endógeno não é o fator limitante para a baixa taxa de enraizamento obtida neste tipo de estaca.

Giovanelli & Giannini (1999) declaram que na ausência de marcadores bioquímicos e/ou moleculares para determinação do grau de juvenildade, o vigor das brotações e o aumento na capacidade enraizamento podem ser usados como padrão na comparação do grau de rejuvenescimento. Os termos “fácil de enraizar” e “difícil de enraizar” foi usado por Ballester et al., (1999) para designar material juvenil e maduro,

respectivamente de *Castanea sativa*.

O estado nutricional e as atividades de enzimas como catalase e peroxidase aparecem na literatura como tendo papel importante nas mudanças que ocorrem na planta durante a passagem da fase juvenil para adulta, porém o autor não assume as mudanças como marco, mas sim como consequência de todo o processo podendo ser usadas como ferramentas na investigação do tema (HUANG et al., 1990). Além do estado nutricional, fatores como baixa intensidade luminosa, alta temperatura os quais podem reduzir o nível de carboidratos pode rejuvenescer ou prolongar a fase juvenil em *Hedera helix*.

Hackett (1985) indaga em que nível de desenvolvimento acontece o rejuvenescimento? Seria em nível celular, no meristema apical ou na correlação das mudanças envolvendo toda a planta. Para o autor, o rejuvenescimento não ocorre com o uso de técnicas de propagação vegetativa, o que pode acontecer é o retardamento do processo de florescimento, dependendo da espécie. O rejuvenescimento de fato ocorre durante a reprodução sexual ou apomixia podendo ser induzida em brotos ou embriões em desenvolvimento por tratamentos nutricional e hormonal.

Nas (2003) chegou à conclusão que durante o período de subcultivo *in vitro* de *Castanea* sp. os explantes mantiveram fisiologicamente juvenis, porém em condições *ex vitro* as plântulas voltaram a apresentar característica maduras florescendo e produzindo frutos como plantas maduras. Sugerindo que em algumas espécies o grau de rejuvenescimento adquirido durante o cultivo *in vitro* não mantém a juvenilidade por longo período. Resultados diferentes foram encontrados por Monteuis (1991) trabalhando de *Sequoiadendron giganteum* de 100 anos de idade, não obteve diferença significativa na taxa de enraizamento entre clones juvenis (46,1%) e clones rejuvenescidos (44,3%) assumindo que o a capacidade de enraizamento adquirida pelo material rejuvenescido persistiu mesmo após aclimação *ex vitro* chegando a apresentar 90 a 95% de similaridade na morfologia foliar, em média 5,59 mm, finas e mais desenvolvidas, e na orientação dos ramos, ortotrópicos. Quando comparados à testemunha, 1,40 mm, coriáceas e ramos plagiotrópicos, respectivamente.

A capacidade de propagar vegetativamente matrizes de espécies lenhosas está associada à juvenilidade, quanto mais juvenil, mais fácil será sua propagação. Isso reflete positivamente na produtividade da floresta, pois terá maior vigor e tempo para produção de madeira. Para horticultura isso não é verdade, pois o grau de juvenilidade dos propágulos pode retardar o começo da floração sendo desvantagem para a comercialização do produto.

Os métodos usados para resgatar à juvenilidade ou levar o tecido a responder o mais próximo possível da resposta que teria o material de semente, incluem cultura de tecidos *in vitro*, aplicação de citocininas, giberelinas, enxertia seriada, estaquia, poda drástica, tratamentos com citocininas e estiolamento de brotos. Brand e Lineberger (1992) trabalhando com *Betula papyrifera* e *Bétula pubescens* de 15 anos de idade visando rejuvenescimento *in vitro* e tendo como comparação mudas de sementes do mesmo material, concluíram que o rejuvenescimento do gênero ocorre *in vitro*, porém o grau de juvenilidade adquirido é bem menor daquele apresentado nos explantes oriundos de semente.

Nos anos 90, a enxertia de ápices caulinares adultos em porta-enxertos juvenis foi considerado por Huang et al. (1990) como o método mais eficaz e amplamente utilizado para rejuvenescimento. O método foi primeiramente usado por Doorenbos (1954) em *Hedera helix* (Doorenbos, J., 1954 citado por Huang et al., 1990). Segundo o autor, o grau de rejuvenescimento adquirido utilizando enxertia seriada depende do número de reenxertias feita no material tanto *in vitro* como *in vivo*, isso pode decrescer com o passar do tempo como acontece com *Hedera* e *Eucalyptus* sendo necessário número maior de enxertias para aumentar o tempo de vigor dos propágulos. Os autores também propuseram modelo para rejuvenescer árvores utilizando microenxertia seriada. O método consiste em enxertar *in vitro* material adulto sob micro porta-enxertos de semente. Obteve-se 60% de enraizamento nas microestacas produzidas a partir da quarta microenxertia. Segundo ele durante a união do enxerto há transmissões de sinais entre as células que vão desencadear o processo de rejuvenescimento.

Entretanto o mais efetivo e comum tratamento usado para rejuvenescimento é o

subcultivo dos explantes *in vitro* (FRANCLET, 1991; NAS, et al., 2003; HUANG, et al., 1990). A memória da “ortet” trazida com o explante no momento da coleta diminui progressivamente com o subcultivos *in vitro*. Ocorre uma reprogramação responsável pelo rejuvenescimento das células a qual é passada para o subcultivo seguinte minimizando a força que a ortet exerce sobre o explante levando ao rejuvenescimento (BECK, 1998; HAMMATT; GRANT, 1993).

Mais recentemente, Wending & Xavier (2001) publicaram que para o rejuvenescimento de espécies florestais, a micropropagação é a técnica mais eficiente, no entanto, dependendo da espécie torna-se inviável pela falta de conhecimento específico, pelo custo elevado ou pelo número insuficiente de subcultivos (HACKET, 1985). A micropropagação estaria ligada as concentrações internas e aplicações externas de reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento estão relacionados com características juvenis (GIOVANELLI; GIANNINI, 1999).

Em coníferas, a capacidade de resposta *in vitro* diminui drasticamente após germinação (BONGA, 1993). Calos derivados de material adulto de *Pinus radiata* não regeneraram brotações ou raízes (GREENWOOD, 1987). Para Sascha (1998) o maior problema para na propagação *in vitro* de espécies lenhosas é a presença de compostos fenólicos e a falta de competência dos tecidos.

A porcentagem de brotação nos explantes de *Acácia mearnsii* variou conforme a idade da matriz. Em explantes coletados de matrizes com dois anos, obteve-se 57%; quatro, 28%; seis, 26%; oito, 17% dos explantes responderam e apenas 7% dos explantes oriundos de plantas com de 10 anos foram responsivos (SASCHA, 1998).

Segundo Titon (2001), a dificuldade de enraizamento de certos clones na cultura do eucalipto através da estaquia é atribuída à maturação do material vegetal, levando à adoção de técnicas de reversão ao estado juvenil mediante a utilização da micropropagação.

Cultura *in vitro* usando matrizes adultas de *Eucalyptus* sp. também foi estabelecida com sucesso por Gonçalves (1980).

Greenwood (1995) trabalhando com *Pinus pinastere* verificou que à medida que os meristemas iam sendo subcultivados em meio acrescido de BA e baixa concentração de sacarose favorecia o aparecimento de características juvenis e o taxa de multiplicação passou de 1,5 na segunda repicagem para 3,3 na terceira, chegando a 5.4 após a quarta repicagem. Com este resultado, percebeu que os subcultivos rejuvenesciam o material mesmo sem o uso de citocininas externa.

Os métodos usados no resgate da juvenilidade em árvores adultas têm influência dos mais variados fatores como foi discutidos previamente. As características alcançadas durante a maturação são relativamente estáveis ou podem ser revertidas sob determinadas condições, isso significa que há características mais fáceis de manipular e outras que exige maior intensidade ou duração no tratamento podendo influenciar uma ou várias características, mas não todo o indivíduo.

Apesar de toda literatura a cerca do processo de maturação, fica evidente a deficiência no entendimento do fenômeno. Há necessidade de estudos multidisciplinares, principalmente na determinação de marcadores moleculares e alterações genômicas as quais podem levar ao conhecimento de proteínas específicas ligadas ao processo. Com isso seria possível quantificar o grau de maturação ou juvenilidade presente nas plantas propagadas vegetativamente (GREENWOOD, 1987). Em muitos casos não é possível assegurar se houve realmente rejuvenescimento, pois as características visuais não diferem do material adulto. Isto leva muitos autores a confundir rejuvenescimento com revigoramento temporário, o mesmo adquirido quando se faz podas drásticas (BONGA, 1993).

### **2.3 Propagação de *Tectona grandis***

Diferentes métodos de produção de espécies arbóreas via propagação vegetativa são praticados tanto nas Ciências Florestais quanto na Horticultura visando multiplicar indivíduos selecionados por meio de ciclo mitótico preservando sua constituição genética (HARTAMM et al., 1997). Na produção florestal é uma alternativa

viável ao método tradicional por sementes, pois em curto período de tempo e baixo custo é possível obter maior uniformidade no crescimento dos clones produzidos. A propagação vegetativa baseia-se no conceito da totipotência onde uma célula, tecido ou órgão é capaz de regenerar um indivíduo inteiro (GERA, 2000).

Os métodos freqüentemente utilizados para macropropagação de teca são a enxertia onde ocorre união de duas plantas para desenvolvimento da parte aérea; e a estaquia, onde raízes adventícias são induzidas em estacas geralmente juvenis e mergulhia (LAHIRI, 1985; SUBRAMANIAM; NICODEMUS; RADHAMANI, 1994). Na Tailândia, o uso de estaquia tem sido a técnica mais utilizada para estabelecimento de pomar de semente clonal ou para formação de bancos de germoplasma (KAOSA; SUANGTHO; KAJER, 1998). A escolha e sucesso no uso dos métodos dependem de características específicas de cada “ortet” (MONTEUUIS, 1999).

A propagação por enxertia tem sido amplamente utilizada para multiplicação de árvores matrizes capturando assim as características desejáveis. Entretanto a capacidade de enraizamento dos propágulos diminui com o aumento do nível de maturação da matriz (MONTEUUIS, 1989). Dentre os fatores que podem afetar essa diminuição, podemos citar acúmulo de inibidores de enraizamento, fatores genéticos, estado nutricional, diminuição endógena da quantidade de auxina e/ou indutores de enraizamento, diminuição da competência dos tecidos às auxinas com o aumento da idade fisiológica da “ortet” (HACKET; MURRAY; SMITH, 1993), época do ano, luminosidade, local de coleta dos galhos, aplicação de anelamento, espessura e profundidade do corte (ALFENAS et al., 2004).

