



**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE**  
*Cedrela fissilis Vell.*

---

**Dissertação de Mestrado**

***Vanessa Fiad Martins do Amaral***

**PPGEF**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE  
*Cedrela fissilis* Vell.**

por

***Vanessa Fiad Martins do Amaral***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal,  
Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria ,  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia Florestal**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elci Terezinha Henz Franco**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**Ministério da Educação  
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

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE  
*Cedrela fissilis* Vell.**

elaborada por

**Vanessa Fiad Martins do Amaral**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia Florestal**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elci Terezinha Henz Franco (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juçara Terezinha Paranhos (UFSM)**

---

**Prof. Dr. Dílson Antônio Bisognin (UFSM)**

Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2006

A meus pais, Cícero e Wânia Chafi pelo  
amor, confiança e exemplo de  
vida .

OFEREÇO

A meus irmãos Rogério e Renato  
Com carinho, amizade e grande afeto.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter sempre iluminado meu caminho e por permitir a realização de mais uma conquista em minha vida

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

À professora Dra. Elci Terezinha Henz Franco, pelo apoio e orientação.

Ao professor co-orientador Dr. Juarez Martins Hoppe (*in memoriam*), pelo incentivo, amizade e disponibilidade sempre que precisei.

À funcionária Cerlene Machado pelo auxílio e compreensão nos momentos necessários.

Aos colegas de laboratório de cultura de tecidos vegetais, em especial à Paula, Fernanda e Tânia, pela colaboração e amizade ao longo desse trabalho.

Ao Alexandre pelo carinho, companhia e apoio incondicional.

A certas pessoas que, mesmo sem saber, pelos pequenos gestos, proporcionaram-me grande alegria: Juliana (Jú); Fabiano (Lulu), Edison (Bacana) e Magda, por sua dedicação e ajuda nos momentos mais difíceis.

A todos que uma forma ou de outra colaboraram na execução deste trabalho.

Obrigada.

“Não é o quanto você faz,  
mas quanto amor  
coloca ao fazer.  
Não é o quanto você doa,  
Mas quanto amor  
Coloca ao doar.”

**(Madre Tereza de Calcutá)**

**1910-1997**

## RESUMO

### MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Cedrela fissilis* Vell.

Autor: Vanessa Fiad Martins do Amaral

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elci Terezinha Henz Franco

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2006.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da regeneração *in vitro* de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), uma árvore nativa de interesse econômico, pertencente à família Meliaceae. Para a desinfestação de sementes, foram testadas diferentes concentrações e tempos de imersão em hipoclorito de sódio e para a germinação, diferentes meios de cultura. Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais, foram adicionados ao meio de cultura WPM, reduzido a  $\frac{3}{4}$  de sua concentração original, benlate (300 mg.l<sup>-1</sup>) e sulfato de estreptomicina (10 mg.l<sup>-1</sup>). Após, segmentos do nó cotiledonar advindos de plântulas germinadas *in vitro* com 30 dias de idade, foram utilizados para a multiplicação de brotações nos meios de cultura MS e WPM, em combinação ou não com 5µM.l<sup>-1</sup> de BAP ou KIN. Foi testado também, a influência da citocinina BAP (0; 1,25; 2,5 e 5,0 µM.l<sup>-1</sup>) combinada ou não com as auxinas AIB ou ANA (0,5µM.l<sup>-1</sup>) em meio de cultura WPM durante dois subcultivos. Os segmentos do nó cotiledonar com 60 dias de cultivo em meio WPM e BAP (0; 1,25; 2,5 e 5,0 µM.l<sup>-1</sup>) foram transferidos para meio WPM adicionado apenas de GA<sub>3</sub> a 3µM.l<sup>-1</sup> permanecendo por mais 30 dias. Os resultados demonstram que as sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos apresentaram a menor taxa de contaminação por fungos (8,7%) e a maior percentagem de germinação (80%), os meios MS e WPM proporcionaram percentagem de germinação de 72,5%. Os segmentos nodais de plantas de três anos de idade apresentaram uma taxa média de contaminação por bactérias de 13% após 21 dias de inoculação quando cultivados em meio de cultura WPM adicionado de benlate (300mg.l<sup>-1</sup>) mais sulfato de estreptomicina (10 mg.l<sup>-1</sup>) e taxa de sobrevivência de 83%. Os explantes provenientes da região do nó cotiledonar apresentaram regeneração média de brotações de 2,8 quando cultivados em meio WPM suplementado com BAP a 5µM.l<sup>-1</sup>, enquanto que, no meio MS, a taxa média de brotações foi de 2,5 por explante. Quanto testados em meio de cultura WPM, em diferentes concentrações de BAP, apenas aos 30 dias de cultivo, houve interação entre as doses da citocinina e a presença das auxinas AIB e ANA. O BAP a 5µM apresentou explantes com maiores taxas de multiplicação de brotações independente da adição das auxinas ao meio de cultura. Nos subcultivos subsequentes, não houve interação entre as concentrações e o efeito da presença de auxina, em que o meio sem a presença desta, adicionado o BAP a 5µM, proporcionou a maior média de brotações por explante 2,29 (60 dias). O número médio de nós aos 30 dias de cultivo foi de 2,84 no meio contendo ANA mais 2,5 µM de BAP. Enquanto que, aos 60 dias, o meio de cultura sem auxina proporcionou uma média de 4,15 nós por explante, diferindo estatisticamente dos meios contendo auxina. Aos 90 dias de cultivo, o número de nós foi de 5,59 quando utilizado BAP a 5µM mais AIB ao meio de cultura. Quanto ao comprimento médio das brotações, o meio contendo ANA mostrou ser o mais eficiente (0,86 cm) aos 30 dias de cultivo. Aos 60 dias, o comprimento médio das brotações foi de 0,95 e, aos 90 dias o comprimento médio de brotações foi de 1,14. A formação de calos na base dos explantes ocorreu quando foi adicionada citocinina ao meio, e a formação de raízes ocorreu na ausência desta e na presença de auxina, gerando plantas completas. Explantes expostos ao GA<sub>3</sub> aos 60 dias de cultivo mostraram parcial reversão, apresentando um aumento na percentagem de raízes formadas e comprimento médio de brotações.

