

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E PROPAGAÇÃO DE
Cordia trichotoma (Vell.) Arrabida ex Steudel
(LOURO-PARDO)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tiago Antonio Fick

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E PROPAGAÇÃO DE *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (LOURO-PARDO)

por

Tiago Antonio Fick

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin, PhD.

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
iii	17	Jussara	Juçara

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a dissertação de mestrado

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E PROPAGAÇÃO DE *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (LOURO-PARDO)

Elaborada por
Tiago Antonio Fick

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dilson Antônio Bisognin, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Profa. Dra. Jussara Terezinha Paranhos (UFSM)

Profa. Magali Ferrari Grando, PhD. (UPF)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida. A meus pais, Alfredo e Maria, pelo incentivo e dedicação à minha formação. À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida. À Capes pela auxílio financeiro. Ao Prof. Dilson Antônio Bisognin, pela orientação, críticas e sugestões. À Prof.^a Lia Rejane Reiniger, pela orientação na elaboração do trabalho. Aos membros da Comissão Examinadora, pela análise e sugestões. Aos meus colegas e amigos Marlene, Micheli, Kênia, Marcos, Cleber, Fabrina, e a todos os colegas de laboratório, pelo apoio, ajuda e incentivo recebido. À querida Susane, pela alegria que traz a minha vida. Minha sincera gratidão a todos que, de alguma forma, fazem parte de minha vida, pela companhia ao longo da estrada de nossa existência.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E PROPAGAÇÃO DE *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (LOURO-PARDO)

AUTOR: Tiago Antonio Fick
ORIENTADOR: Dilson Antonio Bisognin
Data e Local da defesa: Santa Maria, 23 de julho de 2007

O setor florestal hoje enfrenta um grande desafio, atender à demanda por produtos madeireiros nobres, abastecido especialmente por espécies nativas brasileiras, dentre elas o louro-pardo. Nesse sentido, estudos de propagação que contemplem espécies nativas são necessários para garantir a produção de mudas de qualidade para plantios comerciais, reduzindo a pressão sobre as matas remanescentes. O objetivo deste estudo foi desenvolver protocolos de estabelecimento *in vitro* e de propagação de louro-pardo. Para o estabelecimento *in vitro*, estudou-se o efeito do tempo de embebição e de diferentes protocolos de desinfestação das sementes. A embebição se fez em água destilada e autoclavada por 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. Para a desinfestação, testou-se a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2 e 5%, por 0, 5, 10, 15 e 20 min. após 30 min de imersão em hipoclorito de sódio a 5%, retirada do tegumento e imersão em álcool etílico 70% por 30 s. Sementes sem tegumento foram inoculadas em meio de cultura para germinação. Foram avaliadas as porcentagens de desinfestação e germinação e o tempo médio de germinação. O crescimento de explantes de louro-pardo foi quantificado nos meios de cultura 1/2MS e WPM, pelo número de folhas e raízes primárias emitidas e comprimento da parte aérea e das raízes primárias, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. Para a multiplicação, foram testadas a adição ao meio de cultura WPM de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA) ou ácido giberélico (GA₃) nas concentrações de 0; 0,05; 0,10; 0,15 ou 0,20 mg L⁻¹ e a combinação de 0 ou 0,05 mg L⁻¹ de ANA com 0; 0,10 ou 0,20 mg L⁻¹ de GA₃. Foram avaliados o número de folhas e de entrenós e a altura das plântulas aos 30 dias de cultivo. Plântulas fornecedoras de segmentos nodais e ápices caulinares foram reidratadas com meio WPM líquido e mantidas *in vitro* como microcepas, para aumentar a taxa de multiplicação. Aos 21 dias após o primeiro e o segundo corte foi avaliado o número de brotações adventícias e de entrenós por microcepa. Miniestacas de 2,5 a 4; 4,01 a 5,5 e 5,51 a 7 cm foram submetidas à aplicação de 0 ou 1000 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB) por 10 s na base. Foram avaliadas as porcentagens de sobrevivência, enraizamento e formação de calos aos 60 dias. A embebição das sementes de louro-pardo por até 24 h favorece a retirada do tegumento sem afetar a desinfestação e germinação. A imersão das sementes com tegumento em NaOCl 5% por 30 min, retirada do tegumento e a imersão das sementes sem tegumento em solução de álcool etílico 70% por 30 s foram suficientes para a produção *in vitro* de plântulas assépticas. Plântulas de louro-pardo apresentaram melhor crescimento em meio de cultura WPM, sem a adição de reguladores de crescimento. A adição isolada ou combinada de reguladores de crescimento não aumentou a taxa de multiplicação *in vitro*. A manutenção de microcepas aumentou a taxa de multiplicação *in vitro* em até 1,75 vezes. Miniestacas de louro-pardo de 2,5 a 5,5 cm de comprimento apresentaram altos índices de sobrevivência, porém não enraizaram.

Palavras-chave: Multiplicação; micropropagação; miniestaca; microcepa; regulador de crescimento; espécies florestais.

ABSTRACT

Master Thesis
Graduate Program of Forest Engineering
Federal University of Santa Maria

ESTABLISHMENT *IN VITRO* AND PROPAGATION OF *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel

AUTHOR: Tiago Antonio Fick
ADVISER: Dilson Antonio Bisognin
Data and defense place: Santa Maria, July 23th, 2007

The Forest Sector has an accomplishment to attend the demand for noble wood products, usually get from native Brazilian species as louro-pardo. Therefore, propagation studies of native species are necessary to produce high quality plants for commercial exploitation and to reduce deforestation pressure over remained populations of native species. The objective of this study was to develop protocols of establishment *in vitro* and propagation of louro-pardo. Time of seed imbibition and disinfection protocols were studied for *in vitro* seedling establishment. Seeds were imbibed in distilled and autoclaved water for 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h. Seeds were immersed in a sodium hypochlorite solution of 5% for 30 min, submitted to tegument excision and immersed in a alcohol solution of 70% for 30 s. Disinfection was done in sodium hypochlorite solutions of 2 and 5% for 0, 5, 10 15 and 20 min. Seeds without tegument were then inoculated in medium culture for germination. Percentages of disinfection and germination and mean germination time were evaluated. Seedling growth was quantified in 1/2MS and WPM culture mediums. Number of emerged leaves and primary roots and length of shoots and primary roots were evaluated at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation. The addition to the WPM culture medium of 0; 0.05; 0.10; 0.15 or 0.20 mg L⁻¹ of 6-benzilaminopurin (BAP), naphthalene acetic acid (NAA) or gibberellic acid (GA₃) and the combination of 0 or 0.05 mg L⁻¹ of NAA with 0; 0.10 or 0.20 mg L⁻¹ of GA₃ were tested for propagation. At 30 days after inoculation, number of internodes and leaves and plantlet height were evaluated. Plantlets of seminal origin were also excised below or above the first true leaf and the microstumps maintained *in vitro* with liquid WPM added to the original medium to increase multiplication rate. Number of sprouts and internodes per microstump were evaluated at 21 days after first and second excision. Minicuttings from 2.5 to 4, 4.01 to 5.5 and 5.51 to 7 cm were treated with 0 or 1000 mg L⁻¹ of indol butyric acid (IBA) by basal immersion for 10 s. Survival and rutting percentage and callus formation were evaluated at 60 days after treatment. Imbibition of louro-pardo seeds until 24 hours made easy tegument excision without affecting disinfection and germination. Immersion of seeds with tegument in a sodium hypochlorite solution of 5% for 30 min, tegument excision and immersion in a alcohol solution of 70% for 30 s are enough for an acceptable production of *in vitro* aseptic seedlings. Louro-pardo seedlings grow satisfactorily in a WPM culture medium without growth regulators. The addition of growth regulators either isolated or combined to the WPM medium did not increase *in vitro* propagation. Maintaining microstump increased the *in vitro* multiplication rate in 1.75 fold. Minicuttings of louro-pardo from 2.5 to 5.5 cm showed high survival percentages, but they did not root. Protocols of plantlet acclimatization and clonal propagation by minicuttings should be developed to produce high genetic and physiological quality of louro-pardo plants.

Key words: Multiplication; micropropagation; minicutting; microstump; growth regulator; forest species.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição dos meios de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1981) e MS (Murashige e Skoog, 1962).....	22
TABELA 2 – Porcentagens de desinfestação e germinação e tempo médio de germinação (TMG ¹) de sementes de louro-pardo submetidas a pré-desinfestação (imersão em NaOCl 5% por 30 min), retirada do tegumento, imersão em álcool 70% por 30 s e diferentes tempos de imersão em NaOCl 2% ou 5%.....	32
TABELA 3 – Comprimento da parte aérea e de raízes adventícias principais, número de folhas e número de raízes emitidas em propágulos de louro-pardo, aos 28 dias após a inoculação em meio de cultura ½MS ou WPM.....	33
TABELA 4 – Desenvolvimento de explantes de <i>Cordia trichotoma</i> , na fase de multiplicação, após 30 dias de isolamento em meio WPM acrescido de 0.05, 0.10, 0.15 ou 0.20 mg L ⁻¹ de Ácido 6-indolbutírico (BAP), Ácido nafataleno acético (ANA), Ácido giberélico (GA ₃) ou sem a adição destes.....	41
TABELA 5 – Desenvolvimento de explantes de <i>Cordia trichotoma</i> , na fase de multiplicação, após 50 dias de isolamento em meio WPM acrescido de 0,00 ou 0,05 mg L ⁻¹ de Ácido nafataleno acético (ANA) e 0,00, 0,10 ou 0,20 mg L ⁻¹ de Ácido giberélico (GA ₃).....	42
TABELA 6 – Desenvolvimento de brotações em microcepas aos 21 e 42 dias (1 ^a e 2 ^a coleta) em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de Agar, 30 g L ⁻¹ de sacarose e 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado reidratado com WPM liquido sem carvão ativado.....	43
TABELA 7 – Desenvolvimento de entre-nós em brotações de microcepas aos 21 e 42 dias (1 ^a e 2 ^a coleta) em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de Agar, 30 g L ⁻¹ de sacarose e 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado reidratado com WPM liquido sem carvão ativado.....	43

TABELA 8 – Porcentual de sobrevivência de miniestacas de <i>Cordia trichotoma</i> aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L ⁻¹ de AIB por 10 s.....	44
TABELA 9 – Porcentual de sobrevivência de miniestacas de <i>Cordia trichotoma</i> classificadas em diferentes tamanhos, aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L ⁻¹ de AIB por 10 s.....	44
TABELA 10 – Porcentual de formação de calos em miniestacas de <i>Cordia trichotoma</i> aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L ⁻¹ de AIB por 10 s.....	45
TABELA 11 Porcentual de formação de calos em miniestacas de <i>Cordia trichotoma</i> classificadas em diferentes tamanhos, aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L ⁻¹ de AIB por 10 s.....	45

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Porcentagens de desinfestação e germinação e tempo médio de germinação (TMG) de sementes de louro-pardo submetidas a diferentes tempos de embebição em água destilada antes da pré-desinfestação (imersão em NaOCl 5% por 30 min), retirada do tegumento e imersão em álcool 70% por 30 s aos 30 dias após a inoculação em meio de semeadura, 7 g de Agar e 30 g de sacarose por litro de água destilada.....31
- FIGURA 2 – Germinação *in vitro* de sementes de louro-pardo submetidas a 12 h de embebição em água destilada, retirada do tegumento e imersão em álcool 70% por 30 s e inoculadas em meio de semeadura, 7 g de agar e 30 g de sacarose por litro de água destilada, e plântulas de louro-pardo aos 28 dias de crescimento em meio WPM na sua formulação completa33
- FIGURA 3 – Comprimento (cm) da parte aérea e das raízes adventícias principais, número de folhas e raízes emitidas em propágulos de louro-pardo cultivados em meio WPM ou 1/2MS.....34
- FIGURA 4 – Propágulo aos 28 dias de crescimento em meio de cultivo WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de Agar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, apto ao corte da parte aérea e formação da microcepa, microcepa aos 7 e 14 dias do 1^o corte, microcepa aos 21 dias do 1^o corte, apta para o segundo corte e microcepa aos 21 dias do 2^o corte.....40
- FIGURA 5 – Miniestacas enraizadas de louro-pardo submetidas à aplicação de 0 mg L⁻¹ (A) e 1000 mg L⁻¹ (B) de AIB após 60 dias de cultivo em telado.....45

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE	12
2.2 CULTURA DE TECIDOS	13
2.2.1 Resgate de matrizes.....	16
2.2.2 Descontaminação	16
2.2.3 Isolamento	17
2.2.4 Multiplicação	18
2.2.5 Enraizamento	21
2.2.6 Meios de cultura	22
2.2.7 Aclimatização.....	22
2.3 MINIESTAQUIA	23
CAPITULO 1 ESTABELECIMENTO E CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE PLÂNTULAS DE LOURO-PARDO	26
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.4 CONCLUSÕES	35
CAPITULO 2 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> DE LOURO-PARDO	36
4.1 INTRODUÇÃO	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.5 CONCLUSÕES	46
5 DISCUSSÃO GERAL	47
6 CONCLUSÃO GERAL	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento da economia sempre pressionou a ocupação das florestas para a produção de alimentos e pelo retorno econômico da madeira. A demanda por madeira no Brasil é estimada em valores superiores a 350 milhões de metros cúbicos, enquanto que a produção de florestas plantadas tem alcançado a produção de aproximadamente 90 milhões. Portanto, há um permanente déficit suprido por matas nativas (Ferreira e Galvão, 2000).