Teca já foi vegetativamente propagada por enxertia (KEIDING; BOONKIRD, 1960; HUSEN; PAL, 2003; NAUTIYAL; SINGH; GURUMURTI, 1992, HUSEN; PAL 2000; HUSEN; PAL, 2003). Porém, não se conhece qual o efeito do grau de maturação no enraizamento das estacas. Além do mais, há inúmeros fatores que influenciam o sucesso no processo de enxertia como por exemplo, incompatibilidade entre os tecidos, temperatura adequada para produção do calo durante a união, estágio fisiológico do porta-enxerto, contaminação por vírus, pestes e doenças e uso de substâncias que promovam o processo de união (HARTMANN et al., 2002).



Estacas coletadas da copa de árvores de teca com 63 anos de idade tiveram 74% a 91% de enraizamento quando tratadas com AIB ( $2000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) enquanto estacas de 2 anos de idade tiveram taxa de enraizamento entre 79% e 100%. Com esses resultados, os autores sugerem que o potencial de enraizamento continua inerente ao tecido mesmo nas estacas maduras e que o ponto crucial para o desenvolvimento das raízes adventícias é a época de coleta das estacas (PALANISAMY, 2001).

Numa revisão feita por Nautiyal e Rawat (1994), destacaram-se alguns pontos que são cruciais para o sucesso da macropropagação em Teca via estaquia, a saber: escolha da matriz, selecionando-se as características desejáveis; preparação do propágulo deve ser coletado da parte inferior da copa, entre 20-25 cm e 1,5 – 2 cm de diâmetro; preparação do solução com fitohormônio, geralmente usa-se AIB; época de coleta, coleta no verão tem maiores resultados; tratamento da estaca pós coleta para evitar entrada de patógenos; escolha do substrato de enraizamento. Segundo Monteuis, 1998, o sucesso da produção de clonal via estaquia depende do bom desenvolvimento do sistema radicular. As mudas formadas via estaquia apresentam-se fisiologicamente mais ativas e desenvolvidas quando comparadas ao sistema radicular das microestacas o que irá garantir maior sustentação, adaptabilidade ao sítio de plantio e absorção nutricional.

Quando se trabalha com estaquia o diâmetro da estaca entre 1-1,5 cm é fundamental para a indução de enraizamento já uma junção bem feita na região do câmbio na enxertia é essencial para este método (UNIYAL; RAWAT, 1995). Além disso, temperatura e umidade são os dois fatores ambientais na regulação do sucesso dos métodos; temperatura a baixo de  $20^\circ \text{C}$  inibe a brotação. Temperaturas entre 21-27 e umidade relativa entre 45-60% foram suficientes para pegamento dos enxertos numa proporção de 80-90% e 60% de enraizamento das estacas de teca com 2 anos de idade.

Nautiyal et al., (1991) assumiram que existe estreita relação entre estações do ano e doses de indutores na resposta ao enraizamento de estacas coletadas da porção inferior da copa de árvores de 62 anos. Testando diferentes meses do ano e doses

diferentes de AIB e ANA, verificaram que apesar do melhor resultado ter sido com AIB ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + ANA ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ), as dosagens dos reguladores de crescimento sozinhas não são responsáveis pela resposta. Durante o verão houve resposta positiva, porém durante o inverno a resposta foi nula, talvez por porque durante a estação a atividade fisiológica cai e corresponde a época de dormência das gemas. O mesmo autor em 1992 testou doses de auxinas no enraizamento de estacas, mas dessa vez associado com a porção da copa de onde os ramos eram coletados tanto de material juvenil quanto de material maduro. Não houve significância dos resultados com relação ao material juvenil. Indicando que em árvores jovens a porção de onde as estacas são coletadas não interfere no enraizamento. Enquanto que foi altamente significativo nos tratamentos usando árvores adultas, obtendo-se 20% de enraizamento nas estacas coletadas da porção basal e intermediária usando AIB ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Indicando que o aumento do estágio de maturação da matriz diminui o a resposta ao enraizamento mesmo em porções distintas dentro da matriz.

Efeito da época que é feita a enxertia e as condições climáticas foi discutido no trabalho de Vakshaya e Rawat (1985). Segundo eles o sucesso de 100 % do pegamento dos enxertos está relacionado com as condições de umidade e temperatura dos meses mais quentes, sugerindo que todo manejo no preparo dos portas enxertos seja feito anteriormente. Além da época de coleta, o estado fisiológico e idade da ortet têm influência determinante no enraizamento das estacas.

Gera et al. (2000) realizou estudo com algumas espécies florestais de interesse na Índia dentre elas a Teca. O objetivo era verificar o potencial de enraizamento de estacas com cinco anos de idade sem uso de indutor de enraizamento. As estacas foram deixadas em substrato de areia de rio e após 90 dias foram avaliadas quanto o número de estacas enraizadas, número de raízes por estacas e peso fresco e seco. Teca teve 10% das estacas enraizadas; número médio de raízes por estacas foi de 15,89 o menor resultado dentre as demais. Porém quando comparado este resultado com as demais espécies, observou-se que teca teve o melhor resultado na produção de massa fresca e seca das raízes, 35,44 e 17,22 g, respectivamente. A teca foi tida como de fácil enraizamento, porém foi sugerido o uso de fitohormônio para ajudar no

desenvolvimento das raízes adventícias.

Resultados significativos foram conseguidos por Husen et al., (2003) estudando o efeito da enxertia seriada no rejuvenescimento de árvores de 95 anos de idade. Após segunda enxertia, as estacas alcançaram 20% de enraizamento e 31,67% de brotação. Este resultado foi significativo quando comparado a 1,67 % de enraizamento e 6,67 % da testemunha que representava material com apenas uma enxertia. Também foi observado significância nas interações entre dosagens de AIB, tipo de clone e enxertia seriada concluindo que a seleção de clones mais responsivos aos tratamentos deve ser considerada fundamental quando se tem por objetivo rejuvenescer matrizes adultas de *Tectona grandis*. Correlação entre material vegetal juvenil e AIB também foi discutida pelos mesmos autores ainda na resposta ao enraizamento. Máxima porcentagem (88%) foi conseguida em estacas tratadas com AIB (2000 mg.L<sup>-1</sup>) seguida de 80% com AIB (1000 mg.L<sup>-1</sup>) e menor resposta, 62,6 %, na testemunha (HUSEN; PAL, 2003b).

Maturação começa com a formação do zigoto. Desde esse momento o processo é determinado por fatores intrínsecos e ambientais. Estudo sobre o tema são relevantes não somente para o entendimento do processo bem como para estudar formas de revertê-lo.

## 2.4 Morfogênese e BAP

Uma definição clássica de morfogênese implica em que ela envolve o crescimento e a diferenciação. O termo crescimento é aplicado às mudanças quantitativas que ocorrem durante o desenvolvimento e pode ser definido como as mudanças irreversíveis no tamanho da célula, órgão ou no organismo inteiro. As alterações qualitativas aplicam-se à diferenciação celular, onde as células tornam-se especializadas.

De forma geral, aceita-se que a morfogênese ocorre mediada por divisões e especializações celulares, no entanto, não se conhece porque determinada célula se divide em determinado tempo e lugar e especializa-se em uma célula diferenciada.

Os fatores que influenciam o crescimento e diferenciação dos tecidos *in vitro* variam desde o genótipo – constituição genética do material cultivado; substrato – que fornece os elementos necessários à sobrevivência e desenvolvimento, e através do qual os estímulos são fornecidos ao explante; ambiente – condições ambientais sobre a qual a cultura é desenvolvida e; os fatores dependentes do tecido – idade, fase do crescimento, condições fisiológicas e origem (SILVA, 1989).

De acordo com Bonga (1993), na cultura *in vitro*, o explante pode apresentar dois tipos de crescimento. Sendo o organizado, que ocorre quando partes vegetais organizadas, tais como meristema apical de brotos ou raízes, folhas iniciais, gemas florais jovens, embriões são transferidos para a cultura e pode continuar a crescer com sua estrutura preservada, ou quando tais estruturas são neo-formadas durante o processo de cultivo. No crescimento não organizado, uma estrutura denominada calo é constituída de agregados de células.

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*.

As citocininas são substâncias derivadas da purina adenina, base nitrogenada

das moléculas dos ácidos nucléicos. Promovem a divisão celular, o aumento do tamanho da célula, quebra de dormência das sementes, inibe a dominância apical estimulando o desenvolvimento dos brotos laterais. As principais regiões de síntese em geral são tecidos jovens de embriões, bem como, ápices radiculares translocando-se livremente por toda planta através do xilema.

Dentre as citocininas, o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998).

De acordo com a literatura, BAP é a citocinina mais comumente utilizada na micropropagação de *Tectona grandis*, tanto isolada quanto em combinação (SHIRIN; RANA; MANDAL, 2005, DEVI; MUKHERJEE; GUPTA, 1994, ABDELNOUR; MUNOZ, 2005).

As citocininas, embora sejam importantes aliadas da cultura de tecidos, podem apresentar também alguns problemas, como hiperhidricidade e a dificuldade de enraizamento. A hiperhidricidade (vitrificação) é a anormalidade anatômica e fisiológica dos brotos *in vitro* quando em presença de citocininas. Na vitrificação observa-se uma atrofia dos brotos consistindo em pouca lignificação do tecido condutor, necrose do meristema apical, deficiência de clorofila e folhas quebradiças. A dificuldade de enraizamento surge quando os brotos são deixados por muito tempo em meio suplementado com BAP para regeneração das plantas (CID, 2005).

Outra questão pertinente à morfogênese refere-se às condições pelas quais ocorre a reprogramação das células já diferenciadas para formação de novas estruturas adventícias. A morfogênese neste caso normalmente ocorre a partir de células maduras que devem sofrer uma desdiferenciação. Termo referente à tomada da atividade meristemática em células que haviam cessado de se dividir e refere-se também a uma reprogramação da expressão gênica nestas células.

## 2.5 Micropropagação de *Tectona grandis*

A micropropagação de teca para produção massal foi desenvolvida na Malásia em cooperação com o CIRAD FORÊT, França. Mais de 100.000 microestacas foram produzidas por meio desta tecnologia (MONTEUUIS, 1998). Porém essa tecnologia se mantém em segredo sob o domínio do Governo Malaio, pois é comercialmente utilizada.

Inúmeras brotações foram induzidas de explantes oriundos de sementes e de matrizes de teca com 100 anos de idade em meio de cultura contendo  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cinetina e de BAP. As primeiras brotações emitidas serviram de fonte de explantes para continuação do experimento. Após 16 repicagens conseguiu-se 3000 plantas dos explantes de sementes; e com seis repicagens nos explantes do material adulto a produção foi de 500 plantas por ano de uma única gema. Esse resultado teve como ponto de partida o tratamento da cultura, no momento da inoculação dos explantes, com 5% de ácido ascórbico. Segundo o autor deu-se pelo uso do antioxidante no estabelecimento da cultura. Os compostos fenólicos são inibidores de enzimas diminuindo a resposta *in vitro* e inviabilizando a sobrevivência dos explantes (GUPTA, 1980). Injúrias causadas por compostos fenólicos no início da cultura foram amenizadas com subcultivos dos explantes para novo meio em intervalos de 24 horas (DEVI; MUKHERJEE; GUPTA, 1994).