Palavras-chavas: *Cedrela fissilis*, cultura de tecidos, BAP, ANA, AIB, KIN

## ABSTRACT

### ***IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Cedrela fissilis* Vell.**

Author: Vanessa Fiad Martins do Amaral  
Adviser: Prof. Dr<sup>a</sup>. Elci Terezinha Henz Franco  
Place and Date of the Defense: Santa Maria, February 24<sup>th</sup>, 2006.

This study had as objective to study the *in vitro* regeneration of cedar (*Cedrela fissilis* Vell.), a native tree of economic interest, belonging to Meliaceae family. For seeds desinfestation, different treatments with sodium hypochlorite in different concentration and immersion times were tested combined with different culture mediums. To establish the nodal segments *in vitro*, benlate at 300 mg.l<sup>-1</sup> and streptomycine sulphate at 10 mg.l<sup>-1</sup> were added to the culture medium WPM reduced to ¾ of its salts concentration, isolated or not. After that, the hypocotyl segments from the 30 days *in vitro* cultured plants were used as explant in sprouts multiplication in culture mediums MS and WPM combined or not with the cytokinins BAP and KIN at 5µM.l<sup>-1</sup>. It was also tested, in hypocotyl segments, the influence of BAP (0; 1,25; 2,5 and 5,0 µM.l<sup>-1</sup>) combined with the IBA or NAA (0,55µM.l<sup>-1</sup>), in culture medium WPM during two subcultives. 60 days hypocotyl segments from cultivate in BAP (0;1,25; 2,5 and 5,0 µM.l<sup>-1</sup>) were transferred to WPM medium added of only GA<sub>3</sub> at 3µM.l<sup>-1</sup> remaining during more than 30 days. Seeds desinfestated with sodium hypochlorite at 2% during 10 minutes showed a lower index of fungal contamination (8,7%) and the higher index of germination (80%), the mediums MS and WPM allowed the germination of 72,5%. The nodal segments from 3 years old plants showed an average index of bacterial contamination (13% 21 days after the inoculation) when cultivated in WPM culture medium added of benlate (300mg.l<sup>-1</sup>) plus streptomycine sulphate (10 mg.l<sup>-1</sup>) and survival index of 83%. The explants from the hypocotyl region showed average indexes of regeneration of 2,8 when cultivated in WPM medium supplemented with BAP at 5µM.l<sup>-1</sup>, on the other hand, in MS medium, the average tax of formation was 2,5 sprouts per explant. When tested in WPM culture medium, in different BAP concentrations, only at 30 days of cultivate there was an interaction between the cytokinins doses and the presence of auxins IBA and NAA. BAP at 5µM showed explants with higher taxes of multiplication, regardless the auxins addition to the culture medium. In the following subcultives there was not an interaction between the concentrations and the effect of auxin presence, where the medium without auxin, associated to BAP at 5µM, promoted a higher average of sprouts per explant 2,29 (60 days). The average number of knots at 30 days of cultivate was of 2,84 when evaluated the medium with ANA plus 2,5µM of BAP. At 60 days, the culture medium without the auxine promoted an average of 4,15 knots per explant, differing statistically from the mediums with auxin. At 90 days, the number of knots were 5,59 when BAP was used at 5µM plus IBA. The average length of the sprouts in the medium with NAA showed to be the more efficient (0,86 cm) at 30 days of cultivate. At 60 days, the average length of the sprouts was of 0,95 and, at 90 days the average length of the sprouts was of 1,14. The formation of callus in the base of the explants happened when cytokinins were added to the medium, and the roots formation happened in the absence of these and in the presence of the auxin, generating complete plants. Explants exposed to GA<sub>3</sub> at 60 days of cultivate showed a partial reversion, showing an increase in formed roots and average length of the sprouts.