O maior desafio do setor florestal é justamente atender à demanda por produtos florestais, mantendo as áreas e conservando a qualidade das florestas nativas (Ferreira e Galvão, 2000). A conservação da biodiversidade e a manutenção das florestas devem ser efetuadas pela importância econômica, ecológica, ambiental, social e até mesmo estética. Os biomas naturais têm sido imensamente suprimidos pela ação antrópica, sendo o principal causador dos distúrbios ecológicos e demográficos nas diferentes espécies de seres vivos (Resende e Mauro, 2003).

A ampliação imediata de investimentos em plantios comerciais se justifica pela demanda por produtos madeireiros de qualidade. O uso de espécies exóticas, de rápido crescimento, não atende à demanda por madeira nobre (Carvalho, 2000), o que exige a instalação de bosques comerciais com espécies nativas, dependente da disponibilidade de mudas de alta qualidade genética e fisiológica (Carvalho, 2003). Os plantios comerciais de espécies nativas têm sido feitos com mudas produzidas a partir de sementes, que resultam em povoamentos heterogêneos e dificultam o manejo das árvores. Portanto, o melhoramento genético de espécies nativas é essencial, pois é improvável a existência de genótipos de alta qualidade genética que possam simplesmente serem propagados (Clement, 2001).

Cordia trichotoma (Vell.) Arriba ex steudel é um representante da flora brasileira bastante apreciado e procurado desde o início da colonização. A madeira tem grande aceitabilidade na construção de móveis e em acabamentos internos de construções e embarcações. Por isso, o louro-pardo vem sendo intensamente explorado em matas remanescentes. A espécie tem grande importância biológica, social e econômica para a agrosilvicultura e sistemas silvipastoris, uma vez que a árvore não apresenta competição sobre os campos naturais nem sobre as áreas cultivadas (Reitz et al., 1988; Scheeren, 2002).

A cultura de tecidos é uma pode ser aplicada através da micropropagação, conservação de germoplasma e na seleção de clones de espécies como o louro-pardo (Mantovani e Franco, 1998). A micropropagação permite um trabalho de forma contínua ao longo do ano, o que agiliza a propagação comparado com métodos convencionais (Grattapaglia e Machado, 1998). Portanto, o uso da cultura de tecidos para a multiplicação de genótipos superiores de louro-pardo, possibilitaria auxiliar futuros programas de melhoramento da espécie e agilizaria a instalação de bosques comerciais homogêneos, com alta qualidade genética.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos de estabelecimento *in vitro* e de propagação de *C. trichotoma* (louro-pardo).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição da espécie

Cordia trichotoma (*Boraginaceae*), tem ocorrência natural nas áreas tropicais e subtropicais do Brasil, Argentina e Paraguai (Carvalho, 1988). O gênero *Cordia* é uma homenagem ao médico alemão Euricius Cordus (1486-1535) e seu filho Valerius Cordus (1515-1544) (Marchiori, 2004), e o epíteto específico *trichotoma* alude ao estigma e significa “que está dividido em três partes” (Smith, 1970). É uma árvore do tipo caducifólia, comumente atingindo alturas entre 10-20 m e diâmetros à altura do peito de até 60 cm. Apresenta ramificação monopoidal quando jovem e dicotômica ou simpódica quando adulta. A copa pode chegar até 8 m de diâmetro, apresentando-se alongada, densifoliada e arredondada. Sua característica de formar tronco reto e fuste bem definido de 6 a 15 m de altura torna uma espécie de interesse na floresta (Carvalho, 2003). Quanto ao aspecto ecológico sucessional, trata-se de espécie secundária inicial, com tendência pioneira, sendo bastante comum na vegetação secundária, no estágio de capoeira e inclusive em capoeirões (Carvalho, 1994).

As folhas são do tipo polimorfos e apresentam formas extremamente variáveis na densidade do indumento (Rizzini, 1971). As flores são marcescentes, inicialmente brancas passando a pardas, com até 2 cm de comprimento. Formam panículas densamente ramificadas com cerca de 100 flores. O fruto é uma núcula de pericarpo, não muito espesso e seco, com cálice e corola persistente e marcescente, de coloração castanha, facilitando a identificação da espécie (Barroso et al., 1999; Carvalho, 2003).

A espécie apresenta florescimento entre os meses de fevereiro e abril e maturação dos frutos entre maio e julho. A semente possui dormência tegumentar e comportamento recalcitrante ao armazenamento, podendo perder a viabilidade já aos 60 dias. A germinação é do tipo epígea, geralmente irregular e com percentuais que variam entre 14% e 80% (Carvalho, 2003; Mendonça et al., 2001). A dispersão do fruto com a semente é do tipo anemocórica, ou seja, promovida pela ação do vento (Carvalho, 2003; 2004).

O louro-pardo é uma espécie comum nas florestas do Alto Uruguai, com distribuição bastante uniforme e freqüente nas matas mais abertas e capões dos campos da depressão central do estado do Rio Grande do Sul. A espécie ocorre até o Ceará, na floresta pluvial atlântica semidecídua, e no cerrado, com menor freqüência (Lorenzi, 1995). É uma das árvores mais promissoras para reflorestamentos. Bosques de louro-pardo quando bem manejados atingem incremento anual acima de $20 \text{ m}^3 \text{ há}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. A espécie é pioneira, apresentando um rápido crescimento inicial, com boa capacidade de regeneração em terrenos anteriormente utilizados para agricultura. Em rotação de 30 a 40 anos, no estado do Rio Grande do Sul, fornecem excelente madeira para tabuado (Reitz et al, 1988). Em solos de médio-alta fertilidade e associado a bons tratamentos silviculturais, é possível uma rotação inicial já aos 15 anos (Carvalho, 2003).

A madeira, moderadamente pesada e dura, é facilmente trabalhada inclusive para móveis vergados, sendo ainda de boa durabilidade em ambientes secos (Lorenzi, 1992).

2.2. Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos se define como sendo o cultivo de órgãos e tecidos (ou células) de vegetais em meio nutritivo, num ambiente asséptico e controlado (Paiva e Gomes, 1995). Envolve um conjunto de técnicas que, em geral, um explante é cultivado em meio nutritivo de concentração conhecida ou não (Sousa et al, 2006).

A importância da cultura de tecidos se deve aos ganhos obtidos com a silvicultura moderna e no enorme potencial de utilização em espécies pouco estudadas (Gamborg, 2002). As principais vantagens oferecidas pela cultura de tecidos na propagação vegetal são: a) um pequeno número de explantes pode ser utilizado para regenerar milhares de plantas; b) genótipos idênticos à planta matriz são produzidos; c) curto espaço de tempo requerido para produção de grandes quantidades de mudas; d) espaço físico mínimo em comparação aos métodos convencionais de propagação; e) eliminação de contaminantes (Sousa et al, 2006); e f) propagação contínua, independente de fatores ambientais e inerentes às diferentes épocas do ano (Grattapaglia e Machado, 1998).

Diversas técnicas de cultura de tecidos (Tabela 1) têm aplicações no melhoramento florestal e na propagação de espécies lenhosas cuja produção de mudas apresenta algum tipo de limitação. Um dos maiores benefícios é a possibilidade de identificar e fixar componentes aditivos e não-aditivos da variabilidade genética por meio da propagação clonal (George e Sherrington, 1984).

<p>Conservação e avaliação de germoplasma</p> <ul style="list-style-type: none"> – Conservação de germoplasma <i>in vitro</i> – Multiplicação de genótipos para análise
<p>Aumento de variabilidade genética</p> <ul style="list-style-type: none"> – Intercâmbio de germoplasma – Obtenção de variantes somaclonais – Obtenção de transformantes através da engenharia genética
<p>Aumento do ganho genético em programas de melhoramento</p> <ul style="list-style-type: none"> – Germinação de sementes e cultura de frutos <i>in vitro</i> – Clonagem de genótipos para teste de capacidade de combinação – Cultura de anteras e micrósporos para obtenção de haplóides – Limpeza clonal
<p>Introgessão de genes de interesse para espécies alvo através da quebra de barreiras de incompatibilidade genética</p> <ul style="list-style-type: none"> – Polinização <i>in vitro</i> – Cultura de embriões – Fusão de protoplastos – Haploidização por cultura de anteras

Quadro 1 – Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento de plantas

Fonte: adaptado de Ferreira et al. (1998).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação tem sido a de maior importância para o melhoramento florestal. O principal objetivo é acelerar a produção e aumentar o número de genótipos selecionados (Damião Filho, 1995). Além disso, a micropropagação possibilita manter genótipos híbridos, mutações ou variantes selecionados e propagar mudas de alta qualidade fitossanitária (Lima, 2000).

Para a micropropagação, o primeiro aspecto importante é a seleção da planta matriz (Damião Filho, 1995), seguido de três fases importantes (Murashige, 1974). Fase I: seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo, sob condições assépticas. Fase II: multiplicação dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos, em meio de cultura apropriado. Fase III: transferência das partes aéreas produzidas para meio de cultura com reguladores de crescimento indutores de raízes e a posterior aclimatização em condições *ex vitro*. Essas fases não precisam necessariamente serem seguidas e são adaptadas para cada espécie. Em alguns casos são também necessárias aplicações de tratamentos químicos na planta matriz antes da retirada dos explantes, caracterizando uma fase 0 (Grattapaglia e Machado, 1998).

Os processos morfogenéticos, divisão e diferenciação celular integrados, podem ocorrer em diferentes rotas: calogênese, organogênese e embriogênese somática. São processos que podem ser manipulados *in vitro*, na aplicação de diferentes técnicas de cultura de tecidos (Mantovani e Franco, 1998). O controle desses processos é interno, no próprio explante, ou externo, no meio de cultura, pela adição de reguladores de crescimento, e modificando a temperatura e luminosidade (Thorpe, 1980).

Os explantes mais indicados para a organogênese direta são as gemas axiliares e ápices caulinares, pois possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas inteiras. Contudo espécies lenhosas apresentam o problema da contaminação, por estarem longos períodos expostos às intempéries (Bonga, 1982) e assim sujeitos à infecção interna e externa por microorganismos difíceis de eliminar (Melo et al., 1998). Neste caso uso de sementes, facilita a obtenção de material vegetal asséptico através da germinação *in vitro* para desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* em espécies lenhosas (Noletto e Silveira, 2004; Andrade et al., 2000). O conhecimento de todos os processos é fundamental para controlar a organogênese *in vitro* e possibilitar a micropropagação de plantas selecionadas (Grattapaglia e Machado, 1998).

2.2.1 Resgate de matrizes

A cultura de tecidos tem apresentado muitas dificuldades em espécies florestais (Higashi et al, 2000). Para contornar esse problema no uso de material de plantas adultas selecionadas, deve-se buscar material fisiologicamente juvenil ou com rejuvenescimento da habilidade de desenvolver novas raízes (Hartney, 1980), denominada de resgate de matrizes (Alfenas et al, 2004). O rejuvenescimento do material adulto para o estágio juvenil pode ser alcançado pela poda drástica, de aplicações de citocininas e herbicidas, da propagação seriada via enxertia, da propagação seriada via estaquia e da micropropagação (Higashi, 2000). O rejuvenescimento de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) tem sido feito por meio da poda drástica (derrubada) das árvores, seguido da coleta de explantes aos 50-60 dias após. Para a micropropagação, o uso de técnicas de enxertia ou estaquia é outra opção para produção de explantes no viveiro, reduzindo a contaminação dos explantes (Alfenas et al, 2004).

2.2.2 Descontaminação

Outra dificuldade, nas plantas lenhosas para o estabelecimento *in vitro*, é a contaminação externa e/ou interna dos tecidos. São várias as substâncias de ação germicida que podem ser utilizadas na desinfestação de explantes. Os mais comuns são o etanol, compostos a base de cloro (hipoclorito de sódio ou de cálcio), cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio e peróxido de hidrogênio (Grattapaglia e Machado, 1998). Na desinfestação de segmentos nodais de louro-pardo, a imersão em álcool 70% por 30 segundos seguido de imersão em hipoclorito de sódio 10% por 5 min. tem apresentado bons resultados (Mantovani et al, 2001).

A enxertia e estaquia podem auxiliar a descontaminação. Os enxertos, provenientes das matrizes selecionadas, permanecem em ambiente protegido, no qual, além de ficarem menos expostos aos agentes contaminantes, recebem aplicações periódicas de fungicidas, bactericidas e nutrientes (Alfenas et al, 2004). É em consequência da contaminação que muitos trabalhos de cultura de tecidos são

iniciados partindo de plântulas assépticas de origem seminal (Andrade et al., 2000). Nesse caso, é necessária uma eficiente desinfestação das sementes antes da inoculação em meio de cultura. Em eucalipto, os melhores resultados foram obtidos com a imersão em água estéril por 18 h, seguido de imersão em solução fungicida (Captan 1,5 g L⁻¹) por 15 min., imersão em álcool 70% por 1 min. e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 30 min. (Pontes, 1999).

2.2.3 Isolamento

Após a descontaminação, o isolamento é sempre realizado em câmara de fluxo laminar. A manipulação do explante exige perícia e cuidado, pois determina a sobrevivência. Uma rápida excisão do explante, inoculação no meio de cultura e imediata vedação do frasco são fundamentais para evitar a desidratação (Hu e Wang, 1983). Outra dificuldade é o escurecimento dos explantes, pela oxidação, comum em explantes de espécies lenhosas (Grattapaglia e Machado, 1998). Fenômeno resultante do acúmulo de polifenóis e produtos da oxidação, como a melanina, suberina, lignina e outros; que modificam a composição do meio de cultura e alteram a absorção metabólicos (Andrade et al., 2000).