Resultados similares foram conseguidos por Tiwari et al., (2002) utilizando segmentos nodais de teca de 45 anos de idade na tentativa de desenvolver protocolo para micropropagação. Na fase de estabelecimento de cultura 76% de sobrevivência foi conseguida quando o explantes eram transferidos para meio fresco a cada 12 horas durante 3 dias. Notou-se que havia redução desse percentual caso os explantes excedessem esse tempo de cultivo. A média de brotos por explantes foi de 5,76 por explante com tamanho médio de 3,7 cm sob efeito de BAP ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e AIA ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ). A mesma dosagem BAP ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) combinado com AIA ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura teve significância estatística na multiplicação *in vitro* de matrizes adultas com 60

anos de idade resultando em 6,33 brotos por explante quando comparado à testemunha que obteve 1 broto sem adição de reguladores ao meio (SHIRIN; RANA; MANDAL, 2005).

Daquinta et al., (2002) estudaram morfogênese *in vitro* de teca via organogênese indireta visando estudar o potencial de diferentes explantes na regeneração das plântulas. Os explantes testados foram: ápices e entrenós já em condição *in vitro* e cotilédones de sementes. O melhor tratamento para indução dos calos foi TDZ ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) com taxa de 100% de indução de calos nos entrenós; para regeneração dos brotos, BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + cinetina ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) teve o melhor resultado apresentando mais de 25% de regeneração a partir dos calos. Observou-se também que quando a quantidade de reguladores de crescimento foi testada pela metade, a regeneração foi nula, bem como na ausência.

Em 1996, Kushalkar e Sharon testaram o potencial de gemas apicais e axilares de plantas de três anos de idade na indução de embriogênese somática usando diferentes combinações de reguladores de crescimento em meio MS semi-sólido e líquido. Foi observado embriões na fase globular e codiforme em calos de gemas apicais em meio com BAP ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + ANA ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Enquanto calos iniciados das gemas axilares só apresentaram estruturas embrionárias quando cultivados em meio MS líquido com metade da concentração de sais e BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + ANA ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Nas gemas axilares, também foi observado embriogênese somática direta usando meio MS líquido suplementado com BAP ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + 2ip ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Chegou-se a conclusão que gemas axilares são mais competentes para embriogênese somática tanto direta quando indireta quando comparados as gemas apicais na quais houve formação apenas após desenvolvimento de calos

Trabalho desenvolvido por Rathore et al., (1991) com uma espécie pertencente a família Bignoniacea (*Tecomella undulata*), de 25 anos de idade, conhecida popularmente como teca do deserto devido sua rusticidade e qualidade da madeira semelhantes à *Tectona grandis*. Aproximadamente 8-10 brotações foram obtidas em média por segmentos nodais. Segundo eles, segmentos nodais são melhores que

segmentos apicais pela facilidade na desinfestação dos explantes, bem como facilita inserção do explante no meio de cultura evitando que a gema fique em contato e não desenvolva calo. Depois de 2-3 semanas em meio MS, a melhor dosagem testada foi BAP ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e AIA ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ), as brotações continuaram em meio de multiplicação sem perderem o vigor durante 12 meses consecutivos. A resposta foi atribuída à época de coleta dos explantes que coincidiu com a maior atividade fisiológica da espécie e elevada temperatura.

Melhor resultado de sobrevivência *ex vitro* foi observado em microestacas tanto de material adulto, 15 anos, quanto juvenil, um ano. Para Monteuis (1997) a resposta apresentada pelas microestacas na condição *ex vitro* foi melhor quando o enraizamento foi induzido *in vitro*, mais de 80% de sobrevivência das microestacas aclimatadas *ex vitro*; não houve diferença entre o material juvenil e maduro para a variável analisada. Além da idade da árvore, a resposta *in vitro* é dependente de fatores como genótipo, estado fisiológico, época de coleta e exsudação de compostos fenólicos (GIRI; ANJANEYULU, 2004).

O balanço hormonal entre citocininas/auxinas na fase de multiplicação é crucial para o desenvolvimento de brotações. Meio contendo ANA e cinetina em igual proporção causou apenas formação de calos em gemas apicais de *Tectona grandis* de 30 anos de idade. O melhor resultado na formação de múltiplas brotações foi conseguido com o uso de cinetina ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + BAP ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Obteve-se 5-6 brotos por explantes; foi possível observar o início do desenvolvimento a partir do sétimo dia de cultura. Para fase de alongação, a dosagem de BAP foi reduzida para  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  por 30 dias (DEVI; MUKHERJEE; GUPTA, 1994).

Dose altas de BAP como a usada pelo autor acima na multiplicação não são aconselhadas tendo em vista que aumenta-se o risco de variação somaclonal e pode ocorrer fitotoxicidade devido ao acúmulo do regulador no tecido da planta (Monteuis, 1998), bem com anormalidades dos brotos (GYVES; RUGINI, 2007). Redução de 100% para 88% na taxa de multiplicação foi observada quando aumentou de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  a concentração de BAP respectivamente (ABDELNOUR; MUNOZ, 2005).



Melhor resposta foi verificada, de forma geral, na indução de brotações emitidas em gemas apicais de *Tectona grandis* quando utilizou-se combinação de citocininas. Obteve-se 2,6 brotações por explante meio de cultura com BAP ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Cinetina ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Para enraizamento *ex vitro* dos explantes, o melhor tratamento foi também uma combinação de ANA ( $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIB ( $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) onde teve-se em média duas raízes com comprimento médio de 3,8 centímetros. O enraizamento *ex vitro* justifica-se pela diminuição do tempo de cultura *in vitro* e pela funcionalidade e adaptação que as raízes adquirem quando enraizadas *ex vitro* (DAQUINTA, et al., 2000). Em experimento para enraizamento *in vitro*, Costa, et al., (2003) obteve 100% de enraizamento tratando as bases das microestacas em solução de AIB ( $2000 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Gradaille et al., (2000) obtiveram 100% dos explantes brotando e média de 4,8 folhas por explante de teca utilizando meio MS acrescido de BAP ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Resultados significativos foram conseguidos por Gyves (2007) trabalhando com gemas apicais e segmentos nodais cultivados em meio MS acrescido de diferentes concentrações de reguladores de crescimento. O melhor resultado, o qual diferiu estatisticamente dos demais, com 3,8 brotos axilares por explantes, foi obtido utilizando meio MS suplementado com BAP ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi dividido em duas etapas, sendo o experimento de macropropagação desenvolvido no Viveiro da Empresa Floresteca S.A e o experimento de micropropagação no Laboratório Bioteca Ltda, localizados na região de Rosário Oeste e Várzea Grande, respectivamente, ambos no Estado de Mato Grosso.

#### **3.1 Material genético**

Como fonte de material para os experimentos foram utilizadas ramos de duas matrizes de *Tectona grandis*, denominadas de clone A e clone B com 35 anos de idade. A escolha das matrizes deu-se pela disponibilidade de material adequado, na época da instalação do experimento, tanto para a coleta de borbulhas quanto para a coleta de meristemas apicais. Essas plantas compõem o banco de germoplasma por enxertia da empresa Bioteca Ltda. e estão plantadas em área aberta. A média de altura das plantas é de 3 metros. As matrizes são de origem da Asiática, especificamente, Mianmar e foram introduzidas no Brasil em 1930 para plantio comercial na empresa Cáceres Florestal, região de Cáceres, Mato Grosso. Como testemunha usou-se mudas de sementes com seis meses de idade de progênies da empresa Floresteca S.A de mesma origem genética.

#### **3.2 Macropropagação**

Como técnica de macropropagação optou-se pela enxertia devido seu uso comprovado em espécies arbóreas no processo de rejuvenescimento, por meio de enxertia seriada (KEIDING; BOONKIRD, 1960; HUSEN; PAL, 2003; NAUTIYAL; SINGH; GURUMURTI, 1992, HUSEN; PAL 2000; HUSEN; PAL, 2003). O tipo de enxertia utilizado foi o método de borbulhia de placa, onde uma gema da planta que se pretende multiplicar é justaposta no porta-enxerto. Mudas seminais de um ano de idade foram usadas como porta-enxertos.

Foram coletadas estacas semilenhosas de aproximadamente 1 m de comprimento, 1,5 cm de diâmetro, com quatro pares de gemas. Para resgate das gemas do material de semente, utilizou-se mudas de seis meses de idade.

As folhas das estacas foram retiradas e as gemas seccionadas para posterior enxertia. Usou-se tesoura de poda para retirada dos ramos e canivete, previamente desinfestado com solução de fungicida, para procedimento de enxertia. As gemas foram justapostas nos porta-enxertos e amarradas como fitilho plástico. Posteriormente, foram plantadas em canteiro usando areia como substrato, irrigação por gotejamento e temperatura média diária de 42°C e 26°C noturna.

Com 7, 15 e 30 dias de enxertadas foi avaliada a percentagem de pega dos enxertos. As novas brotações foram usadas para próxima enxertia usando a mesma metodologia anteriormente citada. A partir da quinta reenxertia, seria avaliado o número de brotações produzidas e a percentagem de enraizamento das estacas para cada clone. A estaquia é uma técnica que consiste em promover o enraizamento de partes da planta, podendo ser ramos e folhas. Ainda é a técnica de maior viabilidade econômica para o estabelecimento de plantios clonais e a mais difundida entre as empresas florestais (Ferrari; Grossi; Wendling, 2004).

### **3.3 Micropropagação**

O experimento *in vitro* foi dividido em etapas: 1) Resgate do meristema; 2) Estabelecimento da cultura; 3) Multiplicação/Rejuvenescimento e 4) Enraizamento das microestacas.

#### **3.3.1 Resgate de meristema**

Ápices caulinares foram coletados de plantas do banco de germoplasma e usados como fonte de explantes (Figura 2a). A escolha do tipo de explante deu-se pelo

menor índice de infestação por microorganismos desse tipo de explante garantindo menor contaminação no estabelecimento da cultura (Monteuuis, 1998), bem como pela constante atividade fisiológica. Os ápices foram acondicionados em caixa de isopor (Figura 1b) com água, para evitar ressecamento e levados ao Laboratório. Algumas pequenas folhas são mantidas para evitar maior dano ao meristema.