Key-words: *Cedrela fissilis*, tissue culture, BAP, NAA, IBA, KIN.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Planta de <i>Cedrela fissilis</i> com três anos de idade, cultivada em sala de crescimento podada a 10 cm de sua base, emitindo novas brotações.....	17
FIGURA 2 – Etapas realizadas no processo de desinfestação de segmentos nodais e sementes de <i>Cedrela fissilis</i> (Vell.).....	20
FIGURA 3 – Fases do processo de cultivo <i>in vitro</i> realizados no cedro.....	23
FIGURA 4 – Procedimento utilizado para testar o efeito residual de BAP no comprimento e enraizamento de explantes de <i>Cedrela fissilis</i> Vell.....	26
FIGURA 5 – Porcentagem de contaminação de sementes de <i>Cedrela fissilis</i> por fungos aos 15 e 30 dias submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação e submetidos a diferentes meios de cultura.....	28
FIGURA 6 – (A) Aspecto das plântulas de <i>Cedrela fissilis</i> no estabelecimento de sementes em meio de cultura WPM após 30 dias de inoculação; (B) detalhe da formação da radícula após 30 dias de cultivo.	29
FIGURA 7 – Porcentagem de germinação de sementes de <i>Cedrela fissilis</i> submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação e inoculadas em diferentes meios de cultura após 15 e 30 dias de cultivo.....	30
FIGURA 8 – Porcentagem de oxidação, contaminação bacteriana e sobrevivência de segmentos nodais de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. em meio WPM reduzido a $\frac{3}{4}$ de sua concentração salina.....	33
FIGURA 9 – <b>A:</b> Brotação emitida, nas plantas doadoras de explante, após poda realizada; <b>B:</b> Segmento nodal estabelecido em meio de cultura $\frac{3}{4}$ dos sais de WPM adicionado de 15 g.L <sup>-1</sup> de sacarose, Benlate (300mg.l <sup>-1</sup> ) e Sulfato de Estreptomicina (10mg.l <sup>-1</sup> ); <b>C:</b> Segmento nodal contaminado com bactéria após 10 dias de cultivo.....	35
FIGURA 10 – Número médio de brotações de <i>Cedrela fissilis</i> formado aos 30 dias em meio de cultivo MS e WPM adicionados ou não de citocininas BAP ou KIN.....	37