A lavagem em água corrente antes da desinfestação pode reduzir este problema, pela lixiviação dos compostos fenólicos (Sato et al., 2001; Grattapaglia e Machado, 1998), contudo nem sempre traz os resultados esperados, como para o isolamento de *Celtis* sp. a lavagem de explantes não é necessária para um efetivo controle da oxidação (Sato et al., 2001). A imersão prolongada, realização do preparo (excisão) do explante em água (Bonga, 1982) ou a adição de antioxidantes ao meio de cultura após a autoclavagem também reduzem a oxidação (Gupta, 1986). Substâncias como o ácido cítrico, ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio, polyvinilpirrolidone (PVP) e carvão ativado são comumente utilizados com este objetivo. O tipo e a concentração dos mesmos variam para cada espécie e determinam a sua eficiência (Grattapaglia e Machado, 1998).

2.2.4 Multiplicação

A multiplicação é a fase mais longa da micropropagação e visa a produzir o maior número possível de plantas uniformes e de alta qualidade (Grattapaglia e Machado, 1998). São diversos os fatores influentes na morfogênese, dos quais os reguladores de crescimento são considerados de extrema importância (Ponte, 1999). Os mesmos na concentração e combinação adequadas no meio de cultura são determinantes para o desenvolvimento vegetal. Citocininas e auxinas são os principais responsáveis pela indução e multiplicação de gemas na maioria das espécies de vegetais, com variações nas concentrações exógenas necessárias (George e Sherrington, 1984).

As auxinas são sintetizadas, principalmente, em tecidos meristemáticos de órgãos aéreos dos vegetais e são responsáveis pela expansão celular, incorporação de materiais na parede celular e aumento da elasticidade. Este último permite o influxo de água na célula, resultando em aumento de pressão sobre a parede celular, o que provoca a alongação. É também da auxina o fenômeno de fototropismo nos vegetais, movimento da planta em resposta a um gradiente de luz; a luminosidade unilateral provoca a migração da auxina para regiões sombreadas, induzindo assim maior alongação e conseqüente inclinação para o lado iluminado. As auxinas estão presentes ainda nos fenômenos de geotropismo, dominância apical, iniciação e alongação caulinar, produção de etileno, crescimento de frutos abscisão, partenocarpia e partição de assimilados, e ainda tem ação herbicida em concentrações altas (Vieira e Monteiro, 2002). Uma das mais rápidas respostas hormonais observadas em plantas é a indução do crescimento provocada por auxinas, em especial em secções de coleóptile e de caules de plantas (Santos e Domingues, 2002). Existem diversas auxinas conhecidas, apenas duas naturais, o ácido indolacético (AIA), bastante utilizado na cultura de tecidos, e o indolacetonitrilo, pouco utilizado. As sintéticas são mais comuns, dentre elas temos o ácido indolbutírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido nafataleno acético (ANA) os mais aplicados em cultivos *in vitro*. Contudo as auxinas em solução aquosa, apresentam severa degradação devido a uma série de agentes, como ácidos, radiações ultravioletas e ionizantes, e inclusive pela luz visível quando na presença de pigmentos sensíveis. O AIA tem a maior sensibilidade a degradação,

dentre as auxinas conhecidas, a qual deve-se a ação do oxigênio e peróxido em presença de um redutor (Vieira e Monteiro, 2002; Neto e Tavares, 2002).

Na fase de multiplicação a concentração da auxina normalmente é sempre menor do que a da citocinina, para não promover a formação de calo na base do explante. ANA e AIB normalmente são utilizados em concentrações abaixo de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e o AIA, em virtude de sua baixa estabilidade, em concentrações maiores (Ponte, 1999; Grattapaglia e Machado, 1998).

As citocininas estão presentes sobretudo em regiões meristemáticas e órgãos em crescimento como nas folhas jovens, sementes, frutos e principalmente no meristema apical da raiz, sítio de biossíntese desta substância. São essenciais para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas. São promotoras de crescimento e divisão celular, participando inclusive do alongamento e diferenciação celular (Vieira e Monteiro, 2002; Hu e Wang, 1983). Há, contudo efeitos adversos das citocininas quando em quantidades elevadas, toxidez, entufamento exagerado, formação de roseta (falta de alongamento), má formação foliar e vitrificação dos explantes (Ponte, 1999; Grattapaglia e Machado, 1998). Os efeitos das citocininas nos vegetais são bastante variáveis, em virtude à sua grande quantidade de metabólicos presentes diversos tipos de tecidos, variando inclusive entre as diferentes espécies da natureza (Brito e Castro, 2002). A primeira citocinina isolada foi a cinetina (6-furfurilaminopurina), com grande capacidade promotora de divisão celular ou citocinese. A zeatina (6-(4-hidroxi-3-trans-metil-2-amino-butenil) purina) foi a primeira citocinina natural identificada presente em sementes verdes de milho. As citocininas sintéticas são as mais conhecidas, como o BA (6-benzilamino purina), 2iP (6-dimetilamino purina) e PBA (6-(benzilamino)-9-(2-tetrahidronipiranil)-9H-purina), todas elas ligadas a promoção do crescimento, divisão, alongamento e diferenciação celular (Vieira e Monteiro, 2002).

Outro fitorregulador passível de utilização na cultura de tecidos é a giberelina (GA_3), que promove o crescimento pelo aumento de plasticidade da parede celular. A aplicação exógena de giberelina pode reverter o processo de nanismo genético, por promover o aumento do comprimento de entrenós de plantas anãs e devolver a aparência normal (Vieira e Monteiro, 2002). Cerca de 125 GAs já foram identificadas, contudo a grande maioria não apresentam atividade biológica propriamente dita; são precursoras ou metabólicos (Barata et al., 2002).

O meio de cultura também pode afetar a taxa de multiplicação, especialmente a composição dos macronutrientes, como a fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre íons de nitrato e amônio (Grattapaglia e Machado, 1998). O tipo de agente solidificante adicionado ao meio, pode levar a diferentes respostas nas culturas *in vitro*, devido às diferenças na constituição (Ponte, 1999). O ágar é o composto gelatinante mais utilizado nos cultivos *in vitro*, contudo há relatos da presença de impurezas inibitórias ao desenvolvimento vegetal (Hu e Wang, 1983). Até mesmo diferentes marcas do produto tem preconizado diferenças no desenvolvimento de culturas, geradas pelas diferentes propriedades físicas e químicas (Debergh, 1983).

2.2.5 Enraizamento

A indução de raízes adventícias em explantes recém-multiplicados é extremamente difícil em espécies lenhosas comparado com herbáceas (Ponte, 1999; Grattapaglia e Machado, 1998). O enraizamento é ainda mais difícil quando o explante é originado de tecido adulto, em razão da alta especialização das células e conseqüente baixa capacidade de desdiferenciação (Ponte, 1999; Mantovani e Franco, 1998). Além disso, tem-se que considerar a presença de inibidores de enraizamento e a predisposição genética, que varia até mesmo entre clones de uma mesma espécie (Ponte, 1999; Hartney, 1980).

A capacidade de enraizamento de explantes de material adulto pode ser recuperada em sucessivos subcultivos *in vitro* na fase de multiplicação, procedimento rejuvenescendo o material vegetal (Gupta et al., 1981). O processo de formação de raízes *in vitro* divide-se em indução, iniciação e alongamento de raízes. Nas duas primeiras fases o uso de auxina para indução tem apresentado sucesso, contudo na terceira fase a presença da mesma pode inibir o crescimento radicular. São diversas as auxinas que podem ser utilizadas na indução do enraizamento. O AIB, ANA e AIA tem sido os mais utilizados cujas concentrações mais comuns estão na faixa de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ (Grattapaglia e Machado, 1998).

A simples diluição do meio de cultura pode aumentar a eficiência do processo de enraizamento, pois altas concentrações de sais tendem a inibir o enraizamento.

Porém, meio de cultura muito diluído em macronutrientes pode levar a deficiência mineral na parte aérea (Grattapaglia e Machado, 1998).

2.2.6 Meios de cultura

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

Existe uma grande variedade de meios de cultura adaptados para diversas espécies, diferindo sobretudo na constituição e concentração de nutrientes (Mantovani e Franco, 1998). Os meios comumente usados com espécies florestais são o MS (Murashige e Skoog, 1962), originalmente desenvolvido para *Nicotiana tabacum*, e o WPM (Woody Plant Medium), desenvolvido especialmente para espécies lenhosas por Lloyd e McCown (1981) (Quadro 02).

Os meios básicos podem sofrer modificações visando atender as necessidades nutricionais para cada fase da micropropagação. É freqüente a utilização do mesmo meio básico para a fase de isolamento e multiplicação, constituído-se de Macro e micronutrientes, vitaminas, inositol, fonte de açúcar e outros compostos. A variação mais freqüente para a fase de multiplicação relaciona-se à composição dos macronutrientes. A fonte de nitrogênio e o balanço entre os íons nitrato e amônio tem feito jus à aplicação. Já na fase de enraizamento, a diluição da composição básica dos meios de cultura tem diversas vezes possibilitado melhores resultados. A diluição de 1/2, 1/3 e 1/4 da concentração salina do meio MS, por exemplo, tem sido bastante freqüente na literatura (Grattapaglia e Machado, 1998).

Tabela 01: Composição dos meios de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1981) e MS (Murashige e Skoog, 1962)

Componentes	WPM (mg L ⁻¹)	MS (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de Cálcio - Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556,000	-
Nitrato de Amônio - NH ₄ NO ₃	400,000	1650,000
Nitrato de Potássio - KNO ₃	-	1900,000
Cloreto de Cálcio - CaCl ₂ .2H ₂ O	96,000	440,000
Sulfato de Magnésio - MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000	370,000
Fosfato de potássio - KH ₂ PO ₄	170,000	170,000
Sulfato de Potássio - K ₂ SO ₄	990,000	-
Micronutrientes		
Sulfato de Manganês - MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300	22,300
Sulfato de Zinco - ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	8,600
Ácido Bórico - H ₃ BO ₃	6,200	6,200
Iodeto de Potássio - KI	-	0,830
Molibdato de Sódio - Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,250
Sulfato de Cobre - CuSO ₄ .5H ₂ O	0,250	0,025
Cloreto de Cobalto - CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0,025
Ferro_EDTA		
Na ₂ EDTA	37,250	37,250
Sulfato de Ferro - FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850	27,850
Vitaminas		
Tiamina-Hcl	1,000	0,100
Piridoxina-Hcl	0,500	0,500
Ácido Nicotínico	0,500	0,500
Glicina	2,000	2,000
Mio-inositol	100,000	100,000

Fonte: adaptado de Mantovani e Franco (1998).

2.2.7 Aclimatização

Essa é uma etapa crítica da produção de mudas, pois um grande número de plantas pode ser perdido por falta de aclimatização. Durante a aclimatização, as plantas passam de uma condição heterotrófica e de reduzida transpiração para a autotrófica que demanda altas taxas de transpiração. Além disso, no ambiente *ex vitro* há menor disponibilidade de nutrientes e maior exposição a organismos patogênicos (Grattapaglia e Machado, 1998).

Em alguns casos, tem sido possível aclimatizar plantas que não passaram pelo enraizamento *in vitro*, como demonstrado em eucalipto por Xavier e Comério (1997). A aclimatização pode ser dividida em diferentes 3 fases, a exemplo da metodologia utilizada para *Eucalyptus* spp. Enraizamento: 20 a 30 dias em casa de vegetação sob nevoeiro intermitente (alta umidade relativa) e sombreamento mais 5 a 10 dias à sombra antes de exposição em condições de céu aberto. Aclimatização à sombra: nesta fase a intensidade luminosa é de aproximadamente 50% da obtida em céu aberto, por meio do uso de sombrite. A irrigação normalmente se faz por meio de microaspersores. Aclimatização a céu aberto: nesta fase deve-se aumentar o espaçamento entre as mudas, para inibir a proliferação de doenças. Num primeiro momento pretende-se o crescimento das mudas, durante 20 a 30 dias. O que se obtém com irrigação por miniaspersores conjugado com periódicas fertirrigações. No final da aclimatização a céu aberto obtém-se a rustificação da muda para que esta resista melhor a condição adversa do campo, durante 15 a 20 dias, podendo ter fertirrigação conjugada a irrigação por miniaspersores (Alfenas et al., 2004). Contudo devido a carência de pesquisas, a experiência individual, a familiarização com a cultura e o material disponível tem determinado o sucesso da aclimatização de plantas micropropagadas para a maioria das espécies (Grattapaglia e machado, 1998).

2.3 Miniestaquia

A técnica de miniestaquia é uma versão da estaquia convencional, na qual variam o tamanho e a origem da estaca. A miniestaquia possibilita a obtenção de mudas com base em qualquer uma das técnicas de propagação. Miniestacas são obtidas tomando-se por base minicepas e enraizadas em condições específicas. Em eucalipto foi possível a produção entre 10 e 12 mil mudas $m^2 \text{ ano}^{-1}$ por meio da miniestaquia (Mafia et al., 2005; Alfenas et al., 2004). Dois fatores são críticos para maximizar a produtividade de miniestacas, a produção de brotos e a capacidade de enraizamento das miniestacas em ambiente de viveiro (Mafia et al., 2005).

Em geral a técnica de miniestaquia dispensa a utilização de fitoregulador ou são aplicados em baixas concentrações. Os propágulos vegetativos são de cerca de

4 a 8 cm de comprimento, de maneira que contenha um par ou dois pares de folhas por miniestaca, de acordo com a posição de coleta. Para a cultura do *Eucalyptus* spp. miniestacas apicais tendem a enraizar melhor, contudo são mais sensíveis a quaisquer estresses bióticos e abióticos (Alfenas et al., 2004, Xavier et al., 2003; Titon et al., 2003).

Em pesquisas e quando não se objetiva formação de florestas produtivas, recomenda-se a coleta de propágulos de plantas novas, oriundas de sementes. Desta forma facilita a obtenção de variabilidade genética, necessária para comprovação técnica para a espécie estudada ou recuperada, e é maior a facilidade de coleta das brotações com menor custo (Wendling, 2005).