Figura 2 - a) Detalhe do material vegetal usado como explante; b) Ápices caulinares acondicionados para transporte ao Laboratório

Para desinfestação, os ápices ficaram previamente sob água corrente por 30 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram tratados com solução de hipoclorito de sódio comercial contendo 2% de cloro ativo durante cinco minutos e sofreram três lavagens sucessivas com água destilada. Passando o processo de desinfestação, ainda na câmara de fluxo laminar, os primórdios foliares foram dissecados com auxílio de bisturi e pinça com uso de estereomicroscópio. O meristema com aproximadamente 1-2 mm de diâmetro foi cortado e transferido para tubo de ensaio com meio.

Tomou-se o cuidado de deixar alguns primórdios foliares para evitar a morte dos

explantes. Para cada material genético, usaram-se 30 meristemas sendo o mesmo número usado para o material de semente. A inoculação foi em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS suplementado acrescido de 3 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e pH ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem à temperatura de 121 °C sob pressão de 1,05 kg.cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos.

Os tubos ficaram em cubados em câmara tipo BOD totalmente no escuro com temperatura constante de 30° C. Após 10 dias de cultivo, avaliou -se o número de meristemas viáveis, ou seja, os que não apresentaram oxidação ou contaminação.

### **3.3.2 Estabelecimento da cultura**

Os explantes oriundos da etapa anterior foram distribuídos em tubos de ensaios com os diferentes tratamentos, contendo 15 mL de meio de cultura MS suplementado com 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (Figura 3). O ambiente de desenvolvimento das plântulas deu-se em sala de crescimento à temperatura de 30°C ± 2°C, fotoperíodo de 12/12 horas e iluminância de 4000 lux fornecida por lâmpadas brancas fria, localizadas a 30 cm do nível da prateleira. Aos 30 dias de cultivo, os explantes foram avaliados quanto ao tamanho, número de nós e número de folhas.

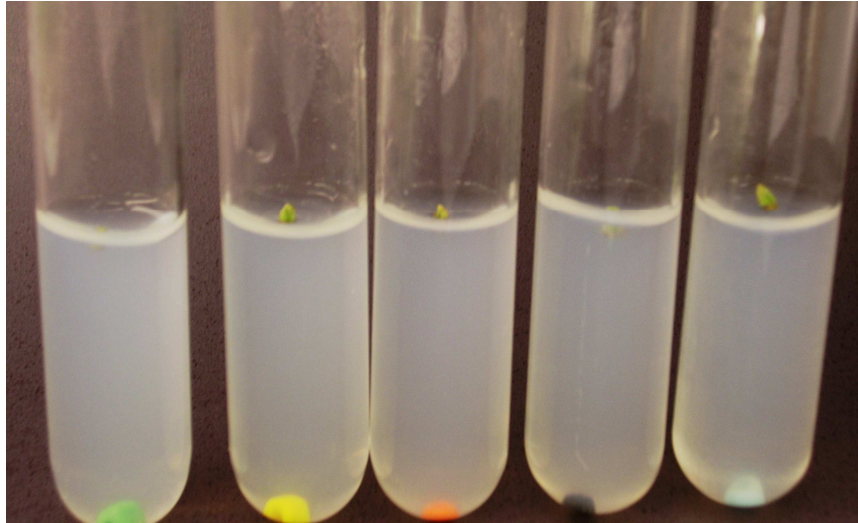


Figura 3 - Aspecto visual dos explantes de *Tectona grandis* na fase de estabelecimento *in vitro*

### 3.3.3 Multiplicação/Rejuvenescimento

Com a determinação do tratamento mais adequado para o desenvolvimento dos explantes, as plântulas foram seccionadas e novamente cultivadas em frascos com a concentração determinada. O tempo de subcultivo foi de 30 dias, sendo avaliada a quantidade de brotos produzidos em cada repicagem. Após avaliação de um subcultivo, as brotações obtidas eram utilizadas para início do novo subcultivo. Todas as repicagens foram conduzidas do mesmo modo como descrito acima.

Na quinta repicagem, 2/3 das brotações produzidas foram levadas ao Viveiro para enraizamento o restante foi repicado de modo que se pôde acompanhar quando as microestacas estariam em condições apropriadas de rejuvenescimento.

### 3.3.4 Enraizamento das microestacas

O enraizamento da microestacas foi realizado *ex vitro*. Adotou-se como satisfatório taxa de enraizamento maior que 60%. As microestacas foram seccionadas na base para remoção de calo e colocadas em caixas plásticas forradas com papel e

umedecidas para evitar dessecação durante o transporte ao Viveiro. Para indução de enraizamento, foi utilizado  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  em talco de AIB na base da microestacas que foram posteriormente plantadas em tubetes de  $50 \text{ cm}^3$  contendo substrato Mec Plant<sup>®</sup>, composto de casca de pinus carbonizada. Após 15 dias em Casa de Vegetação com nebulização intermitente, foram transferidas para Casa de Sombra para aclimação. Houve redução da irrigação e da umidade. Nesta última casa o período foi de 17 dias. Com 45 dias de plantio avaliou-se: o tamanho da parte aérea, número de nós e tamanho das raízes.

### **3.4 Definição dos tratamentos, delineamento experimental e análise estatística**

Para o experimento de macropropagação, os tratamentos constaram de três genótipos diferentes: semente (testemunha) clone A e clone B. O delineamento foi inteiramente casualizado onde cada tratamento continha sete repetições. A partir da quinta reenxertia seria testado doses crescentes de AIB (0, 500, 1000, 1500 e 2000)  $\text{mg.L}^{-1}$  na indução do enraizamento.

Para micropropagação, os tratamentos e delineamento experimental variaram conforme Tabela 1. Na etapa de resgate, cada tubo representa uma repetição com um meristema. Também no estabelecimento da cultura cada tubo contendo uma plântula representa uma repetição. Enquanto que na etapa de multiplicação/rejuvenescimento cada frasco contendo cinco explantes representa uma repetição. Para etapa de enraizamento, cada microestaca representa uma repetição.

Tabela 1 - Desdobramentos dos tratamentos, delineamentos e números de repetições usados no experimento de micropropagação

| <b>Etapa</b>               | <b>Tratamentos</b>                              | <b>Delineamento</b>               | <b>Repetições</b> |
|----------------------------|---|-----------------------------------|-------------------|
| Resgate                    | Semente, clones A e B                           | Int.casualizado                   | 30                |
| Estabelecimento da cultura | Semente, clones A e B<br>BAP mg.L <sup>-1</sup> | Int.casualizado<br>Fatorial 3 x 5 | 5                 |
|                            | 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0                          |                                   |                   |
| Multiplicação              | Semente, clones A e B<br>Subcultivos            | Int.casualizado<br>Fatorial 3 x 5 | 3                 |

Os dados foram analisados usando programa estatístico Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 1993).

### 3.5 Minijardim clonal

Para comprovar a rejuvenescimento do material em estudo, deu-se início o desenvolvimento de protocolo para produção de mudas via minijardim.

As mudas foram plantadas em canaletões contendo areia lavada como substrato em espaçamento 10 x 10 cm. Esperou 20 dias para fazer a primeira poda para evitar maiores estresses. Seletivamente inicia-se estabelecendo a poda das brotações de maneira a estruturar a cepa e quebrar a dominância apical dos brotos.

Seletivamente coletava-se as miniestacas com aproximadamente sete cm de comprimento, fazia a toaleta do excesso de folhas. A redução da área foliar da estaca é feita para evitar o excesso de transpiração, facilitar a chegada da água de irrigação ao substrato, ou seja, evitar o efeito guarda-chuva e evitar o recurvamento das miniestacas, em razão do peso da água de irrigação na superfície das folhas (WENDLING; ALOISIO, 2001). O plantio era realizado nas mesmas condições da microestacas, bem como a concentração de indutor de enraizamento.

Mensalmente era avaliada o taxa de produção por m<sup>2</sup> onde tínhamos o número de estacas produzidas x percentagem de enraizamento.





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Macropropagação

O início do desenvolvimento das brotações variou conforme o material genético. Na figura 4, observa-se que o material de semente iniciou a emissão de brotos aos setes dias de enxertado enquanto que os clones A e B tiveram comportamentos diferentes. A montagem do experimento foi feita em março de 2009, ou seja, final de verão, época que as gemas estão mais protuberantes facilitando a coleta e o sucesso da pega e por ser a espécie caducifólia.

Uniyal e Rawat (1995) discutem que vários fatores influenciam na pega da enxertia e destacam a temperatura entre 21 e 27°C e a umidade relativa entre 45-60%. A época de coleta das gemas para o enxertio também interfere na resposta. Segundo Nautiyae et al., (1991), todo o processo de enxertia deve ser realizado nos meses mais quentes, uma vez que a atividade fisiológica não corresponde ao período de dormência das gemas. Além da época de coleta, o estado fisiológico e idade da “ortet” são fundamentais para uma enxertia bem sucedida

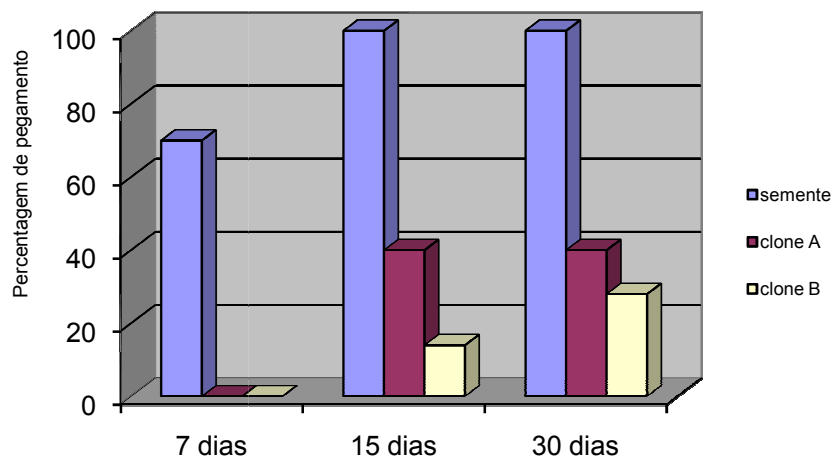


Figura 4 - Percentagem de pega dos enxertos de *Tectona grandis* aos 30 dias de enxertados

Levando-se em consideração que as condições de incubação dos enxertos atendiam o que foi pressuposto pelos autores, o fator genético, bem como grau de maturação possivelmente foram os maiores responsáveis pela resposta diferenciada entre os genótipos. *Tectona grandis* já foi vegetativamente propagada por enxertia (KEIDING; BOONKIRD, 1960; HUSEN; PAL, 2003; NAUTIYAL; SINGH; GURUMURTI, 1992, HUSEN; PAL 2000; HUSEN; PAL, 2003). Porém, há inúmeros fatores que influenciam o sucesso no processo de enxertia como, por exemplo, incompatibilidade entre os tecidos, temperatura adequada para produção do calo durante a união, estágio fisiológico do porta-enxerto, contaminação por vírus, pestes e doenças e uso de substâncias que promovam o processo de união (HARTMANN et al., 2002).