FIGURA 11 – Frequência de explantes que emitiram brotações aos 30 dias de cultivo de <i>Cedrela fissilis</i> em meio de cultivo MS e WPM adicionados ou não de citocininas BAP ou KIN.....	38
FIGURA 12 – Percentagem de formação de raízes e calos em segmentos nodais de <i>Cedrela fissilis</i> em meio de cultivo MS e WPM adicionados ou não de citocininas BAP ou KIN.....	39
FIGURA 13 – Número de brotações por segmento do nó cotiledonar de <i>Cedrela fissilis</i> em meio WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ aos 30 dias de cultivo.....	41
FIGURA 14 – Número de brotações por segmento do nó cotiledonar de <i>Cedrela fissilis</i> em meio WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ , obtidas aos 60 e 90 dias de cultivo.....	42
FIGURA 15 – Efeito da citocinina BAP (0; 1,25; 2,5 e $5\mu\text{M.l}^{-1}$ ) na formação de brotações de cedro em meio de cultura WPM combinada ou não com AIB ou ANA a $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ aos 60 dias de cultivo.....	44
Figura 16 – Número de nós/explante de <i>Cedrela fissilis</i> em meio WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ , obtidas aos 60 e 90 dias de cultivo.....	46
FIGURA 17 <b>A e E</b> – Brotações do nó cotiledonar (30 dias) em meio de cultura WPM, suplementado com BAP ( $5,0\mu\text{M.l}^{-1}$ ) mais AIB ( $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ ); <b>C</b> – Brotações (30 dias) em meio WPM suplementado com BAP ( $1,25\mu\text{M.l}^{-1}$ ); <b>E</b> – Brotações (60 dias) em meio WPM mais ANA ( $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ ), <b>B</b> – Brotações do nó cotiledonar (60 dias) em meio de cultura suplementado com BAP ( $2,5\mu\text{M.l}^{-1}$ ).....	48
FIGURA 18 – Efeitos dos tratamentos com BAP, combinados ou não com AIB ou ANA, na formação de calos em brotações de <i>Cedrela fissilis</i> , obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo partindo do hipocótilo de sementes germinadas <i>in vitro</i> .....	49
FIGURA 19 – Efeitos dos tratamentos com BAP, combinados ou não com AIB ou ANA, na formação de raízes em brotações de <i>Cedrela fissilis</i> , obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo partindo do hipocótilo de sementes germinadas <i>in vitro</i> .....	50

FIGURA 20 – Regressão cúbica para a percentagem de formação de raízes adventícias em segmentos nodais de cedro aos 60 dias de cultivo em meio WPM e submetidos às diferentes concentrações de BAP .....	52
FIGURA 21 – Regressão linear mostrando o efeito residual de BAP às diferentes concentrações sobre a percentagem de formação de raízes adventícias em segmentos nodais de cedro aos 90 dias de cultivo em meio WPM adicionado de GA <sub>3</sub> a 3µM.l <sup>-1</sup> e retirados da exposição ao BAP .....	53
FIGURA 22 – (A) Aspecto de segmentos nodais de cedro aos 60 dias de cultivo em meio WPM suplementado com BAP a 2,5 M.l <sup>-1</sup> ; (B) Aspecto de segmento nodal de cedro cultivado por 30 dias em meio de cultura suplementado com 3µM.l <sup>-1</sup> de GA <sub>3</sub> e na ausência da citocinina .....	54
FIGURA 23 – Efeitos residuais dos tratamentos com BAP, combinados no comprimento médio de brotações de <i>Cedrela fissilis</i> , aos 60 dias de cultivo e aos 90 dias de cultivo partindo do hipocótilo de sementes germinadas <i>in vitro</i> .....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição dos meios MS (Murashige e Skoog, 1962), WPM (Lloy e McCown, 1980) e LPm (Von Arnold & Eriksson, 1981) testados para a cultura <i>in vitro</i> de <i>Cedrela fissilis</i> Vell.....	18
TABELA 2 – Tratamentos utilizados para indução de brotações múltiplas em explantes de nós cotiledonares de cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> Vell.), obtidos de plântulas com 30 dias.....	24
TABELA 3 – Efeito dos diferentes tratamentos de desinfestação na contaminação por fungos em sementes de <i>Cedrela fissilis</i> (30dias).....	28
TABELA 3 – Percentagem de germinação de sementes de cedro submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação e inoculadas em diferentes meios de cultura após 30 dias de cultivo.....	30
TABELA 4 – Percentagem de segmentos nodais com contaminação bacteriana em <i>Cedrela fissilis</i> nos diferentes tratamentos de assepsia.....	32
TABELA 5 – Número de brotações de <i>Cedrela fissilis</i> formadas por explantes aos 30 dias de cultivo, nos meios de cultura MS e WPM suplementados ou não por BAP ou KIN.....	35
TABELA 6 – Número médio de regeneração de brotações de <i>Cedrela fissilis</i> , obtidas no cultivo inicial, no primeiro e segundo subcultivo em meio de cultura WPM, suplementado com BAP, combinado ou não com AIB ou ANA.....	41
TABELA 7 – Taxa média de regeneração de brotações de <i>Cedrela fissilis</i> , obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo em meio de cultura WPM suplementado ou não com auxina.....	43
TABELA 8 – Número médio de nós/explante em brotações de <i>Cedrela fissilis</i> , obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo em meio de cultura WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ .....	45