Conforme Alfenas et al. (2004), a miniestaquia pode ser dividida em cinco fases:

- Produção de brotos – tratos culturais da minicepa;
- Enraizamento;
- Aclimação à sombra;
- Crescimento;
- Rustificação.

Os procedimentos de enraizamento até a rustificação da muda corresponde ao processo de aclimatização de mudas micropropagadas, descrito anteriormente.

Para a formação da minicepa, seja ela uma muda de semente, de estaca, microestaca ou mesmo miniestaca, quando apresentam uma altura de 15 cm são podadas a cerca de 10 cm de sua base, para estimular a formação de brotações laterais. O conjunto de minicepas ou minitouças formam o que denomina-se minijardim clonal ou matrizeiro (Wendling et al., 2005; Alfenas et al., 2004).

Existem diversas formas de condução da minicepa, em diferentes sistemas: sacos plásticos, vasos e tubetes (Wendling et al., 2005) e canaletão (Alfenas et al., 2004). A adoção de fertirrigação é necessária para prover a minicepa dos nutrientes necessários ao seu bom desenvolvimento. Sendo a forma ideal o sistema de gotejamento na base das minicepas ou então inundação temporária ou subirrigação capilar em tanques de hidroponia (Alfenas et al., 2004). O recomendado ainda é que se faça este processo de fertirrigação com maior frequência e menor quantidade por aplicação, resultando no melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas (Wendling et al., 2005).

A produtividade das miniestacas varia de acordo com a genética do material e com o sistemas de minijardim. Para manter a miniestaca produtiva e seu sistema radicular ativo, a coleta de brotações tem de ser contínua (cada 4 a 10 dias, dependendo das condições climáticas relativas a estação do ano) e evitando a poda drástica da mesma. É necessário ainda dispor de um sistema de cobertura, para evitar o aparecimento de doenças e o encharcamento excessivo do substrato, com conseqüente lixiviação dos nutrientes. É preferível que o mesmo seja do tipo retrátil, permitindo assim o seu uso somente quando realmente necessário (Alfenas et al., 2004).

Outro cuidado necessário ao minijardim é o controle de plantas invasoras, as quais devem ser erradicadas, pois são competidores agressivos por água e nutrientes, prejudicando a formação de brotações nas minicepas (Wendling et. al., 2005; Alfenas et al., 2004).

3 CAPÍTULO 1

ESTABELECIMENTO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE LOURO-PARDO

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de estabelecimento e quantificar o crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo (*Cordia trichotoma*) oriundas de sementes para a produção de explantes assépticos. Para o estabelecimento *in vitro*, estudou-se o efeito do tempo de embebição e de diferentes protocolos de desinfestação das sementes. A embebição se fez em água destilada e autoclavada por 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h, seguindo-se a desinfestação prévia em NaOCl 5% por 30 min, retirada do tegumento e imersão em solução de álcool etílico 70% por 30 s. Para a desinfestação, testou-se a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2 e 5%, por 0, 5, 10, 15 e 20 min. Foram avaliadas as porcentagens de desinfestação e germinação e o tempo médio de germinação. O crescimento de explantes de louro-pardo foi quantificado nos meios de cultura 1/2MS e WPM, pelo número de folhas e raízes primárias emitidas e comprimento da parte aérea e das raízes primárias, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. A embebição das sementes de louro-pardo por até 24 h favorece a retirada do tegumento sem afetar a desinfestação e germinação. A imersão das sementes em NaOCl 5% por 30 min seguida da retirada do tegumento e a imersão das sementes sem tegumento em solução de álcool etílico 70% por 30 s foram suficientes para a produção *in vitro* de plântulas assépticas. Plântulas de louro-pardo apresentaram crescimento satisfatório em meio de cultura WPM.

ABSTRACT

The objectives of this work were to develop an *in vitro* establishment protocol and to quantify growth of louro-pardo (*Cordia trichotoma*) seedlings to produce aseptic explants. Seed imbibition and disinfection were studied for *in vitro* seedling establishment. Seeds were imbibed in distilled and autoclaved water for 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h and disinfected in a sodium hypochlorite solution of 5% for 30 min before tegument excision. Seeds without tegument were submerged in an alcohol solution of 70% for 30 s. Percentages of disinfection and germination and mean germination time were evaluated. Seedling growth was quantified in 1/2MS and WPM culture mediums at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation. Number of emerged leaves and primary roots and length of shoots and primary roots were evaluated. Imbibition of louro-pardo seeds until 24 hours made easy tegument excision without affecting disinfection and germination. Seed immersion in a hypochlorite solution of 5% for 30 min, followed by tegument excision and immersion in a 70% alcohol solution for 30 s are enough for an acceptable production of *in vitro* aseptic seedlings. Louro-pardo seedlings grow satisfactorily in a WPM culture medium without growth regulators.

3.1 Introdução

A crescente demanda por madeira vem aumentando a pressão sobre espécies florestais remanescentes. Os grandes plantios comerciais, constituídos essencialmente de espécies exóticas de rápido crescimento, têm grande importância na moderação da exploração e manutenção das espécies nativas (Ferreira e Galvão, 2000). Contudo, a produção de tais plantios não atende à demanda, especialmente da indústria de madeiras nobres, o que justifica investimentos em pesquisa e produção comercial de espécies nativas.

Cordia trichotoma (Boraginaceae) é uma espécie, conhecida popularmente por louro-pardo, bastante promissora para o emprego em reflorestamentos puros ou mistos, porém apresenta alta variabilidade genética nos plantios existentes (Carvalho, 2003). A seleção e multiplicação de indivíduos adultos de alta produtividade e qualidade é vantajosa para o melhoramento genético da espécie (Bhojwani e Razdam, 1983). No entanto, a propagação vegetativa de plantas selecionadas é dificultada pela baixa capacidade morfogenética dos tecidos (Noletto e Silveira, 2004). Assim, a cultura de tecidos apresenta-se como alternativa, por proporcionar o rejuvenescimento dos tecidos adultos e facilitar a multiplicação massal (Handa et al., 2005; Xavier, 2002; Mantovani e Franco, 1998). Pela dificuldade de estabelecer em laboratório indivíduos adultos, pesquisas em cultura de tecidos podem ser desenvolvidas com plântulas obtidas em condições assépticas, por meio de sementeira *in vitro* (Noletto e Silveira, 2004; Andrade et al., 2000).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de estabelecimento e quantificar o crescimento *in vitro* de plântulas, para a produção de explantes assépticos de louro-pardo.

3.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento de plantas, Departamento de Fitotecnia, Universidade

Federal de Santa Maria, RS, entre setembro de 2005 e março de 2006. As sementes, coletadas no município de Cachoeira do Sul, RS, foram fornecidas pelo Banco de Sementes da Associação de Fumicultores do Brasil (AFUBRA). O lote de sementes foi recebido em agosto de 2005, com teor de umidade de 8,2% .

Para o estabelecimento *in vitro*, foram realizados experimentos de embebição e desinfestação das sementes. Para a embebição, as sementes foram imersas em água destilada por 0, 24, 48, 72, 96 ou 120 h e, posteriormente, em uma solução contendo 5% de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 30 min (pré-desinfestação). Após a retirada do tegumento, as sementes foram imersas em solução contendo 70% de álcool etílico e três gotas de tween 20 por 100 mL de solução por 30 s e após, inoculadas em meio de semeadura, 30 g de sacarose por litro de água destilada, solidificado com 7 g L⁻¹ de Agar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Entre cada procedimento, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Para a desinfestação de sementes de *Cordia trichotoma*, realizou-se dois testes preliminares. No primeiro as sementes foram escarificadas por 3 segundos (Carvalho, 2004), submetidas a embebição por 24 horas e então em câmara de fluxo laminar imersas em solução contendo 70% de álcool etílico e três gotas de tween 20 por 100 mL de solução por 40 s, seguido de imersão em NaOCl 2% ou 5% por 5 ou 15 min e inoculação em meio de semeadura, constituído os tratamentos mais uma testemunha sem desinfestação e somente com desinfestação em álcool 70% por 40 s. No segundo teste preliminar as sementes, sem serem escarificadas, foram submetidas a embebição por 24 hs seguindo-se em câmara de fluxo a retirada do tegumento e seguinte desinfestação com imersão em álcool 70% por 30 s seguido de imersão em NaOCl 1% ou 4% por 5 min e inoculação em meio de semeadura.

No terceiro teste de desinfestação as sementes foram imersas em água destilada por 12 h e, posteriormente, em uma solução contendo 5% de NaOCl por 30 min (pré-desinfestação). Após a retirada do tegumento, as sementes foram imersas em solução contendo 70% de álcool etílico e três gotas de tween 20 por 100 mL de solução durante 30 s. Em seguida foram aplicados os tratamentos: imersão das sementes sem tegumento em solução contendo 2% ou 5% de NaOCl por 0, 5, 10, 15 ou 20 min e inoculadas em meio de semeadura. Entre cada procedimento, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Para todos os testes, as unidades experimentais foram expostas 7 dias em fotoperíodo negativo, seguido de fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa média de $20 \mu\text{M M}^{-2} \text{S}^{-1}$ obtidas por lâmpadas fluorescentes brancas, na temperatura de $25^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Foram avaliadas as porcentagens de desinfestação e germinação em intervalos de três dias durante um período de 30 dias após a inoculação, possibilitando o cálculo do tempo médio de germinação (TMG) pela fórmula $TMG = \frac{\sum_{n=1}^n N_n T_n}{\sum_{n=1}^n N_n}$ em que N é o número de sementes germinadas e T o tempo em dias (Harrington, 1972). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez e oito repetições para os testes preliminares de desinfestação respectivamente e seis repetições de cinco sementes no teste de embebição e terceiro teste de desinfestação.

O crescimento e enraizamento *in vitro* de propágulos de louro-pardo foram quantificados em dois meios de cultivo. A parte aérea das plântulas germinadas em meio de sementeira e com 30 dias após a inoculação das sementes, foi transferida para o meio MS com metade de sua concentração – 1/2MS (Murashige e Skoog, 1962) ou Woody Plant Medium – WPM (Lloyd e McCown, 1981) na sua formulação completa, os quais foram acrescidos de 30 g l^{-1} de sacarose e 7 g l^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Foram avaliados o número de folhas, número de raízes primárias emitidas, comprimento da parte aérea e o comprimento das raízes primárias aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação ao meio de cultivo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições de quatro propágulos.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias de germinação e desinfestação comparadas por regressão polinomial a 5% de probabilidade de erro, para o tempo de embebição e pelo teste de tukey a 5% de probabilidade de erro no teste de desinfestação.

3.3 Resultados e discussão

Nos testes preliminares de desinfestação de sementes observou-se 100% de contaminação por lêvedo ou bactéria e não foram observadas sementes

(germinadas dados não apresentados). Provavelmente em virtude da alta contaminação que inibiu o processo de germinação. a elevada contaminação, se deve certamente pela manutenção do tegumento das sementes, fonte de microorganismos infectantes de difícil erradicação, este resultado demonstrou a necessidade de retirada da mesma, procedimento que passou a ser adotado nos demais testes.

A embebição prolongada das sementes de louro-pardo afetou negativamente a desinfestação e o percentual de germinação *in vitro* (Figura 1a). Os melhores resultados foram obtidos com até 24 h de embebição, com porcentagens de desinfestação e germinação superiores a 85 e 77%, respectivamente aos 30 dias após a inoculação. O TMG apresentou uma parábola positiva culminando no maior valor, pior resultado, para 48 h de embebição (Figura 1b). A embebição facilitou a retirada do tegumento das sementes, onde estão concentrados os microorganismos que infectam as sementes. No entanto, a embebição prolongada, superior a 24 horas, afetou negativamente a germinação e aumentou a contaminação.

Os resultados deste trabalho concordam com os obtidos por Mendonça et al. (2001), que observaram porcentagens de 75% em teste de germinação de sementes de louro-pardo. Neste experimento, foram observadas porcentagens de germinação superiores (85 a 100%) com embebição de até 24 h e retirada do tegumento, o que indica alta qualidade fisiológica das sementes utilizadas. A maior contaminação observada, quando a embebição foi prolongada, se deveu, provavelmente, ao aumento da permeabilidade das membranas, levando à perda de soluto e favorecendo a proliferação de contaminantes no meio de cultivo (Bewley e Black, 1994). A embebição de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) em água até 300 min. aumentou proporcionalmente a percentagem de germinação (Lima e Borges et al., 2002), o que não foi observado neste experimento.