Tanto para o clone A quanto para o clone B as gemas foram coletadas de matrizes de aproximadamente 35 anos de idade. Nestes, a percentagem de enraizamento aos 30 dias foi de 40 e 28%, respectivamente. Enquanto que na testemunha, as gemas eram provenientes de mudas de seis meses de idade. A rápida pega das gemas de semente deve estar relacionado com o grau de juvenilidade do material que pode ser observado no aspecto das brotações aos 30 dias (Figura 5).

O maior problema para a propagação de matrizes adultas de espécies arbóreas é a dificuldade de enraizamento. Essa dificuldade está diretamente ligada ao processo chamado de maturação, sendo necessário rejuvenescer as matrizes antes de iniciar qualquer trabalho de propagação (BECK; DUNLOP; STADEN, 1998; GIRI; SHYAMKUMAR; ANJANEYULU, 2003).

Efeito da época que é feita a enxertia e as condições climáticas foi discutido no trabalho de Vakshaya e Rawat (1985). Segundo eles o sucesso de 100% da pega dos enxertos está relacionado com as condições de umidade e temperatura dos meses mais quentes, sugerindo que todo manejo no preparo dos portas enxertos seja feito anteriormente. Além da época de coleta, o estado fisiológico e idade da ortet têm influência determinante no enraizamento das estacas



Figura 5 - Aspecto geral das brotações de *Tectona grandis* após 30 dias de enxertados

Quando as brotações apresentavam condições para serem reenxertadas, fez-se o mesmo procedimento de enxertia, porém apenas o material de semente apresentou pega de todos os enxertos seguido do clone A, que das 7 gemas enxertadas apenas uma sobreviveu, e do clone B, onde nenhuma gema sobreviveu. Na quinta enxertia, na qual ia-se coletar as estacas para indução de enraizamento, nenhuma das gemas sobreviveram inviabilizando a continuação do experimento, sendo que até esta etapa, todos os enxertos de semente encontravam-se vigorosos.

Segundo Hussien et al. (2003), há diferença na resposta à enxertia quando se trata de materiais genéticos maduros, supondo que a escolha de material juvenil é fundamental para o sucesso da enxertia. Outros fatores podem ter influenciado o insucesso da enxertia como, por exemplo, incompatibilidade entre os tecidos, temperatura não adequada para produção do calo durante a união, estágio fisiológico do porta-enxerto, contaminação por vírus, pestes e doenças (HARTMANN et al., 2002), ou seja, durante o processo de união não há proliferação de calos na região de contato e conseqüentemente não ocorre diferenciação das células para regeneração do sistema vascular. O autor ainda descreve que o processo da união entre os tecidos ocorre entre

o segundo e sétimo dia havendo constante divisão de células parenquimatosas formando calo tanto no enxerto como no porta-enxerto e possivelmente após o 12º dia ocorre a produção do sistema vascular.

Esses resultados estão de acordo com as afirmações de Gonçalves (1982) que quanto mais juvenil for o material propagado maior será o surgimento de brotações devendo-se ao fato que a morfogênese expressar-se mais facilmente nesses tecidos.

## **4.2 Micropropagação**

### **4.2.1 Resgate do meristema**

Apesar desta etapa ser a mais problemática para à cultura de tecidos, especialmente se tratando de lenhosas, aproximadamente 84% dos meristemas para cada tratamento sobreviveram sem contaminação e/ou oxidação, não havendo diferenças relacionadas ao tipo de material genético utilizado. Esse aumento no índice de aproveitamento de 60% (dados não divulgados) pode ser devido ao uso de carvão ativado (3%) ao meio de cultura evitando oxidação dos explantes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o uso de carvão ativado é benéfico às culturas *in vitro*, por reter parte de todos os elementos que compõem o meio, fixando citocininas residuais trazidas nos tecidos das plantas e absorvendo compostos tóxicos inibidores do processo de morfogênese em muitas espécies.

Dentre os inibidores, merecem destaque os fenólicos que intervêm na resposta morfogênica seja em antagonismo com os reguladores de crescimento ou como inibidor de reações metabólicas. Na cultura *in vitro*, estes compostos são liberados no meio e se oxidam, provocando injúrias e algumas vezes morte dos explantes, principalmente quando se trata do uso de explantes de material adulto.

Um dos maiores problemas para na propagação *in vitro* de espécies lenhosas é a presença de compostos fenólicos que atuam como inibidores de enzimas (GUPTA,

1980; SASCHA, 1998; GIRI; ANJANEYULU, 2004) diminuindo a resposta *in vitro* e inviabilizando a sobrevivência dos explantes. Outra forma de minimizar a ação dos compostos fenólicos é transferir os explantes para meio de cultura fresco em intervalos de 24 horas (DEVI; MUKHERJEE; GUPTA, 1994).

#### 4.2.2 Estabelecimento da cultura

Na tabela 2, pode-se observar um resumo da análise de variância para as variáveis analisadas nessa etapa do estudo. Houve significância tanto dos materiais genéticos quanto das concentrações de BAP, para todas as variáveis, com exceção da variável tamanho que não mostrou efeito do material genético. Não houve efeito da interação entre material genético e concentrações nas variáveis. Os explantes avaliados após 30 dias de cultivo mostraram resposta aos tratamentos. O aspecto geral dos explante pode ser observado na figura 5.

Tabela 2 – Resumo da análise de variação para número de folhas, número de nós e tamanho relativo aos explantes de *Tectona grandis* cultivados *in vitro* aos 30 dias de cultivo

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios    |                     |                     |
|-------------------|----|---------------------|---------------------|---------------------|
|                   |    | Número de folha     | Número de nó        | Tamanho             |
| Material genético | 2  | 22,33*              | 2,581*              | 12,08 <sup>ns</sup> |
| Doses             | 4  | 22,22*              | 1,619*              | 105,0*              |
| Mat. Gen. x Doses |    | 1,237 <sup>ns</sup> | 0,277 <sup>ns</sup> | 9,233 <sup>ns</sup> |
| Resíduo           | 48 | 48                  | 48                  | 48                  |
| F                 |    | 3,08                | 2,52                | 1,51                |
| CV (%)            | 43 | 43                  | 43                  | 43                  |

\* significativo pelo teste F,  $p = 0,05$ ; ns = não significativo

#### 4.2.1 Número de folhas, número de nós e tamanho dos explantes

Nota-se na tabela 3 que para todas as variáveis, não houve diferença entre os clones, mas estes diferiram da testemunha. O número de folhas não diferiu estatisticamente entre os clones, mas teve diferença da testemunha que apresentou 5 folhas em comparação a 3,4 e 3,0 para os clones A e B, respectivamente. Esta melhor resposta *in vitro* da semente, possivelmente é devido à maior juvenilidade do material. Segundo Hartmann et al. 2002, a juvenilidade deve-se ao fato que os meristemas formaram-se em épocas mais próximas à germinação.

Tabela 3 – Número de folhas, de nós e tamanho dos explantes de *Tectona grandis* aos 30 dias de cultivo

| Material genético | Variáveis      |            |         |
|-------------------|----------------|------------|---------|
|                   | Num. de folhas | Num. de nó | Tamanho |
| Semente           | 5,0a           | 1,9a       | 7,8a    |
| Clone A           | 3,4b           | 1,5ab      | 8,0a    |
| Clone B           | 3,0b           | 1,2 b      | 6,6a    |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

Para número de nó, a testemunha sobressaiu aos demais materiais com valor médio de 1,9 nós diferindo do clone B. Enquanto o tamanho nos dois clones tiveram valores significativamente diferente.

Para Monteuis (1989), o processo de maturação em plantas seminais inicia-se com o desenvolvimento de uma pequena região de células meristemáticas derivadas da porção apical do embrião. Ainda ressalta que todos os órgãos que serão originados dessa porção apresentarão características que foram previamente determinadas nas células no meristema. Os meristemas apicais desde a embriogênese possuem capacidade de resposta juvenil diminuindo com o desenvolvimento ontogenético da árvore.

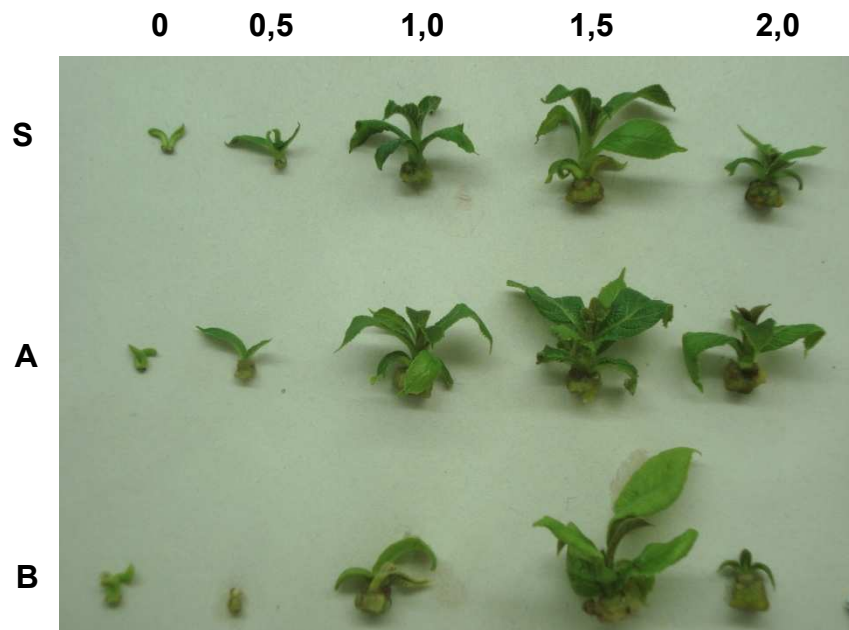


Figura 6 - Aspecto geral dos explantes de *Tectona grandis* após 30 dias de cultivo submetidos às concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>); S = semente; A = clone A ; B = clone B

O uso de BAP no meio de cultura tem sido eficaz para promover a multiplicação *in vitro* de espécies lenhosas estimulando o desenvolvimento das brotações laterais inibidas pela dominância apical (GYVES et al, 2007).

Na tabela 4, verifica-se que as maiores médias para número de folha foram obtidas quando aumentou-se a concentração de BAP no meio de cultura. Na concentração de 2,0 de BAP, houve maior resposta no desenvolvimento das folhas com média de 4,6 folhas. Esse valor foi significativo estatisticamente quando comparado com a testemunha. Resultado similar foi encontrado por Gradaille et al., (2000) que obteve 4,8 folhas por explante de teca utilizando meio MS acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP. O menor valor foi conseguido com o tratamento de 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP não diferindo da testemunha. Não houve diferença significativa entre as dosagens de 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.