TABELA 9 – Comprimento médio de brotações de cedro aos 60 e aos 90 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com BAP a diferentes concentrações (60 dias) e com GA3 a $3\mu\text{M.l}^{-1}$ (90 dias).....	55
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – Ácido indol acético

AIB – Ácido indol butírico

ANA – Ácido 1-naftalenoacético

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

BAP –  $\beta$ -benzilaminopurina

HgCl<sub>2</sub> – Cloreto de mercúrio

KIN – Cinetina

MS – Murashige & Skoog (1962)

TDZ – Thidiazuron

WPM – Wood plant medium, meio de cultura elaborado por Lloyd & McCown (1981)

NaOCl – Hipoclorito de sódio

LPm – Von Arnold & Erikson, 1981

GA<sub>3</sub> – Acido Giberélico

ZEA – Zeatina

BA – Benziladenina

## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 <i>Geral</i> .....	3
1.1.2 <i>Específicos</i> .....	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Característica e distribuição da espécie</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Importância ecológica e econômica</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 Cultura de tecidos</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4 Fatores que influenciam a multiplicação</b> .....	<b>6</b>
<b>2.5 Tipos de explante e estabelecimento da cultura</b> .....	<b>7</b>
<b>2.6 Meio de cultura</b> .....	<b>10</b>
<b>2.7 Reguladores de crescimento</b> .....	<b>11</b>
<b>2.7.1 Citocininas</b> .....	<b>12</b>
<b>2.7.1 Auxinas</b> .....	<b>13</b>
<b>2.7.1 Giberelinas</b> .....	<b>14</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Cultivo de plantas fornecedoras de explantes <i>ex vitro</i></b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Condições de cultivo</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Experimento 1– Estabelecimento de culturas assépticas</b> .....	<b>19</b>
3.3.1. Teste 1 – Desinfestação e germinação de sementes.....	21
3.3.2 Teste 2 – Controle da contaminação e oxidação de segmentos nodais de cedro desinfestados com HgCl <sub>2</sub> .....	21
<b>3.4 Experimento 2 – Indução de crescimento e proliferação de gemas axilares</b> .....	<b>22</b>
3.4.1 Teste 1 – Efeito do meio de cultura, BAP e KIN na indução de brotações múltiplas em nós cotiledonares de cedro .....	24

3.4.2 Teste 2 – Indução de crescimento de gemas axilares.....	24
3.4.3 Teste 3 – Efeito residual do BAP no alongamento e enraizamento de brotações.....	25
<b>3.5 Análise estatística .....</b>	<b>26</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Estabelecimento de culturas assépticas .....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Desinfestação e germinação de sementes de <i>Cedrela fissilis</i> .....	27
4.1.2 Controle da contaminação e oxidação de segmentos nodais de cedro desinfestados com HgCl <sub>2</sub> .....	32
<b>4.2 Efeito do meio de cultura, BAP e KIN na indução de brotações múltiplas em nós cotiledonares de <i>Cedrela fissilis</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Indução de crescimento de gemas axilares em segmentos do nó cotiledonar.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 Efeito residual do BAP no alongamento e enraizamento de brotações de cedro.....</b>	<b>51</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família Meliaceae, o cedro (*Cedrela fissilis* Vell), em estado natural, é uma espécie parcialmente umbrófila no estágio juvenil e heliófila no estágio adulto, que ocorre tanto na floresta primária, sobretudo nas bordas da mata ou clareiras, como na floresta secundária, porém, nunca em formações puras. As principais regiões fitoecológicas de ocorrência são Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual. Representa, ao lado da grápia (*Apuleia leiocarpa*) e do louro-pardo (*Cordia trichotoma*), uma das árvores mais comuns e características do interior da floresta latifoliada, especialmente da mata do Alto Uruguai, onde se constata exemplares jovens, adultos e velhos, o que demonstra encontrar-se esta espécie em equilíbrio, regenerando-se naturalmente em quase toda a área (Reitz *et. al.*, 1983 ).