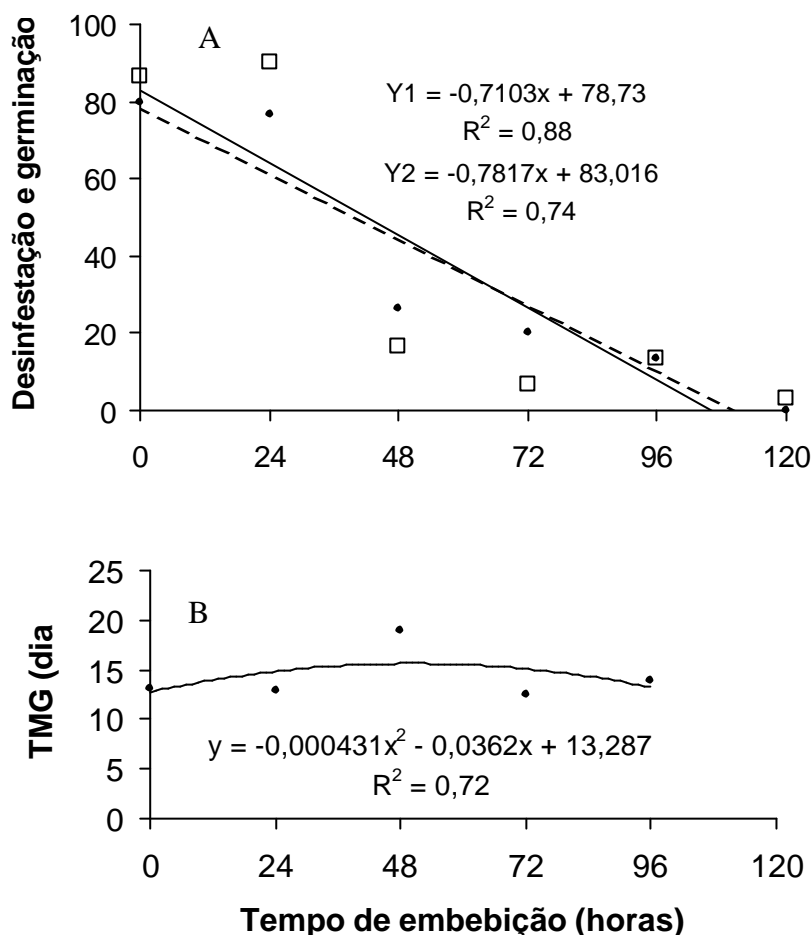


Figura 1 – Porcentagens de desinfestação (□, ● e y2) e germinação (---, ? e y1) (A) e tempo médio de germinação (TMG) (B) de sementes de louro-pardo submetidas a diferentes tempos de embebição em água destilada antes da pré-desinfestação (imersão em NaOCl 5% por 30 min), retirada do tegumento e imersão em álcool 70% por 30 s aos 30 dias após a inoculação em meio de semeadura, 7 g de Agar e 30 g de sacarose por litro de água destilada. Santa Maria, RS, 2006.

Não se observaram diferenças significativas, pelo teste F, nos valores observados para o percentual de desinfestação e de germinação; tanto para tempo de imersão no hipoclorito quanto para a concentração da solução desinfetante (Tabela 2). A percentagem de desinfestação variou entre 90 a 100% e a de germinação de 85 a 100%. O tempo médio de germinação foi similar entre os diferentes tratamentos. Esses resultados mostram que a pré-desinfestação com imersão em NaOCl 5% por 30 min, retirada do tegumento e a imersão das sementes em solução de álcool etílico 70% por 30 s foram suficientes para uma efetiva

desinfestação, visando ao estabelecimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo (Figura 2a).

Tabela 2 – Porcentagens de desinfestação e germinação e tempo médio de germinação (TMG¹) de sementes de louro-pardo submetidas a pré-desinfestação (imersão em NaOCl 5% por 30 min), retirada do tegumento, imersão em álcool 70% por 30 s e diferentes tempos de imersão em NaOCl 2% ou 5%. Santa Maria, RS, 2006

Tempo de imersão	Desinfestação (%)	Germinação (%)	TMG ¹ (dias)
Solução de NaOCl a 2%			
0	95,0 a ²	90,0 a	20,0
5	90,0 a	100,0 a	20,0
10	95,0 a	100,0 a	20,9
15	100,0 a	95,0 a	20,0
20	95,0 a	95,0 a	19,6
Média	95,0	96,0	20,1
CV%	9,8	8,5	-
Solução de NaOCl a 5%			
0	95,0 a	90,0 a	20,0
5	95,0 a	100,0 a	19,6
10	95,0 a	100,0 a	20,1
15	100,0 a	85,0 a	20,1
20	90,0 a	85,0 a	21,4
Média	95,0	92,0	20,2
CV%	9,8	11,9	-

¹Tempo Médio de Germinação.

²Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Diversos tratamentos para desinfestação de sementes têm sido utilizados em espécies florestais. O tratamento de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium*) com NaOCl 2% e água quente (95° C) promoveu uma assepsia de 95%, resultado também obtido quando foi utilizado somente água quente (Oliveira et al., 2003). Sementes de acácia-negra (*Acácia mearnsii*) tratadas com NaOCl a 10% por 10 min. e álcool 70% por 40 seg. tiveram 100% de assepsia e germinação (Martins-Corder e Borges Junior, 1999). Em mogno (*Swietenia macrophylla*), foi detectada interação entre a concentração de NaOCl e o tempo de imersão, porém não ocorreu

diferença significativa entre os resultados obtidos com álcool 70% e NaOCl (Couto et al., 2004), resultado parecido com o deste trabalho.

O meio WPM proporcionou maior crescimento e enraizamento dos propágulos de louro-pardo do que o 1/2MS, em todas as variáveis analisadas (Tabela 3). Já após 14 dias de cultivo, foi observado o crescimento dos explantes cultivados no meio WPM (Figura 2b). Contrariamente, no meio 1/2MS, nenhum crescimento foi verificado nesse período. O crescimento observado no meio WPM aos 14 dias foi similar ao observado nos explantes em meio 1/2MS aos 28 dias de cultivo (Figura 3). Portanto, o meio WPM proporcionou uma resposta mais rápida dos propágulos em relação à emissão de folhas e de raízes.

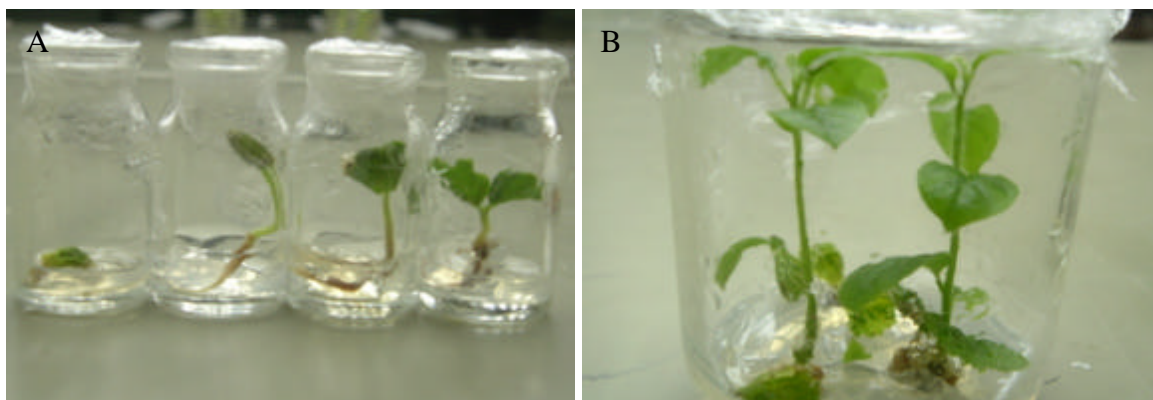


Figura 2 – Germinação *in vitro* de sementes de louro-pardo submetidas a 12 h de embebição em água destilada, retirada do tegumento e imersão em álcool 70% por 30 s e inoculadas em meio de semeadura, 7 g de agar e 30 g de sacarose por litro de água destilada (A), e plântulas de louro-pardo aos 28 dias de crescimento em meio WPM na sua formulação completa (B). Santa Maria, RS, 2006.

Tabela 3 – Comprimento da parte aérea e de raízes adventícias principais, número de folhas e número de raízes emitidas em propágulos de louro-pardo, aos 28 dias após a inoculação em meio de cultura 1/2MS ou WPM. Santa Maria, RS, 2006

Meios de cultivo	Comprimento (cm)		Número	
	Parte aérea	Raízes adventícias	Folhas	Raízes
WPM	1,60 a ¹	7,37 a	3,06 a	1,56 a
1/2 MS	0,73 b	1,27 b	0,52 b	1,08 b
Média	1,17	4,32	1,79	1,32
CV%	27,99	28,44	35,16	19,10

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

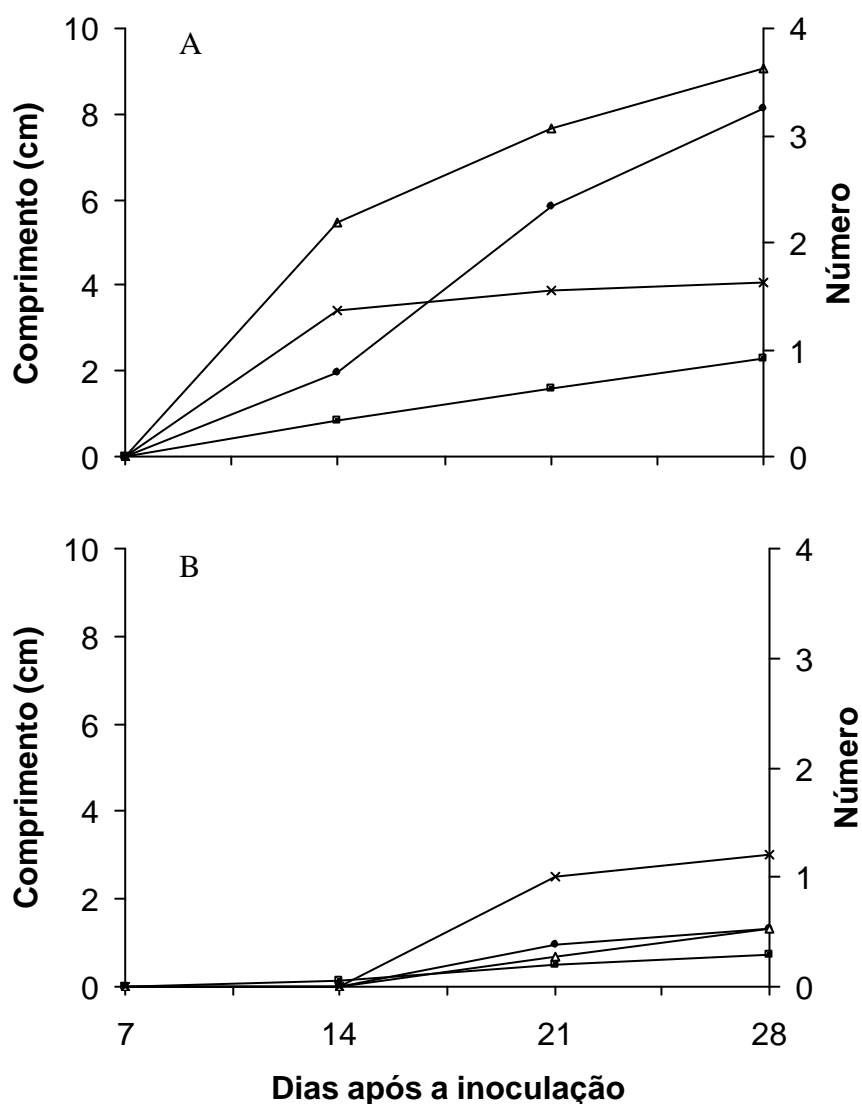


Figura 3 – Comprimento (cm) da parte aérea (Δ) e das raízes adventícias principais (●), número de folhas (x) e raízes (□) emitidas em propágulos de louro-pardo cultivados em meio WPM (A) ou 1/2MS (B). Santa Maria, RS, 2006.

O meio de cultura além de fornecer os nutrientes necessários, preconiza o padrão de crescimento das plantas *in vitro* (Thorpe et al., 1991; Caldas et al., 1998). Os mesmos são formulados para atender às necessidades da espécie trabalhada (Mantovani e Franco, 1998). O meio WPM foi originalmente desenvolvido para plantas lenhosas em geral (Lloyd e McCown, 1981), o qual, na formulação completa, foi superior ao MS para a fase de isolamento em laboratório do louro-pardo (Mantovani et al., 2001), concordando com os resultados observados. Embora o

meio MS e suas diversas modificações e diluições tenha apresentado bons resultados para inúmeras espécies, em espécies lenhosas não se mostra satisfatório em diversos casos, e composições mais diluídas em macronutrientes tem tido maior sucesso (Grattapaglia e Machado, 1998). A maior eficiência do meio de cultura WPM não é surpresa, portanto, elaborado para plantas lenhosas em geral, apresenta uma proporção e composição salina diferenciada em relação ao MS e maior disponibilidade da vitamina Tiamina – HCl, a qual apresenta resultados benéficos para a multiplicação em concentrações superiores à do meio MS (Mantovani e Franco, 1998; Grattapaglia e Machado, 1998). A fonte de nitrogênio, Nitrato de amônio (NH_4NO_3) e o Nitrato de potássio (KNO_3), afeta o balanço dos íons nitrato e amônio. Baixas concentrações do nitrogênio na forma amoniacal contribuem para a redução da vitrificação dos tecidos vegetais, por exemplo; estimulando o crescimento *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998). No estabelecimento *in vitro* de aceloreira (*Malpighia emarginata*), esta concentração salina $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ teve grande influência no crescimento e desenvolvimento de brotações, com um melhor desempenho de explantes inoculados em meio WPM, comparado ao MS e DKW (Melo et al., 1999).

3.4 Conclusões

- A embebição das sementes de louro-pardo em água destilada facilita a retirada do tegumento.
- A embebição das sementes de louro-pardo em água destilada por até 24 h, imersão da semente em NaOCl 5% por 30 min seguido da retirada do tegumento e a imersão das sementes sem tegumento em solução de álcool etílico a 70% por 30 s possibilitam o estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas de louro-pardo.
- Propágulos de louro-pardo apresentam melhor crescimento em meio de cultivo WPM, em comparação ao meio 1/2MS.