Tabela 4 - Número médio de folhas, nós e tamanho dos explantes de *Tectona grandis* aos 30 dias de cultivo em de cultivo com diferentes concentrações de BAP

| Concentrações (mgL <sup>-1</sup> ) | Variáveis      |            |              |
|------------------------------------|----------------|------------|--------------|
|                                    | Num. de folhas | Num. de nó | Tamanho (mm) |
| 0                                  | 2,0 c          | 1,0 b      | 4,1 b        |
| 0,5                                | 2,5 bc         | 1,0 b      | 3,8 b        |
| 1,0                                | 4,3ab          | 1,6ab      | 8,6ab        |
| 1,5                                | 4,3ab          | 1,8a       | 10,7a        |
| 2,0                                | 4,6a           | 1,6ab      | 7,7ab        |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

Para a variável número de nó, o melhor desenvolvimento foi conseguido tanto com tratamento 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP quanto com 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, porém não diferem da testemunha. O tamanho do explante também seguiu uma tendência, tendo maior tamanho no tratamento com 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP atingindo 10,7 mm diferindo da testemunha. Redução no tamanho e má formação das folhas foram observadas com houve aumento da dosagem para 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Diferentemente, Muñoz et al. (2005) conseguiram 100% de indução de gemas em segmentos nodais de teca utilizando 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP reduzindo para 88% quando utilizou concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998) concentrações altas podem apresentar toxidez à cultura, redução de alongamento das plântulas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a problemas na fase de enraizamento, além de aumentar o risco de variação somaclonal (Monteuuis, 1998).

No geral, nota-se uma relação crescente da dosagem de BAP com as variáveis analisadas (Figura 6). Verifica-se que o desenvolvimento dos explantes nas variáveis dependentes, atinge o máximo, sem comprometimento da cultura, na dosagem de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>. Redução de 100% para 88% na taxa de multiplicação foi observada quando aumentou de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> para 5,0 mg.L<sup>-1</sup> a concentração de BAP respectivamente (ABDELNOUR; MUNOZ, 2005).

Partindo desse resultado definiu-se a concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP como padrão para a etapa seguinte.

#### 4.2.3 Multiplicação/rejuvenescimento

Nesta etapa do experimento avaliou-se o desenvolvimento de brotos nos sucessivos subcultivos com o objetivo de verificar se os tratamentos estavam influenciando na resposta morfogênica.

Com o aumento do número de subcultivos, houve diminuição das brotações no clone B, o que justificou uma avaliação dos dados até o segundo subcultivo com os três materiais genéticos (Tabela 5). A partir do terceiro subcultivo o clone não dispunha de brotações suficientes para repetições. Dessa maneira, deu-se continuidade ao experimento com a testemunha e o clone A sendo feito a próxima avaliação na quinta repicagem seguida do teste de enraizamento.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para número de brotos relativo aos tratamentos material genético e repicagens no 2º subcultivo in vitro de *Tectona grandis*

| Fonte de variação      | GL | Número de brotos |          |
|------------------------|----|------------------|----------|
|                        |    | Quadrado médio   | F        |
| Material genético      | 2  | 11,09            | 1,028 ns |
| Repicagens             | 1  | 3,211            | 0,297 ns |
| Mat. Gen. x repicagens | 2  | 3,421            | 0,317 ns |
| Resíduo                | 9  | 10,79            |          |
| CV(%)                  | 48 |                  |          |

<sup>ns</sup> não significativo

Observa-se na tabela 5 que não diferença estatística entre os tratamentos até esta etapa.

Sabe-se que qualquer célula vegetal por meio da totipotência são capazes de formar uma planta completa quando submetidas à estímulos adequados, no entanto, existem diferenças na resposta morfogênica dentro e entre famílias. O processo morfogênico além de ser resultado da divisão celular e posteriormente de diferenciação depende basicamente da atividade e expressão de certos genes. Os quais são afetados por eventos externos, sendo impossível caracterizar um fator específico para cada fenômeno morfogênico que leva á resposta diferenciada dentro da espécie. Essa

particularidade de cada material genético pode explicar a falta de competência do clone B à resposta aos tratamentos.

Diminuição na resposta ao enraizamento de brotações obtidas de sementes de maçã germinadas *in vitro* foi observada após o terceiro subcultivo. Segundo Klerk (2002), tanto o rejuvenescimento quanto a maturação pode ocorrer durante a micropropagação. Sendo evidente a maturação quando material de semente é utilizado no cultivo.

Na quinta repicagem, foi realizada novamente análise dos dados para variável número de brotos e tanto os materiais genéticos quanto as repicagens tiveram resultados estatisticamente significativos (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para número de brotos relativo aos tratamentos material genético e subcultivos no 5º subcultivo *in vitro* de *Tectona grandis*

| Fonte de variação      | GL | Número de brotos |            |
|------------------------|----|------------------|------------|
|                        |    | Quadrado médio   | F          |
| Material genético      | 1  | 175,15           | 108,661 ** |
| Subcultivos            | 4  | 8,06             | 5,002 **   |
| Mat. Gen. x repicagens | 4  | 8,40             | 5,215 **   |
| Resíduo                | 4  | 1,61             |            |
| CV(%)                  | 11 |                  |            |

\*\* Significativo pelo teste F,  $p < 0,0001$

O aspecto geral das brotações durante o experimento pode ser observado na Figura 7. O início da brotação foi observado aproximadamente após o 21º de cultivo para os tratamentos, não havendo diferença quanto o material genético.

Diferentemente, desses resultados, GIVES et al. (2007) reportou início de desenvolvimento em explantes de *Tectona grandis in vitro* entre sete e dez dias, além disso observou o desenvolvimento de calo na base do explante, o que também foi observado no material estudado, porém a presença de calo não dificultou o alongamento das brotações. O que é considerado comum para a espécie quando cultivada *in vitro* mesmo na ausência de auxinas no meio de cultura.

Daquinta et al (2002) também obtiveram plântulas com desenvolvimento de calos utilizando como meio base o MS com  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de TDZ. Os autores notaram que os calos oriundos de explantes internodais apresentavam-se compactos, endurecidos o que pode relacionar com material não morfogênico. Entretanto calos provenientes de colitédones apresentavam-se friáveis e com características morfogênicas por se tratar de material juvenil.



Figura 7 - Aspecto geral dos explantes de *Tectona grandis* após 30 dias de cultivo submetidos às condições *in vitro*

Não foi observado diferença entre os subcultivos na testemunha, porém no clone A houve diferença entre os subcultivos. Apresentando melhor resultado no terceiro, quarto e quinto subcultivos quando comparado ao primeiro e segundo. O aumento de sete brotos no primeiro subcultivo para nove no segundo mostra uma tendência de aumento de brotações com os subcultivos sucessivos evidenciando maior competência para formação das brotações (Tabela - 7).

Tabela 7 - Número médio de brotos de *Tectona grandis* produzidos em cada subcultivo

| Material genético | Número de brotos |       |      |      |      |
|-------------------|------------------|-------|------|------|------|
|                   | Subcultivos      |       |      |      |      |
|                   | 1º               | 2º    | 3º   | 4º   | 5º   |
| Semente           | 5aB              | 7,5aA | 5aB  | 6aB  | 6aB  |
| Clone A           | 7bA              | 9bA   | 12aA | 12aA | 12aA |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ); Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

O número de brotos na testemunha a partir do segundo subcultivo teve um aumento, voltando a diminuir no terceiro e estabilizando a partir do quarto. O clone também aumentou o número de brotações, de nove no segundo para treze no terceiro, mantendo-se com esse número nos subcultivos seguintes.

Greenwood (1995) trabalhando com *Pinus pinastere* verificou que à medida que os meristemas iam sendo subcultivados em meio acrescido de BAP e baixa concentração de sacarose favorecia o aparecimento de características juvenis e o taxa de multiplicação passou de 1,5 na segunda repicagem para 3,3 na terceira, chegando a 5.4 após a quarta repicagem. Com este resultado, percebeu que os subcultivos rejuvenesciam o material mesmo sem o uso de citocininas externa.

Gives et al., (2007) desenvolvendo protocolo para propagar comercialmente *Tectona grandis* conseguiu maior taxa de multiplicação de 3.8 brotos por explante e atribuiu o resultado ao meio MS acrescido de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Tiwari et al., (2002) utilizando segmentos nodais de teca de 45 anos de idade conseguiu média de 5,76 brotos por explantes com tamanho médio de 3,7 cm sob efeito de BAP ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e AIA ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

A mesma dosagem BAP ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) combinado com AIA ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura teve significância estatística na multiplicação *in vitro* de matrizes adultas com 60 anos de idade resultando em 6,33 brotos por explante quando comparado à testemunha que obteve 1 broto sem adição de reguladores ao meio (SHIRIN; RANA; MANDAL, 2005).

O comportamento no aumento das brotações à medida que aumentava o número de subcultivos pode ser observado na figura abaixo (Figura 8).

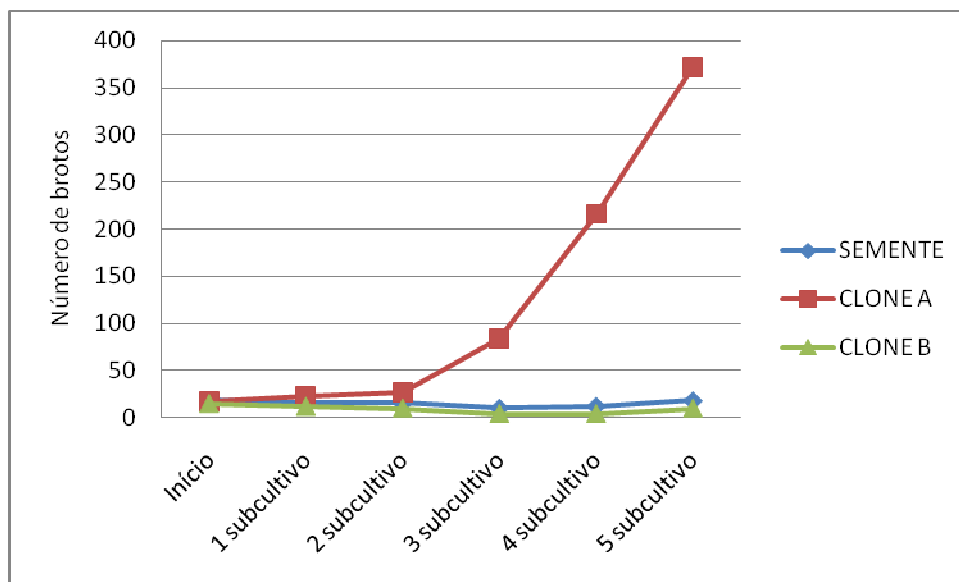


Figura 8 – Número de brotações de *Tectona grandis* produzidos em cada subcultivo aos 150 dias de cultivo *in vitro*

De acordo com a literatura, o tratamento mais usado para rejuvenescimento é o subcultivo dos explantes *in vitro* (FRANCLET, 1991; NAS, et al., 2003; HUANG, et al., 1990). Segundo eles, a memória da “ortet” trazida com o explante no momento da coleta diminui progressivamente com o subcultivos *in vitro*. Ocorre uma reprogramação responsável pelo rejuvenescimento das células a qual é passada para o subcultivo seguinte minimizando a força que a ortet exerce sobre o explante levando ao rejuvenescimento (BECK, 1998; HAMMATT; GRANT, 1993).