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

Segundo Reitz (1983), trata-se de uma espécie pioneira, que demonstra grande adaptação e agressividade para agrupamentos menos desenvolvidos, sendo encontrada freqüentemente em capoeirões, matas secundárias ou matas semi-devastadas. Apresenta crescimento rápido, sobretudo em solos úmidos, férteis e profundos. É, portanto, uma espécie que apresenta uma das melhores características para a multiplicação e cultivo intensivo, por se tratar de árvore de ótima madeira e de rápido crescimento.

Atualmente, grande parte da utilização da *C. fissilis* baseia-se na exploração sistemática e sem reposição, tornando necessário o uso de programas de conservação de recursos genéticos da espécie como forma de garantir a sua utilização futura.

Segundo Carvalho (1998), um sério problema na cultura do cedro, tanto em viveiros e plantios como em escala menor, na regeneração natural – até o momento não-solucionado – é o ataque às gemas apicais pela broca-do-cedro (*Hypsipyla*

*grandella*), que leva ao desenvolvimento arbustiforme e, em casos extremos, à morte da planta. Para Maxner *apud* Reitz (1983), a broca-do-cedro está se tornando um fator limitante à sua cultura. Para evitar esse problema, recomenda-se não plantar grandes maciços puros, mas formação de matas mistas de essências do mesmo ciclo vegetativo.

A espécie apresenta também alguns problemas relacionados ao seu cultivo. Observa-se uma acentuada variação quanto ao desenvolvimento das plantas, tanto em altura como em diâmetro. Nesse aspecto, o melhoramento genético pode elevar substancialmente seu desempenho silvicultural em crescimento e forma, tornando o sistema de cultivo mais atrativo aos produtores. Para Carvalho (1998), as variâncias genéticas constatadas em mudas de 2 anos de idade indicam que o melhoramento genético do cedro, baseado na seleção de procedências, poderá proporcionar ganho maior do que baseado na seleção de progênies. O autor menciona ainda que determinadas procedências podem assumir posição de destaque quanto ao nível de ataque de *H. grandella*.

Para o melhoramento genético dessa espécie, há a necessidade do conhecimento de uma série de técnicas, das quais muitas delas ainda necessitam de um aprimoramento, como estudos da fisiologia reprodutiva, assim como outros aspectos fundamentais e aplicados nos estudos da espécie.

Muitas espécies florestais exóticas têm sido propagadas por meio de técnicas de cultura de tecidos, porém existem poucos estudos com espécies nativas e, em particular, o cedro. As técnicas de cultura *in vitro* têm sido utilizadas na propagação de muitas espécies, permitindo a produção de grande número de plantas geneticamente idênticas.

A produção de mudas por microestaquia, técnica já usada com algum sucesso, apresenta-se como opção capaz de acelerar o processo de melhoramento genético da espécie, na qual onde a seleção destas com características superiores, podem ser analisadas em um intervalo de tempo relativamente mais curto às técnicas tradicionais realizadas.

Estudos sobre a propagação desta espécie *in vitro*, além de oferecer a possibilidade de produções homogêneas em plantios comerciais e com características desejáveis, apresenta-se como opção eficiente para a conservação da espécie *ex situ*.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Geral

Estudar a multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell visando a estabelecer um protocolo.

### 1.1.2 Específicos

- Estabelecer uma metodologia eficiente para a desinfestação de fontes de explantes.
- Promover a indução e crescimento de gemas axilares em segmentos nodais, através do balanço fitohormonal.
- Avaliar a multiplicação e enraizamento de brotações.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Característica e distribuição da espécie

O cedro-branco (*Cedrela fissilis* Vellozo), espécie pertencente à família Meliaceae, apresenta vasta dispersão geográfica, ocorrendo com regular freqüência desde o Pará até o Rio Grande do Sul. Ocorre também em países como Costa Rica, nordeste da Argentina, leste do Paraguai, Peru, Uruguai, Colômbia, Equador, Venezuela e sul da Bolívia (Carvalho, 1998).

No Estado do Rio Grande do sul, essa espécie é praticamente encontrada em todas as matas, sendo mais freqüente e abundante nas matas subtropicais do Alto Uruguai e seus afluentes onde foi uma das árvores economicamente mais importantes; igualmente era muito comum nas florestas da Depressão Central, nos sub-bosques dos pinhais e no Escudo Rio-Grandense (Reitz *et. al*, 1983 ). O cedro representa 6,05% da distribuição das essências de maior valor econômico, e sua freqüência nas florestas do sul do Brasil varia de uma a três árvores por hectare. Essa densidade reflete tanto o equilíbrio com a broca-do-cedro (*Hypsipyla grandella*) como a característica oportunística da espécie, que demanda de formação de clareiras para se desenvolver plenamente (Carvalho, 1998).