4 CAPITULO 2

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE LOURO-PARDO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a eficiência da aplicação de reguladores de crescimento na propagação *in vitro* e *ex vitro* de louro-pardo. Na propagação *in vitro* segmentos nodais e ápices caulinares foram obtidos de plântulas de origem seminal com 28 dias de crescimento em meio WPM. Foram testadas a adição ao meio de cultura WPM de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA) ou ácido giberélico (GA_3) nas concentrações de 0; 0,05; 0,10; 0,15 ou 0,20 $mg L^{-1}$ e a combinação de 0 ou 0,05 $mg L^{-1}$ de ANA com 0; 0,10 ou 0,20 $mg L^{-1}$ de GA_3 . Foram avaliados o número de folhas e de entrenós e a altura das plântulas aos 30 dias de cultivo. Visando o aumento da taxa de multiplicação plântulas de origem seminal, com 28 dias de crescimento em meio WPM, tiveram sua parte aérea coletada acima ou abaixo da primeira folha verdadeira fornecendo segmentos nodais e ápices caulinares, mantendo-se o restante como microcepas no meio de cultivo, o qual foi reidratado com meio WPM líquido. Aos 21 dias após o primeiro e o segundo corte, foram avaliados o número de brotações adventícias e de entrenós por microcepa. Na propagação *ex vitro* miniestacas de 2,5 a 4, 4,01 a 5,5 e 5,51 a 7 cm foram submetidas à aplicação de 0 ou 1000 $mg L^{-1}$ de ácido indol butírico (AIB) por 10 s na base. Foram avaliadas as percentagem de sobrevivência, enraizamento e formação de calos aos 60 dias. A adição isolada ou combinada de reguladores de crescimento não aumentou a taxa de multiplicação *in vitro*. A manutenção de microcepas aumentou a taxa de multiplicação *in vitro* em até 1,75 vezes. Miniestacas de louro-pardo de 2,5 a 5,5 cm de comprimento apresentaram 95% de sobrevivência, sem diferir na utilização ou não de AIB, porém não apresentaram enraizamento.

IN VITRO AND EX VITRO PROPAGATION OF LOURO-PARDO

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the efficiency of growth regulator application in the *in vitro* and *ex vitro* propagation of louro-pardo. Nodal and apical segments were obtained from plantlets of seminal origin grown in WPM medium for 30 days were used for *in vitro* propagation. The addition to the WPM culture medium of 0; 0.05; 0.10; 0.15 or 0.20 $mg L^{-1}$ of 6-benzilaminopurin (BAP), naphthalene acetic acid (NAA) or gibberellic acid (GA_3) and the combination of 0 or 0.05 $mg L^{-1}$ of NAA with 0; 0.10 or 0.20 $mg L^{-1}$ of GA_3 were tested. At 30 days after inoculation, number of internodes and leaves and plantlet height were evaluated. Plantlets with seminal origin were also excised below or above the first true leaf and the microstumps maintained *in vitro* with liquid WPM added to the original medium to increase multiplication rate. Number of sprouts and internodes per microstump were evaluated at 21 days after first and second excision. Minicuttings from 2.5 to 4, 4.01 to 5.5 and 5.51 to 7 cm were treated with 0 or 1000 $mg L^{-1}$ of indol butyric acid (IBA) by basal immersion for 10 s to evaluate *ex vitro* propagation. Survival and rutting percentage and callus formation were evaluated at 60 days after treatment. The addition of growth regulators either isolated or combined to the WPM medium did not increase *in vitro* propagation. Maintaining microstumps increased the *in vitro* multiplication rate in 1.75 fold. Minicuttings of louro-pardo from 2.5 to 5.5 cm showed high survival percentages, but they did not root.

4.1 Introdução

O louro-pardo (*Cordia trichotoma*) é uma espécie de alto potencial comercial (Reitz et al., 1988), amplamente empregada na fabricação de móveis luxuosos, em revestimentos decorativos e acabamentos (Lorenzi, 1992). O grande valor comercial e a apreciabilidade do louro-pardo aumenta a pressão de exploração sobre as matas nativas remanescentes, o que exige a instalação de povoamentos puros ou mistos. O louro-pardo é uma espécie pioneira nos bosques que, se estabelecidos com mudas de alta qualidade, em solos de boa fertilidade e com adequado manejo silvicultural, é possível obter um primeiro corte já aos 15 anos (Carvalho, 2003) e fornece madeira para desdobro de excelente qualidade, em rotação entre 30 a 40 anos (Reitz et al., 1988).

A produção de mudas para estabelecimento de novos povoamentos tem sido feita partindo de sementes, que mantém alta variabilidade genética e resulta em baixa quantidade e qualidade do produto (Carvalho, 2003). A propagação vegetativa possibilita a produção de mudas altamente uniformes tomando por base plantas matrizes selecionadas. Os propágulos vegetativos de plantas arbóreas são comumente do tipo caular lenhosa (estaquia comum) ou caular herbácea (culturas *in vitro* e miniestaquia) cujos tecidos estão pré-dispostos à formação de parte aérea, sendo apenas necessária a indução de raízes (Xavier et al., 2003).

A grande dificuldade da propagação vegetativa de espécies florestais é a baixa capacidade morfogenética (Noletto e Silveira, 2004). Uma das possibilidades é o rejuvenescimento de indivíduos adultos por meio da cultura de tecidos para facilitar multiplicação massal *ex vitro*. Uma possibilidade de multiplicação é a miniestaquia, que tem proporcionado consideráveis ganhos na produção de mudas florestais, em razão do aumento da percentagem de enraizamento, a rapidez do processo de produção das mudas (Titon et al., 2003), a economia de área nos viveiros, a facilidade de controle e manejo do banco de explantes (Higashi et al., 2002) e do rejuvenescimento do material vegetal (Wendling e Xavier, 2005). A miniestaquia tem sido utilizada com sucesso na produção de mudas de eucalipto e na superação de problemas de enraizamento em clones recalcitrantes (Xavier et al., 2003).

A formação de raízes é um processo anatômico e fisiológico complexo, ligado a desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais, graças a sua totipotência. O uso de fitoreguladores em espécies de difícil

enraizamento é bastante comum, e são várias as classes de reguladores que exercem influência sobre esse processo. Sendo as auxinas, citocininas e as giberelinas os fitoreguladores que mais afetam o enraizamento de estacas. De uma maneira geral uma alta relação auxina/citocinina favorece a formação radicular, de modo inverso estimula a formação de ramos (parte aérea). As giberelinas inibem o processo de formação de raízes, promovendo crescimento aéreo. Em geral as técnicas de miniestaquia dispensam o uso de reguladores de crescimento ou o são utilizados em concentrações bastante reduzidas, devido ao grau de rejuvenescimento obtido (Alfenas et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da aplicação de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* e *ex vitro* de louro-pardo e testar a eficiência da formação de microcepas *in vitro* sem adição de reguladores.

4.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, entre os meses de maio de 2006 a abril de 2007. Foram conduzidos experimentos de multiplicação *in vitro* e *ex vitro*.

Para a multiplicação *in vitro*, segmentos nodais e ápices caulinares de 1 a 1,5 cm, foram obtidos de propágulos de origem seminal, crescidos por 28 dias em meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1981) acrescido de 7 g L⁻¹ de Agar e 30 g L⁻¹ de sacarose. Testou-se a eficiência da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo WPM, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de agar, com pH ajustado para 5,8 antes da esterilização. Inicialmente foi testada a adição ao meio WPM de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA) ou ácido giberélico (GA₃) nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,15 ou 0,20 mg L⁻¹. Os 12 tratamentos, mais a testemunha, sem adição de reguladores, foram avaliados em três repetições de um ápice caulinar e um segmento nodal. Também foi testada a adição de 0; 0,1 ou 0,2 mg L⁻¹ de GA₃ combinado com 0 ou 0,05 mg L⁻¹ de ANA. Foram utilizadas quatro repetições de um ápice caulinar e um segmento nodal. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram avaliados o número de folhas e de entrenós (viável de individualização) e a altura das plântulas aos 30 dias de cultivo. Os dados de cada tipo de explante foram

transformados em uma única média e então submetidos à análise da variância e comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em um terceiro teste de multiplicação *in vitro*, efetuou-se a coleta da parte aérea de propágulos aos 28 dias de crescimento em meio de cultivo WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de Agar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado; com cortes acima ou abaixo da primeira folha verdadeira (Figura 4a), mantendo-se o restante da plântula no mesmo meio, o qual foi reidratado manualmente, com auxílio de erlemayer, com cerca de 1 ml de WPM líquido sem carvão ativado. A estes propágulos mantidos *in vitro* após o corte denominou-se de microcepas *in vitro* (Figura 4b-e). Aos 21 dias após o primeiro e segundo corte (42 dias do primeiro corte), foram avaliados o número de brotações adventícias por microcepa e de entrenós por brotação. As brotações foram utilizadas como fonte de novos explantes. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Para a multiplicação *ex vitro*, miniestacas foram coletadas de mudas de origem seminal três a quatro meses de idade e 20 a 30 cm de altura, mantidas em casa de vegetação, sob sombreamento de 50% e irrigação automática por aspersão. Instalou-se dois testes, no primeiro testou-se a influência da aplicação de AIB nas concentrações de 0 ou 1000 mg L⁻¹ por 10 s na base das miniestacas. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com trinta repetições. No segundo teste miniestacas com tamanhos entre 2,50 a 4,0 cm (Tamanho 1); 4,01 a 5,5 cm (Tam. 2) e 5,51 a 7,00 cm (Tam. 3) também foram submetidas à aplicação basal de AIB nas concentrações de 0 ou 1000 mg L⁻¹ por 10 s. O experimento foi um fatorial (tamanho da miniestaca e concentração de AIB) no delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Em ambos os testes as miniestacas foram plantadas em bandejas de 128 alvéolos, contendo substrato Plantmax + vermiculita 1:2. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação, sob sombreamento de 50% e irrigação por aspersão por 5 min (hora em hora das 11 às 15 h e a cada 2 horas das 7 às 10 h e das 16 às 19 h). Aos 60 dias foram avaliadas as porcentagens de sobrevivência, enraizamento e formação de calo.

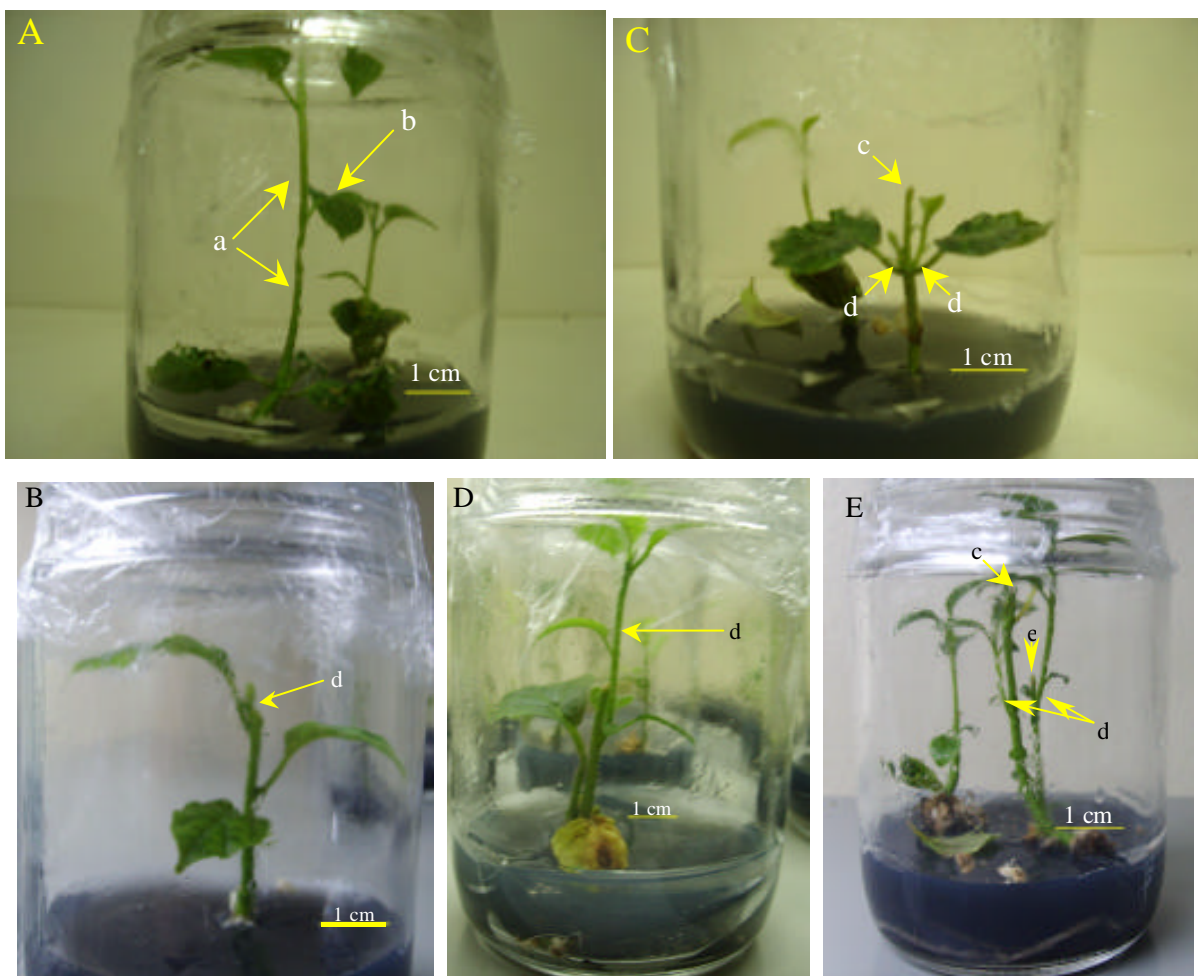


Figura 4 – Propágulo aos 28 dias de crescimento em meio de cultivo WPM acrescido de 7 g L^{-1} de Agar, 30 g L^{-1} de sacarose e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, apto ao corte da parte aérea e formação da microcepa (A), microcepa aos 7 e 14 dias do 1º corte (B e C), microcepa aos 21 dias do 1º corte, apta para o segundo corte (D) e microcepa aos 21 dias do 2º corte (E). a – pontos para corte acima ou abaixo da 1ª folha verdadeira, b – 1ª folha verdadeira, c – 1º corte, d – brotações, e – 2º corte. Santa Maria, RS, 2007.