Essa resposta morfogênica obtido nos resultados justifica o grau de juvenilidade adquirido pelo material ao longo dos subcultivos. Giovanelli & Giannini (1999) declaram que na ausência de marcadores bioquímicos e/ou moleculares para determinação do grau de juvenilidade, o vigor das brotações e o aumento na capacidade enraizamento podem ser usados como padrão na comparação do grau de rejuvenescimento.

#### **4.3 Enraizamento**

A idade do material vegetal tem fundamental importância na resposta ao enraizamento das estacas. Estacas juvenis enraízam facilmente. Os termos “fácil de enraizar” e “difícil de enraizar”, citado anteriormente, foi usado por Ballester et al., (1999) para designar material juvenil e maduro, respectivamente de *Castanea sativa*.

Essa capacidade diminui com a idade com o aumento da idade do material. Por isso se faz necessário o rejuvenescimento de matrizes adultas para clonagem. Também é necessário estabelecer marcadores para identificar o estado de juvenilidade adequado nos ramets no momento da coleta.

No quinto subcultivo, foi realizado teste de enraizamento para o clone A sendo conseguido 52% de enraizamento das microestacas. Como o percentual estabelecido foi de 60% deu-se continuidade aos subcultivos sendo realizado o sexto e sétimo subcultivos.

Resultados similares foram encontrados por Monteuuis (1991) trabalhando de *Sequoiadendron giganteum* de 100 anos de idade, não obteve diferença significativa na

taxa de enraizamento entre clones juvenis (46,1%) e clones rejuvenescidos (44,3%)

No sétimo subcultivo obteve-se percentagem de enraizamento de 70% das microestacas com uso de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB aos 28 dias após plantio.

A parte aérea das microestacas apresentou tamanho médio de 5,4 cm. O tamanho médio das raízes foi de 7,3 cm e apresentavam número médio de nós de 4. Essas características foram variáveis com observado na figura 9.



Figura 9 – Aspecto das microestacas de *Tectona grandis* após 28 dias de plantio

A baixa concentração de auxina utilizada nas microestacas juntamente com a concentração endógena foi suficiente para induzir raízes adventícias. Segundo Greenwood (2001), a competência das células em iniciar divisões celulares para formar meristemas radiciais é mais limitante do que o nível de auxina.

Segundo Husen & Pal (2006) a necessidade de indutor de enraizamento como auxinas exógenas aumenta com a idade do material, isso porque o nível endógeno diminui com a idade ou diminui a sensibilidade dos tecidos aos promotores de enraizamento e/ou há acúmulo de inibidores de enraizamento.

O autor testou estacas de *Tectona grandis* com 15 e 30 anos de idade obtendo



enraizamento usando 2000 e 4000 mg.L<sup>-1</sup> AIB respectivamente. Além do enraizamento, o número de raízes por estaca, o tamanho das raízes e a percentagem de brotação foi maior em estacas juvenis com dois meses de idade do que naquelas com 15 e 30 anos. Isso ratificou o rejuvenescimento das microestacas conseguido neste estudo, pois obteve-se percentagem de

#### 4.4 Minijardim clonal

As etapas da produção de mudas clonais de *Eucalyptus* no Brasil via estaquia, é praticamente a mesma desde o início da propagação massal. As matrizes são propagadas e plantadas em áreas de testes clonais, para determinar a adaptabilidade e a superioridade desejável em diferentes sítios, e para se conhecer a melhor interação entre genótipo e ambiente (Campinhos, 1987). Os melhores clones, após a avaliação dendrométrica e qualidade da madeira, são selecionados para o uso em programas comerciais de reflorestamento. As matrizes selecionadas são plantadas em jardins clonais num espaçamento reduzido para a produção de estacas. Nos últimos 20 anos, os jardins clonais, tiveram uma evolução muito grande na forma, com a redução da área, aumento da produtividade e redução do tamanho da estaca dando origem aos minijardins clonais (HiGASHI et al., 2002).

Como continuidade do estudo, foi avaliado o potencial do material rejuvenescido no estabelecimento de minijardim de teca (Figura 10). O que até o momento não se tem referência bibliográfica sobre esse tipo de método de produção para *Tectona grandis*.



Figura 10 – Aspecto das minicepas de *Tectona grandis* em hidroponia em canalhetão

Dentre os métodos de produção de mudas em escala comercial, a miniestaquia sobressai à micropropagação, não somente pelo menor custo de produção, mas também pelo maior controle de irrigação e nutrição das minicepas, maior velocidade de enraizamento e menor tempo de rustificação uma vez que as cepas estão aclimatadas em condições semelhantes as que irão ficar durante o processo de rustificação diminuindo o estresse.

Entretanto, na estaquia convencional o percentual de enraizamento de alguns clones é geralmente baixo. Outro inconveniente é a ocorrência de grandes variações na capacidade de enraizamento entre clones, além da possibilidade ocorrência da redução gradual do potencial de enraizamento com o envelhecimento ontogênico das matrizes. Desse modo, justifica-se a necessidade de ser ter Laboratório de Micropropagação para rejuvenescimento das matrizes e introdução de novos clones para uso no minijardim.

Na figura 11 tem-se uma visão geral da produtividade do minijardim de teca em três meses de coleta. Entende-se por produtividade o número de estacas coletas por

mês por cepa.

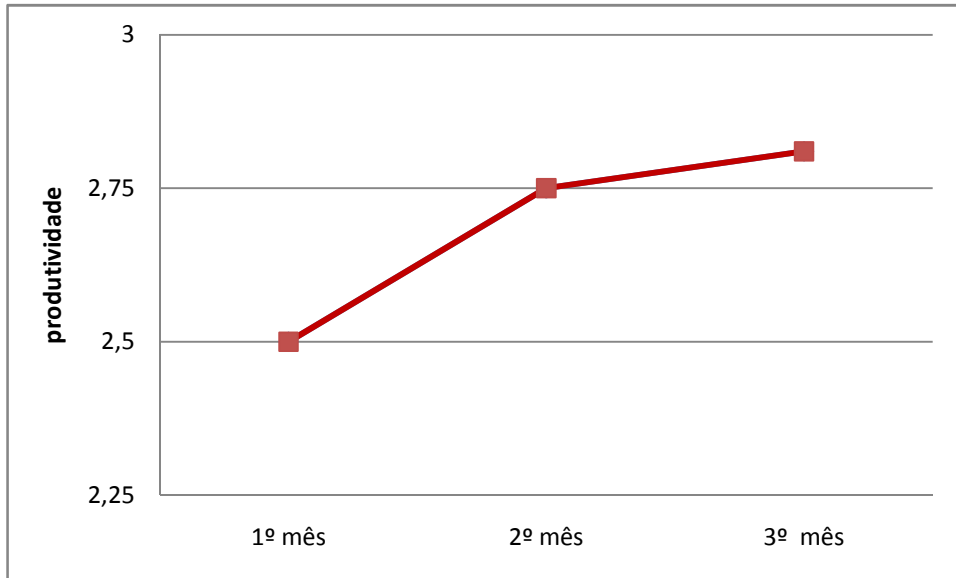


Figura 11 – Produtividade de minijardim de *Tectona grandis* em hidroponia em canalhetão

Há necessidade de estudos em nutrição mineral para determinar a concentração adequada de cada nutriente visando maximizar a produção do minijardim.

## CONCLUSÕES

- A cultura de meristema apical de *Tectona grandis* foi uma via eficaz para introdução *in vitro* e rejuvenescimento.
- A concentração de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP foi a mais adequada para estabelecimento da cultura *in vitro* de *Tectona grandis*.
- Foram necessários aproximadamente 10 meses e 7 subcultivos para rejuvenescimento de matrizes adultas de *Tectona grandis*.
- Foi possível o estabelecimento de minijardim clonal de *Tectona grandis* mediante uso de brotações rejuvenescidas *in vitro*.
- A enxertia seriada não apresentou resultado adequado para análise e conclusão.



## REFERÊNCIAS

ABDELNOUR, A.; MUNOZ, A. Micropropagación de teca (*Tectona grandis*). Kurú: **Revista Forestal**, San José, v. 2, n. 5, p.1-11, 2005.

ALFENAS, A.C. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.

BALLESTER, M.C.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIDAL, N.; FERNÁNDEZ-LORENZO, J.L.; VIEITEZ, A.M. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. **Annals of Botany**, London, v.83, p.619-629, 1999.

BECK, S.L.; DUNLOP, R.; STADEN, van J. Rejuvenation and micropropagation of adult *Acácia mearnsii* using coppice material. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.26, p.149-153, 1998.

BONAL, D.; MONTEUUIS, O. *Ex vitro* survival, rooting and initial development of *in vitro* rooted vs unrooted microshoots from juvenile and mature *Tectona grandis* genotypes. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.46, n.5, p. 301-306, 1997.

BONGA, J.M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Tissue culture in forestry**. Boston: Martinus Nijhoff, Dr W Junk Publishers, 1993. p.387-412.

BOULAY, M. **Multiplication rapide du Sequoia sempervirens en culture in vitro**. Ann. AFOCEL, 1978. p.36-65.

BRAND, M.H.; LINEBERGER, D. In vitro rejuvenation of *Betula* (Betulaceae): morphological evaluation, **American Journal of Botany**, Columbus, v.79, n.6, p.618-625, 1992.

COSTA, M.P.; LAMEIRA, O.A.; PANTOJA, S.S.P. Enraizamento em microestacas de teca (*Tectona grandis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.,;CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003. Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p. 159.

CID, L.P.B. Citocininas em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: CID, L.P.B. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188p.

DAQUINTA, M.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; ESCALONA, M. Morfogénesis *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L). **Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales**, Madrid, v. 11, n. 1, p. 137-144, 2002.

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D. ESCALONA, M. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.). Comunicación técnica. **Revista Forestal Centroamericana**, Turrialba, v.35, p.25-28, 2000.

DEVI, Y.S.; MUKHERJEE, B.B.; GUPTA, S. Rapid cloning of elite teak (*Tectona grandis* Linn.) by *in vitro* multiple shoot production. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.32, p.668-671, 1994.

DOMONEY, C.; TIMMIS, J.N. Ribosomal RNA gene redundancy in juvenile and mature ivy (*Hedera helix*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford. v. 31, p.1093-1110, 1980.

DOORENBOS, J. Rejuvenation of *Hedera helix* in graft combinations. Preb. 115, Wageningen, 1953.