### 2.2 Importância ecológica e econômica

O cedro é uma árvore decidual de 25 a 35 metros de altura, que apresenta um tronco de 60 a 150 cm de DAP (diâmetro à altura do peito) com ramificação dicotômica ascendente, formando copa arredondada muito típica. As folhas são longas, curvadas e decíduais, alternas compostas, pinadas, grandes (60 a 120 cm de comprimento por 20-30 cm de largura) (Reitz *et al.*, 1983). A inflorescência apresenta um tirso amplo com 25-30 cm de comprimento bastante denso e geralmente mais curto que as folhas, sendo que suas flores possuem 12 mm de comprimento. A inflorescência ocorre de setembro a novembro e a frutificação, de abril a agosto no Rio Grande do Sul (Carvalho, 1998). Os frutos constituem de uma cápsula septífraga, com várias sementes por fruto (Reitz *et al.*, 1983).

O cedro é uma essência parcialmente esciófila no estágio juvenil e heliófila no estágio adulto (Inoue *apud* Carvalho, 1998). Se desenvolve no interior da floresta

primária, regenerando-se preferencialmente em clareiras ou bordas de mata. Trata-se de uma espécie pioneira, que demonstra grande adaptação e agressividade para agrupamentos menos desenvolvidos (Reitz *et al*, 1983). Por esse motivo, é encontrada freqüentemente nos capoeirões, matas secundárias ou semi-devastadas, uma vez que se verifica uma regeneração natural em quase-toda a área de sua ocorrência. Apresenta também agressividade na vegetação secundária (Costa & Mantovani, 1992).

A madeira apresenta alburno branco a rosado, com cerne variando do bege-rosado-escuro ou castanho-claro-rosado, mais ou menos intenso, até castanho-avermelhado. Possui resistência moderada ao ataque de organismos xilófagos, com propriedades mecânicas médias, e excelente estabilidade dimensional. Apresenta, portanto, fácil trabalhabilidade, e boa retenção de pregos e parafusos, com excelente absorção de pigmentos e polimento (Carvalho, 1998).

A espécie se caracteriza por apresentar outras utilidades além das encontradas em suas propriedades madeireiras, tais como o óleo essencial cuja propriedade é repelente ao cupim e substâncias tanantes presentes intensamente em sua casca e lenho; é também muito utilizada sua casca na medicina popular com tônica, adstringente e excelente no combate à febre (Carvalho, 1998).

O principal problema na cultura do cedro (tanto em plantios, como em escala menor de regeneração natural), é o ataque às gemas laterais pela broca do cedro (*Hypsipyla grandella*), que leva o desenvolvimento arbustiforme, e em casos extremos, à morte da planta (Carvalho, 1998). Esse é um problema praticamente não-solucionado que limita o reflorestamento com essa espécie.

### **2.3 Cultura de tecidos**

O termo cultura de tecidos vegetais pode ser empregado para vários procedimentos que são utilizados na manutenção e crescimento de células, tecidos e órgãos de plantas em cultura asséptica (*in vitro*) (Hartman *et al.*, 1997).

A cultura de tecidos consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado, em ambiente asséptico. É uma técnica que oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, como também

pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo. Como técnica de clonagem comercial, possibilita a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo, e em reduzida área de laboratório (Paiva & Gomes, 1995).

A aplicação dessa técnica está apoiada na teoria da totipotência, que diz que todas as células vivas têm a capacidade de reproduzir um organismo inteiro, desde que possuam toda a informação genética necessária. Algumas células que constituem os tecidos vegetais conseguem formar uma planta e adquirem capacidade de regeneração, outras perdem essa capacidade e outras morrem (Hartmann *et al.*, 1997). A determinação de uma célula lhes confere a sua competência para reagir a determinados sinais químicos como, por exemplo, os reguladores de crescimento e, conseqüentemente, estando em estágios iniciais de desenvolvimento, expressam com maior facilidade a competência para regenerar novos tecidos e órgãos (Bhojwani & Razdan, 1983).