4.3 Resultados e discussão

Na multiplicação *in vitro*, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura WPM mostrou diferenças significativas somente para a altura de plântula (Tabela 4). Entretanto, o melhor resultado não diferiu estatisticamente da testemunha. A combinação de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 com $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA promoveu o aumento da emissão de folhas, em relação à testemunha sem fitoreguladores, sem contudo apresentar diferenças nas demais variáveis (Tabela 5).

O GA_3 tem sido mais freqüentemente utilizado na micropropagação, para

promover o alongamento caulinar (Mantovani et al., 2001). A adição de ANA ao meio de cultura de isolamento e multiplicação visa a acelerar o crescimento da plântula. (Vieira e Monteiro, 2002). O BAP normalmente proporciona elevadas taxas de multiplicação (Mantovani e Franco, 1998).

Tabela 4 – Desenvolvimento de explantes de *Cordia trichotoma*, na fase de multiplicação, após 30 dias de isolamento em meio WPM acrescido de 0.05, 0.10, 0.15 ou 0.20 mg L⁻¹ de Ácido 6-indolbutírico (BAP), Ácido nafatale no acético (ANA), Ácido giberélico (GA₃) ou sem a adição destes. Santa Maria, RS, 2007

Tratamentos(mg L ⁻¹)	Altura (mm)	Folhas (n ^o)	Entrenós (n ^o)
GA₃/0,10	4,00 a*	3,33 a	2,00 a
ANA/0,05	2,83 ab	2,33 a	2,00 a
BAP/0,15	2,00 ab	2,00 a	1,67 a
0	1,66 ab	2,00 a	1,67 a
GA₃/0,05	1,66 ab	2,33 a	1,33 a
ANA/0,10	1,33 ab	2,00 a	1,33 a
BAP/0,05	1,17 ab	1,33 a	1,33 a
GA₃/0,20	1,17 ab	2,00 a	1,33 a
GA₃/0,15	1,00 ab	2,33 a	1,33 a
ANA/0,15	0,83 b	2,00 a	1,67 a
ANA/0,20	0,83 b	2,33 a	2,00 a
BAP/0,20	0,50 b	2,33 a	1,33 a
BAP/0,10	0,00 b	2,00 a	1,33 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre pelo teste de tukey a 5% de probabilidade de erro.

Neste trabalho, a adição de reguladores de crescimento, isolado ou em combinação, não promoveram os efeitos esperados, discordando de Mantovani et al. (2001) que observaram maior crescimento da parte aérea, facilitando a individualização, contagem e aproveitamento das brotações de louro-pardo. A adição de 0,01 mg L⁻¹ de ANA em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP aumentou o número de brotações por explante, sendo que a concentração de 10 mg L⁻¹ de BAP inibiu a formação de brotações, provocou a vitrificação e reduziu a produção de folhas de louro-pardo (Carvalho, 2003). Na multiplicação do bilimbi (*Averrhoa bilimbi*), também não foram observados resultados satisfatórios na combinação de ANA e GA₃ (1 mg L⁻¹) meio de cultivo (Oliveira et al., 2001). Em porta-enxertos de pereira, a

adição de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 0,1 mg L⁻¹ de GA₃ não aumentou a taxa de multiplicação, o que foi obtido com a adição de 0,2 mg L⁻¹ de BAP (Mello-Farias et al., 1996). A adição de BAP ao meio de cultura foi suficiente para a indução de brotações em *Eucalyptus* ssp. (Ponte, 1999), copaíba (*Copaifera lagsdorffii*) (Noletto e Silveira, 2004) e aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (Andrade et al., 2000).

Tabela 5 – Desenvolvimento de explantes de *Cordia trichotoma*, na fase de multiplicação, após 50 dias de isolamento em meio WPM acrescido de 0,00 ou 0,05 mg L⁻¹ de Ácido nafataleno acético (ANA) e 0,00, 0,10 ou 0,20 mg L⁻¹ de Ácido giberélico (GA₃). Santa Maria, RS, 2007

Tratamentos			
GA ₃ /ANA (mg L ⁻¹)	Folhas (nº)	Altura (mm)	Entrenós (nº)
0,20/0,05	3,25 a*	5,00 a	0,25 a
0,10/0,05	2,00 ab	5,00 a	0,50 a
0,00/0,00	1,50 b	3,75 a	0,00 a
0,20/0,00	1,50 b	5,25 a	0,75 a
0,00/0,05	1,50 b	3,00 a	0,25 a
0,10/0,00	1,25 b	3,00 a	0,50 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre pelo teste de tukey a 5% de probabilidade de erro.

A adição de ANA ao meio de cultura pode induzir a formação calos, como observado em goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*) (Dal Vesco e Guerra, 1999), e louro-pardo (Mantovani e Franco, 2001), o que inibe a formação de brotações. Neste trabalho, a calogênese foi uniforme em todos os tratamentos, independente do tipo e da concentração de regulador de crescimento (dados não-apresentados). Em face dos resultados observados, a combinação de ANA/BAP é recomendada em novo teste de multiplicação, em que espera-se melhores resultados.

Na manutenção da parte basal dos propágulos *in vitro*, o corte acima ou abaixo da primeira folha verdadeira para a formação das microcepas promoveu a emissão de brotações para a coleta de novos explantes. Porém, a posição do corte não alterou o número de brotações e de entrenós por microcepa (Tabela 6 e 7). A manutenção *in vitro* da microcepa possibilitou a obtenção de até sete explantes em duas coletas, que somado aos quatro explantes já produzidos no crescimento *in vitro* aos 28 dias, tem-se um rendimento de até 11 explantes aos 70 dias após a

inoculação da semente. Caso as plântulas fossem descartadas no primeiro corte, seriam produzidos apenas quatro explantes do período de crescimento *in vitro*. Portanto, a manutenção da microcepa aumenta a taxa de multiplicação em até 1,75 vezes, demonstrando seu grande potencial de utilização na multiplicação *in vitro* de louro-pardo, sem a adição de reguladores de crescimento. As plântulas regeneradas provavelmente podem ser submetidas ao enraizamento e à aclimatização.

Tabela 6 – Desenvolvimento de brotações em microcepas aos 21 e 42 dias (1ª e 2ª coleta) em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de Agar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado reidratado com WPM líquido sem carvão ativado. Santa Maria, RS. 2007

Microcepa - corte	1ª coleta	2ª coleta	Total
Acima da 1ª folha	1,25 a*	1,50 a	2,75 a
Abaixo da 1ª folha	1,00 a	1,00 a	2,00 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 7 – Desenvolvimento de entre-nós em brotações de microcepas aos 21 e 42 dias (1ª e 2ª coleta) em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de Agar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado reidratado com WPM líquido sem carvão ativado. Santa Maria, RS. 2007

Microcepa - corte	1ª coleta	2ª coleta	Total
Acima da 1ª folha	3,25 a*	3,50 a	6,75 a
Abaixo da 1ª folha	3,67 a	2,33 a	6,00 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Nos testes de propagação *ex vitro*, a imersão das miniestacas de louro-pardo por 10 s em solução contendo 1000 mg L⁻¹ de AIB não aumentou a percentagem de sobrevivência aos 60 dias, comparado com a testemunha (Tabelas 8 e 9). Quanto ao tamanho da miniestaca, as maiores porcentagens de sobrevivência aos 60 dias foram obtidas com miniestacas de 2,5 a 5,5 cm de comprimento (Tabela 9). Esses valores de porcentagens de sobrevivência estão de acordo com os observados em cedro-rosa (*Cedrela fissilis*) (Xavier et al., 2003). Além disso, aplicação de 1000 ou 2000 mg L⁻¹ de AIB não aumentou a sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus grandis* (Titon et al., 2003) e *E. dunnii* (Souza Junior e Wendling, 2003). A viabilidade técnica de utilização da miniestaquia na propagação de espécies lenhosas também

foi comprovada em corticeira-do-mato (*Erythrina falcata*) (Wendling et al., 2005), mogno (*Swietenia macrophylla*), jetiquiba-rosa (*Cariniana legalis*) e sete-cascas (*Britoa guazumaefolia*) (Santos et al., 2000).

Tabela 8 – Porcentual de sobrevivência de miniestacas de *Cordia trichotoma* aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L⁻¹ de AIB por 10 s. Santa Maria, RS, 2007

Solução de AIB (mg L ⁻¹)	Sobrevivência (%)
1000	83,33 a*
0	80,00 a

*Valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 9 – Porcentual de sobrevivência de miniestacas de *Cordia trichotoma* classificadas em diferentes tamanhos, aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L⁻¹ de AIB por 10 s. Santa Maria, RS, 2007

Solução de AIB (mg L ⁻¹)	Classes de tamanho			Médias
	1 ¹	2	3	
0	80	100	20	66,7 A ²
1000	100	100	60	86,7 A
Médias	90 a ²	100 a	40 b	

¹ Classes de tamanho: 1: 2,5 a 4 cm, 2: 4,01 a 5,5 cm e 3: 5,51 a 7 cm.

² Valores seguidos de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Apesar da alta porcentagem de sobrevivência, apenas quatro miniestacadas, submetidas ou não à aplicação de AIB, formaram raízes após 60 dias de cultivo em telado (Figura 5). Foi também observada a formação de calo na base de miniestacas submetidas ou não à aplicação de AIB (Tabela 10) e nos diferentes tamanhos de miniestacas (Tabela 11), porém, sem a diferenciação de raízes. O fato da baixa porcentagem de enraizamento pode estar associado às condições ambientais que as miniestacas foram submetidas, sem controle de umidade relativa e temperatura do ar. Para o enraizamento de miniestacas de *Erythrina falcata* Wendling et al. (2005) mantiveram a umidade relativa do ar acima de 80%. Umidade relativa acima de 80% e temperatura do ar entre 22 a 30° C foram suficientes para o enraizamento de uma alta porcentagem de miniestacas de *Eucalyptus dunnii* (Souza Junior e Wendling, 2003), cedro-rosa (*Cedrela fissilis*) (Xavier et al., 2003), mogno (*Swietenia macrophylla*), jetiquiba-rosa (*Cariniana legalis*) e sete-cascas (*Britoa guazumaefolia*)

(Santos et al., 2000). Portanto, o controle eficiente das condições ambientais é necessário para a obtenção de altas porcentagens de enraizamento de miniestacas, sendo que novos trabalhos devem ser conduzidos com o objetivo de definir essas condições para o louro-pardo.

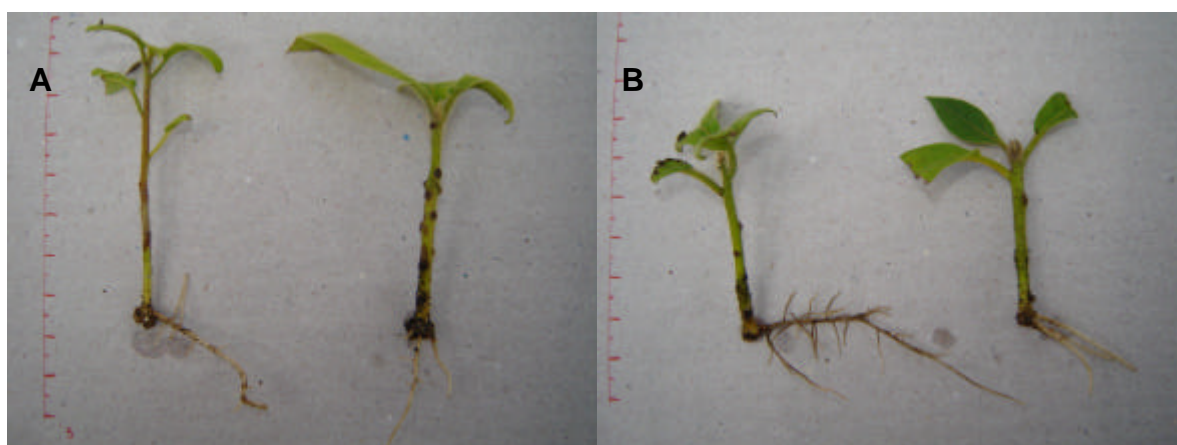


Figura 5 – Miniestacas enraizadas de louro-pardo submetidas à aplicação de 0 mg L⁻¹ (A) e 1000 mg L⁻¹ (B) de AIB após 60 dias de cultivo em telado. Santa Maria, RS, 2007

Tabela 10 – Porcentual de formação de calos em miniestacas de *Cordia trichotoma* aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L⁻¹ de AIB por 10 s. Santa Maria, RS, 2007

Solução de AIB (mg L ⁻¹)	Porcentagem de calogênese
1000	36,6 a*
0	30,0 a

*Valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 11 – Porcentual de formação de calos em miniestacas de *Cordia trichotoma* classificadas em diferentes tamanhos, aos 60 dias após aplicação na sua base de 0 ou 1000 mg L⁻¹ de AIB por 10 s. Santa Maria, RS, 2007

Solução de AIB (mg L ⁻¹)	Classes de tamanho			Médias
	1 ¹	2	3	
0	40	40	0	26,67 A ²
1000	60	40	20	40,00 A
Médias	50 a ²	40 a	10 a	

¹ Classes de tamanho: 1: 2,5 a 4 cm, 2: 4,01 a 5,5 cm e 3: 5,51 a 7 cm.

² Valores seguidos de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

4.5 Conclusões

- A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura WPM não influencia o crescimento de explantes e nem aumenta a taxa de multiplicação *in vitro* de louro-pardo.
- A manutenção da microcepa em meio de cultivo WPM, contendo 7 g L⁻¹ de Agar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, aumenta a taxa de multiplicação de louro-pardo.
- A aplicação de solução de AIB 1000 mg L⁻¹ por 10 s na base de miniestacas de louro-pardo não aumenta a sobrevivência das mesmas.
- Miniestacas entre 2,5 e 5,5 cm de comprimento apresentam a maior percentagem de sobrevivência.