ENTERS, T. Site, technology and productivity of teak plantations in Southeast Asia. **UnasyIva**, Roma, v.51, p.61, 2000.

FRANCLET, A. **Propagation by cuttings of resinous trees and other difficult species**. 2<sup>nd</sup> ed. Rome:FAO/IVFRO, 1969. v.2 p.1304-1313.( World consult. For Tree Breeding v.4,)

FRANCLET, A. Biotechnology in "rejuvenation": hope for the micropropagation of difficult Woody plants. **Acta Horticulturae**, Hague, v.289, p.273-289, 1991.

GERA, M.; GERA, N.; SINCH, V.K. Rooting response of root cuttings of some mpt species under low cost mist conditions. **Indian Forester**, DehraDun, v.126, p.171-174, 2000.

GIOVANNELI, A; GIANNINI. Reinvigoration of mature chestnut (*Castanea sativa*) by repeated graftins and microporpagation. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, p. 1243-1248, 1999.

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

GOH, D.K.S.; GALIANA, A. Vegetative propagation of teak. **JIRCAS working Report**, Tsukuba, n.16, p.35-43, 2000.

GOH, K.S; MONTEUUIS, O. About the use of clones in teak. **Bois et Forêts des Tropiques**, Nogent-Sur-Marne, v.3, n.285, p. 5-15, 2005.

GONÇALVES, AN. **Reversão a juvenilidade e clonagem de Eucalyptus urophylla S. T. Blake "in vitro"**. 1982. 92 p. Tese (Tese de Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

GRADAILLE, D.M.; RAMOS, L.; LEZCANO, Y.; RODRIGUEZ, R.; ESCANOLA, M. Algunos elementos en la micropropagación de la Teca. **Biotecnología Vegetal**, Cuba, v.1, p.39-44, 2000.

GRANT, N.J.; HAMMATT N. Apparent rejuvenation of mature wild cherry (*Prunus avium* L.) during micropropagation. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v.141, p.341-346, 1993.

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

GREENWOOD, M.S. Rejuvenation of forest trees. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 6, p.12, 1987.

GREENWOOD, M.S. Juvenility and maturation in conifers. current concepts. **Tree Physiology**, Victoria, v. 15, p. 433-438, 1995.

GUPTA, P.K.; NADGIR, A.L.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of Forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.17, p.259-268, 1980.

GYVES, E.M.; RUGINI J.I. E. Efficient method of micropropagation and in vitro rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. **Annual For. Science**, Nancy, v. 64, p.73-78, 2007.

HACKETT, W.P. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. **Horticultural Reviews**, New York, v.7, p. 109-155, 1985.

HACKETT, W.P., J.R MURRAY, SMITH, A.G. Control of maturation in woody species. HACKETT, WP. Juvenility and maturity. In: BONGA, JM; DURZAN, DJ (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. p. 216-148.



HAMMATT, N.; GRANT, N.J. Apparent rejuvenation of mature wild cherry (*Prunus avium* L.) during micropropagation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.141, p.341-346, 1993.

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

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L. de A.; GONÇALVES, A N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil**. Piracicaba: IPEF, 2000. 13 p. (IPEF Circular Técnica, 192).

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L. de A.; GONÇALVES, A.N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF, 2002. 21 p. (IPEF Circular Técnica, 194).

HUANG, L.C. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence In: TORRES, A.C. CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 252–264.

HUANG, L.C.; LIUS, S.; HUANG, B.L.; MURASHIGE, T.; MAHDI, E.F.; GUNDY, R. van, Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. **Plant Physiology**, Washington, v.98, p. 166-173, 1991.

HUSEN, A.; PAL, M. Clonal propagation of teak (*Tectona grandis* Linn. f.): Effect of IBA application and adventitious root regeneration on vertically split cuttings. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.52, p.173-176, 2003.

HUSEN, A.; PAL, M. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *New Forests*, Dordrecht, v.31, p.57-73, 2006. In: SYMPOSIUM OF MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES. AFOCEL and JTJFRO, 1992. Bordeaux. **Proceedings Biotecnologia Vegetal ...** Bordeaux.,1992. p.83-95.

HUSEN, A.; PAL, M. Effect of serial grafting and etiolation on rejuvenation and rooting cuttings of mature trees of *Tectona grandis* Linn. f. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.52, n.2, p.84-88, 2003.

INSTITUTO DE PESQUISA FLORESTAL. Disponível em:  
<<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>>. Acesso em: 17 dez. 2005.

KAOSA ard, A.; SUANGTHO, V.; KJAER, E.D. Experience from tree improvement of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. **Technical Note Danida Forest Seed Centre**. Denmark, Hoersholm, v.50, 8p, 1998.

KEIDING, H.; BOONKIRD, S. Propagación vegetativa de la teca. **Unasylla**, Roma, v.14, n.4, p.197-198, 1960.

KLERK, G.J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In vitro Cellular Development. Biology Plant**, Columbia, v.38, p.415-422, 2002.

KUMAR, A. Teak seed improvement – achievements and problems. **India Forester**, Dehra Dun, v.118, 525-533, 1992.

KUSHALKAR, R.; SHARON, M. Direct and indirect somatic embryogenesis in teak (*Tectona grandis* L). **Current Science**, Bangalore, v. 71, n.9, p.712-715, 1996.

LAHIRI A.K. Preliminary study on rooting of Green Wood cutting of teak. **The Indian Forester**, Dehra Dun, v.100, n.9, p.559-560, 1974.

LAHIRI A.K. A note on possibilities of mound layering of teak. **The Indian Forester**, DehraDun, v.111, n.10, p.870-871, 1985.

MASILAMANI, P.; DHARMALINGAM,C. Germination improvement in teak (*Tectona grandis* Linn. f.) through forced ageing. **Current Science**, Bangalore, v. 75, n. 4, p.356, 1998.

MELLO, H.A. Alguns aspectos da introdução da teca (*Tectona grandis* L.) no Brasil. **Anuário Brasileiro de Geografia Florestal**, v.15, n.15, p.113-119, 1963.

MONTEUUIS, O. Maturation concept and possible rejuvenation of arborescent species. Limits and promises of shoot apical meristems to ensure successful cloning. **In: \_\_\_\_\_ Breeding tropical trees: Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry**. Oxford,1989. p.106-118.

MONTEUUIS, O. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments. **Physiologia Plantarum**, Conpenhagem, v.81, p. 111-115, 1991.

MONTEUUIS, O.; GOH, D.K.S. Clones de teck. **Bois et forêts des tropiques**, Nogent-sur-Marne, v.261, n.3, p.28-36, 1999.

MONTEUUIS, O.; GOH, D.K.S. Clones de teck. **Bois et forêts des tropiques**, Nogent-sur-Marne, v.261, n.3, p.28-36, 1999.

MONTEUUIS, O.; BON, M-C.; GOH, D.K.S. Teak propagation by *in vitro* culture. **Bois et Forêts des Tropiques**, Nogent-sur-Marne, v. 256, p.43-53, 1998.

MUZIK, T.J.; CRUZADO, H.J. Transmission of juvenile rooting ability from seedling to adults of *Hevea brasiliensis*. **Nature**, London, v.181, n. 4618, p.1288, 1958.

NAS, MEHMET NURI.; READ, P. E.; RUTTER, A. PHILIP. In vitro “Rejuvenation” of Woody Species is temporary. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 625 p. 211-215, 2003.

NAUTIYAL, S.; RAWAT, M.S. Macropropagation of teak (*Tectona grandis* L.F). **Indian Forester**, Dehra Dun, v.120, p.147-151, 1994.

NAUTIYAL, S.; SINGH, U.; GURUMURTI, K. Rooting response of branch cuttings of teak (*Tectona grandis*) as influenced by season and growth hormones. **Indian Forester**, Dehra Dun, v.117, n.4, p.249-255, 1991.

NAUTIYAL, S.; SINGH, U.; GURUMURTI, K. Rooting response of branch cuttings of teak (*Tectona grandis*) as influenced by growth hormones and position of the cutting on the crown. **Indian Forester**, Dehra Dun, v.118, p.112–121, 1992.

PALANISAMY, K.; SUBRAMANIAN, K. Vegetative propagation of mature teak trees(*Tecton grandis* L.). **Silvae Genética**, Frankfurt, v. 50, n. 5/6, p. 188-191, 2001.

PERRIN, Y.; DOUMAS, P.; LUDOVICK, L. CARRON, M.F. Endogenous cytokinins as biochemical markers of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) clone rejuvenation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, p.239-245, 1997.

RATHORE, T.S.; SINGH, R.P.; SHEKHAWHAT, N.S. Clonal propagation of desert teak (*Tecomella undulata*) through tissue culture. **Plant Science**, Ireland, v.79, p.217-222, 1991.

ROBINSON, L.W.; WAREING, P.F. Experiments on the juvenile-adult phase change in some woody species. **New Phytologist**, London, v.68, p.67-78, 1969.

SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal Forest Research**, Tokyo, v. 10, p. 465-469, 2005.

SILVA, A.A. **Morfogênese “in vitro” de diferentes tipos de explantes em progênies de *Pinus caribaea* Morelet var. hondurensis Barr. et Golfari**, 1989. 149 p. Piracicaba, 1989. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVTCULTURA Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/>>. Acesso em: 21 mar. 2006.

SUBRAMANIAN, K.N.; NICODEMUS, A.; RADHAMANI, A. Teak improvement in Índia. **Forest Genetic Resources**, Roma, n.22, p.33-36, 1994.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

TIWARI, S.K.; TIWARI, P.K.; SIRIL, EA. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, p. 1-6, 2002.

UNIYAL, D.P.; RAWAT, M.S. Effect of temperature and relative humidity on grafting and budding of teak (*Tectona grandis* LINN. F). **Indian Forester**, Dehra Dun, v.121, p.510-513, 1995.

VAKSHASYA R.K.; RAWAT, M.S. Evaluation of budding and field planting periods for teak seed orchard establishment. **Indian Forester**, Dehra Dun, v.111, n.5, p.328-332, 1985.

VALDÉS, A.N.; CENTENO, L.M.; ESPINEL, S.; FERNÁNDEZ, B. Could plant hormones be the basis of maturation indices in *Pinus radiata*? **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v.40, p.211-216, 2002.

VIEIRA, H.A.; MARTINS, E.P.M.; PEQUENO, P.L.L.; LOCATELLI, M. **Aspectos silviculturais da teca (*Tectona grandis* L.) em Rondônia**. Porto Velho, 2002. 15 p. (Documentos EMBRAPA, 68).

VIET, L.F. Teca uma visão geral. **Revista da madeira**, São Paulo, v.5, n.30, p.24-26, 1996.

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

ZIMMERMAN, R.H; HACKETT, W.P.; PHARIS, R.P. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. **Plant Physiology**, Washington, v.11, p.79-115, 1985.