5 Discussão geral

A cultura de tecidos possibilita a manipulação de células, tecidos e órgãos *in vitro*, em virtude da competência morfogenética vegetal (Mantovani e Franco, 1998). A cultura de tecidos é uma opção de propagação vegetativa em relação aos métodos tradicionais (Rohr, 1989), sendo que a técnica de micropropagação possibilita a produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária em larga escala (Gratapaglia e Machado, 1998). A micropropagação é especialmente interessante para espécies de alto valor comercial e que tenham algum tipo de limitação para a produção de mudas partindo de sementes.

O louro-pardo é uma espécie nativa de alto valor comercial, possui sementes recalcitrantes, com viabilidade aproximada de três meses que dificulta a produção de mudas ao longo do ano, e dormência tegumentar (Carvalho, 2003). O tegumento das sementes também dificulta a desinfestação por proteger e/ou manter patógenos associados. Em testes preliminares de estabelecimento *in vitro*, verificou-se que a desinfestação de sementes inteiras atingia valores de apenas 0 a 5%. A embebição das sementes por até 24 h facilita a retirada do tegumento e a desinfestação da semente sem afetar a germinação, atingindo, nesse caso, desinfestação de até 95%. As partes aéreas das plântulas, com 30 dias após a semeadura, podem ser utilizadas como explantes que, cultivados por igual período em meio WPM sem reguladores de crescimento, podem ser fonte de explantes para a micropropagação. A eficiência do meio WPM para a micropropagação de espécies lenhosas também foi observada para a caixeta (Mantovani et al., 2000) e peroba-rosa (Ribas et al., 2005).

Para a multiplicação do louro-pardo, a adição de fitorregulador ao meio de cultura WPM não proporcionou uma maior produção de plântulas. Diferentemente ao que observaram na multiplicação do viburnum (*Viburnum odoratissimum*), na qual a adição de GA₃ apresentou melhores resultados (Schoene e Yeger, 2005). Plântulas fornecedoras de segmentos nodais e ápices caulinares foram mantidas *in vitro* com a adição de meio líquido WPM. As microcepas produziram novas brotações que forneceram novos explantes aos 21 e aos 42 dias de cultivo. A manutenção da microcepa tem como vantagens a utilização do mesmo meio de cultura sem adição

de fitorregulador, o rápido crescimento promovido pelo sistema radicular estabelecido e o aumento da taxa de multiplicação. Cada coleta forneceu entre 3 e 4 novos explantes, ou seja, a taxa de multiplicação foi aumentada em aproximadamente 1,75 vezes com a manutenção da microcepa. A manutenção de microcepas *in vitro* provavelmente não foi avaliada em outras espécies lenhosas, oferecendo grande oportunidade para aumentar a taxa de multiplicação.

A miniestaquia tem sido utilizada com sucesso para a propagação de corticeira-do-mato (Wendling et al., 2005), cedro-rosa (*Cedrella fissilis* Vell.) (Xavier et al., 2003), *Eucalyptus* sp. (Wendling, 2002), *E. grandis* (Wendling e Xavier, 2005; Titon et al., 2003) e *E. dunnii* (Souza-Junior e Wendling, 2003). Entretanto, o enraizamento das miniestacas de louro-pardo não foi satisfatório, provavelmente pela falta de controle da umidade relativa do ar. Altos índices de enraizamento (de até 100%) foram apresentados para espécies como o *Eucalyptus grandis* (Titon et al., 2002), cedro-rosa (Xavier et al., 2003) e corticeira-do-mato (Wendling et al., 2005) em condições ambientais de umidade relativa do ar de 80%.

6 Conclusão geral

Para a germinação *in vitro*, as sementes de louro-pardo devem ser submetidas a um período de embebição por até 24 h, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 30 min para facilitar a remoção do tegumento e a desinfetação. Sementes sem tegumento são eficientemente desinfestadas com a imersão em álcool 70% por 30 s e germinam em meio de cultura contendo água destilada, 7 g L⁻¹ de agar 30 g L⁻¹. Plântulas produzidas assepticamente fornecem explantes de segmentos nodais e ápices caulinares, restando uma microcepa formada pelo sistema radicular e a parte aérea até a primeira folha verdadeira. Aos 21 dias de cultivo após o primeiro e segundo cortes, as brotações são utilizadas como fonte de explantes e proporcionam um aumento de até 1,75 vezes na taxa de multiplicação *in vitro* do louro-pardo. Miniestacas entre 2,5 e 5,5 cm apresentaram alta porcentagem de sobrevivência, porém com baixa porcentagem de enraizamento. Novos experimentos devem ser conduzidos para avaliar o enraizamento de miniestacas de louro-pardo em ambiente com alta umidade relativa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F.; **Clonagem e doenças do Eucalipto** Vicososa: UFV, 2004. 442p.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

BARATA, R. M.; CHABREGAS, S. M.; KLUGE, R. A. Biossíntese de auxinas e giberelinas. In: CAMARGO E CASTRO, P. R.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 49-62

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes**: Morfologia aplicada a sistemática de dicotiledôneas, Viçosa: Universidade federal de Viçosa, 1999. 443p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1983. 512p.

BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. 2ed., Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1982. p. 4-35.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 1, 1998. p. 87-132.

BRITO, G. J. M.; CASTRO, P. R. C. Biossíntese de citocininas, ácido abscísico e etileno. In: CAMARGO E CASTRO, P. R.; ALVES DE SENA, J. O.; KLUGE, R. A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Eduem, 2002. p. 63-78.

CARVALHO, P. E. R.; **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, v. 1, 2003. 1039p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira.** Colombo: Embrapa Florestas, 1994. 640p.

CARVALHO, P. E. R.; Produção de mudas de espécies nativas por sementes e a implantação de povoamentos. In: GALVÃO, A. P. M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais.** Colombo: Embrapa Florestas, 3 ed., 2000. p. 15-18.

CLEMENT, C. R. Melhoramento de espécies nativas (Improvement of native species). In: Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S.; Valadares-Inglis, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas.** Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, Rondonópolis, MT. 2001. p. 423-441.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C. O.; PINHEIRO, A. L. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Arvore**, v. 28, p. 633-642, 2004.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação de goiabeira serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, p. 60-64, 1999.

DAMIÃO FILHO, C. F. **Micropropagação.** Jaboticabal: FUNEP, 1995. 60p.

DEBERGH, P. C. Effects of Agar brand and concentration on tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 270-276, 1983.

FERREIRA, C. A.; GALVÃO, A. P. M. Importância da atividade florestal do Brasil. In: GALVÃO, A.P.M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais.** Colombo: Embrapa Florestas, 3 ed., p. 15-18, 2000.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v. 1, 1998. p. 45-68.

GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. Biotechnology. Milestones. **In vitro Cellular e Developmental Biology-plant**, Columbia, v. 38, p. 84-92, 2002.

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

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-CNPQ, v. 1, 1998. p. 183-260.

GUPTA, P. K. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell, Tissue and organ culture**, v. 6, p. 33-39, 1986.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.

HARRINGTON, J. F. Seed storage longevity. In: KOZLOSKI, T. T. **Seed biology**, New York: Academic, v. 3, 1972. p. 145-245.

HARTNEY, H. T. Vegetative propagation of the *Eucalyptus*. **Australasian Forestry Research**, 10: 191-211, 1980.

HEDDEN, P.; KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 1197-1210, 1997.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N.; Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica-IPEF**, n. 192, 2000.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus*. **Circular Técnica-IPEF**, n. 194, 2002.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan Publishing Co., 1983. p. 177-227.

LIMA E BORGES, E. E.; PEREZ, S. C. J. G. A.; BORGES, R. C. G. et al. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 5, p. 603-613, 2002.

LIMA, L. S. H.; Clonagem de Eucalyptus spp., **Relatório de Atividades**, Santa Maria, 2000.

LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1981.

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

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.

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

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; GUERRA, M. et al Micropropagação de caixeta (*Didimopanax morototoni*). **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 47-61, 2000.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. **Série técnica: Cultura de tecidos de plantas lenhosas**, Santa Maria, v. 12, 1998. 132p.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; ANGONESI, L. et al. Resultados preliminares da micropropagação de louro-pardo *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo, 1996. p. 445.

MARCHIORI, J. N. C. **Elementos de dendrologia**. Santa Maria: Ed. da Universidade Federal de Santa Maria, 2. ed., 2004. 176 p.

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

MELLO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira, "old home" x "farmingdale" 9. **Revista Brasileira de Agrôciencia**, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1996.

MELO, J. T.; SILVA, J. A.; TORRES, R. A. A.; SILVEIRA, C. E.; CALDAS, L. S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA, CPAC. Planaltina, DF, 1998. p. 195-243.

MELO, N. F.; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*malpighia emarginata* dc.). *Ciência e Agrotecnica*, Lavras-MG, v.23, n.1, p-102-107, 1999.

MENDONÇA, E. A. F.; RAMOS, N. P.; PAULA, R. C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro pardo) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2001.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. **Bot. Bull. Academia Sinica**, v. 18, p. 1-24, 1977.

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

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

NETO, D. A., TAVARES, S. Translocação de hormônios vegetais. In: CAMARGO E CASTRO, P. R.; ALVES DE SENA, J. O.; KLUGE, R. A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Eduem, 2002. p.123-137.

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

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, L. M.; Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, p. 597-603, 2003.

OLIVEIRA, A. K. D.; ROCHA, R. H. C.; OLIVERA, O. F.; CÂMARA, F. A. A. Multiplicação *in vitro* do bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, Mossoró-RN, n. 14, v. 1, p. 37-41, 2001.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1995

PONTE, E. M.; **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* ssp. *Globulus* Labill.** 1999. 46f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIZ, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Governo do Estado do RS, 1988. 525p.

RESENDE, M. D. V.; MAURO, R. A. Genética de populações e conservação de animais silvestres. In: COSTA, R. B. da (organizador). **Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região centro-oeste**. Campo Grande: UCDB, 2003. p. 75-112

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L. et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Arvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

RIZZINI, C. T. **Arvores e madeiras úteis do Brasil: Manual de dendrologia Brasileira**. São Paulo, Ed. Blücher, 1971. 294p.

ROHR, R.; Maidenhair tree (*Ginkgo biloba* L.). In: BAJAI, Y.P.S.; **Biotechnology in agriculture and forestry 5 – Trees II**. Ed. Springer-Verday. Alemanha, 1989. p. 575-590.

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

SANTOS, C. H.; DOMINGUES, M. C. S. Mecanismos de ação de auxinas. In: CAMARGO E CASTRO, P. R.; ALVES DE SENA, J. O.; KLUGE, R. A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Eduem, 2002. p. 35-47.

SANTOS, G. A.; XAVIER, A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestacas de jequitiba rosa, sete cascas e mogno: resultados preliminares. In: 10º SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. **Anais ...** Viçosa:UFV, 2000. 63p.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C.; Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da oxidação e contaminação. **CERNE**, V.7, n.2, p.117-123, 2001.

SCHEEREN, L. W.; SCHNEIDER, P. S. P.; FINGER, C. A. G. Crescimento do louro-pardo, *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud., na depressão central do estado do Rio Grande do Sul In: **Ciência Florestal**, v. 12, n. 2, p. 169-176, 2002.

SCHOENE, G.; YEAGER, T. Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). **Plant Cell and Organ Culture** v. 83, p. 271-277, 2005.

SMITH, L. B. **Boragináceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1970. 85 p.

SOUSA, A. S.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUSA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.11-37.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaca de material juvenil. **Boletim de Besquisas Florestais**. Colombo, n. 46, p. 21-30, 2003.

TACORANTE, M.; VIELMA, M.; MORA, A. et al. Propagación *in vitro* de caoba (*Switenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. **Acta Botánica Venezoelana**, v. 55, p. 7-12, 2004.

THORPE, T. A., HARRY, I. S., KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 311-336.

THORPE, T. A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I. K. **Perspectives in plant cells and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p. 71-111.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; REIS, G. G.; Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003..

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**. Viçosa, MG, n. 26, n. 6, 2002. p. 665-673.

VIEIRA, E. L.; MONTEIRO, C. A. Hormônios vegetais. In: CAMARGO E CASTRO, P. R.; ALVES DE SENA, J. O.; KLUGE, R. A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Eduem, 2002. p. 79-104.

XAVIER, A.; WENDLING, I. Influência do Ácido Indol Butírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**. Viçosa, MG, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis*). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2003.

XAVIER, A.; SANTOS, G.A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M.L. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Arvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 2, p. 139-143, 2003.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I - princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa:UFV, 2002. 64p.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento ex vitro de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas in vitro. In: **Scientia forestalis**. n. 51, p. 29-36, jun. 1997

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de corticeira-domato a partir de propágulos juvenis. **Comunicado técnico**, v. 130, Colombo, PR, 5p., 2005.

WENDLING, I. **Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação.** 2002. 105f. Tese (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia.** 1999. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Aspecto da minicepa (A) e das miniestacas (B) aos 30 dias de cultivo em telado (C). a – Miniestaca morta, b – miniestacas sobreviventes. Santa Maria, RS, 2007.



ANEXO B – Aspecto das miniestacas de louro-pardo (experimento 2) aos 60 dias de cultivo em casa de vegetação tipo telado (T1 = Tamanho 1 + AIB 0 mg L⁻¹, T2 = Tam1 + AIB 1000 mg L⁻¹, T3 = Tamanho 2 + AIB 0 mg L⁻¹, T4 = Tamanho 2 + AIB 1000 mg L⁻¹, T5 = Tamanho 3 + AIB 0 mg L⁻¹ e T6 = Tamnho 3 + AIB 1000 mg L⁻¹). Santa Maria, RS, 2007.