Murashige (1974) propôs três diferentes estágios para o estabelecimento do cultivo *in vitro*: Estágio I: seleção de explantes, desinfestação e cultivo destes em meio nutritivo, sob condições assépticas; Estágio II: multiplicação dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos, em meios de cultura apropriados e; Estágio III: transferência das partes aéreas produzidas para meio de cultura com reguladores de crescimento indutores de raízes e o posterior transplante das mudas produzidas para substrato ou solo.

O principal objetivo da multiplicação é produzir o maior número de plantas possíveis, no menor espaço de tempo. Portanto, a obtenção de altas taxas de multiplicação deve estar associada à qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois vai determinar o sucesso na fase seguinte de enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998).

## **2.4 Fatores que influenciam a multiplicação**

Em estudos realizados com diferentes espécies, tem sido constatado que são vários os fatores que influenciam no comportamento da cultura *in vitro*, como fatores biológicos (tipo e condição fisiológica do explante, características genéticas e outros), fatores químicos (composição do meio de cultura, pH, composição do ar

durante o processo de crescimento, reguladores de crescimento e outros) e fatores físicos como temperatura, luminosidade, fotoperíodo e outros (Andrade, 1998).

Em consequência da ampla gama de fatores que afetam a cultura de tecidos e o grande número de informações a seu respeito, serão abordados apenas os aspectos referentes ao objetivo deste trabalho.

## **2.5 Tipos de explante e estabelecimento da cultura**

Para a seleção dos explantes, deve-se considerar alguns aspectos, tais como: a finalidade da micropropagação e o nível de diferenciação do tecido (Grattapaglia & Machado, 1998). Dependendo do explante utilizado e da sua manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por meio de multiplicação de gemas axilares, de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e por embriogênese somática direta ou indireta (George, 1993).

As brotações retiradas de árvores na fase adulta têm relativamente pouca capacidade para micropropagação, e para superar esse obstáculo há necessidade de tratamentos de rejuvenescimento (Bonga, 1987). O rejuvenescimento de árvores adultas torna-se importante pelo fato de o processo de maturação ser um fenômeno que geralmente afeta espécies lenhosas, de acordo com o desenvolvimento ontogenético (Higashi *et al.*, 2000), ocorrendo a redução ou até mesmo a perda da capacidade de enraizamento. O rejuvenescimento mediante enxertia de ramos adultos, realizado em sucessivas vezes, tem sido exitoso, porém apresenta problemas de incompatibilidade com os porta-enxerto (Grattapaglia & Machado, 1998). Outras técnicas como poda ou abate de árvores, pulverização das plantas com citocininas e subcultivos sucessivos dos explantes *in vitro* também têm sido utilizadas para esse processo.

O tipo de explante utilizado no sistema de micropropagação é importante, pois determina a rapidez e eficiência do processo. Os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro* são ápices caulinares, gemas axilares e meristemas, pois possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas inteiras (Grattapaglia & Machado, 1998).

A cultura de segmentos nodais é a técnica mais utilizada de multiplicação e baseia-se na capacidade que possuem os meristemas axilares de funcionarem como broto principal na ausência da gema apical (Murashige, 1974; Hu & Wang, 1983).

Para a iniciação e estabelecimento das culturas, a seleção dos explantes consiste na primeira etapa do processo, no qual se devem obter materiais em estado fisiológico estável, para uma obtenção de cultura livre de contaminantes (Grattapaglia, 1998). A dificuldade maior nesta etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado.

As condições gerais da planta doadora de explantes é fator fundamental pra o estabelecimento da cultura *in vitro*, uma vez que a contaminação por microorganismos muitas vezes impossibilita o desenvolvimento do explante (Pierik, 1987). Essas condições estão relacionadas ao estado nutricional e fitossanitário, em que plantas, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica fornecem explantes que respondem melhor aos fatores de crescimento, como o meio nutritivo e reguladores de crescimento (Murashige, 1974). Os microorganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos, pela colonização dos tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (Montarroyos, 2000).

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e o de cálcio, cujas concentrações variam entre 0,25% a 2% v/v, dependendo do material e do período pelo qual o tecido é exposto (Grattapaglia & Machado, 1998; George, 1993). O tempo de exposição dos explantes aos germicidas varia conforme a consistência dos tecidos. Em geral é de dezenas de segundos, mas pode chegar até alguns minutos. Mantovani, (2001) obteve propágulos de *Cordia trichotoma* livres de contaminação submetendo-os à água corrente por 30 minutos, sendo posteriormente imersos em solução de álcool 70% por 30 segundos e NaOCl a 10%, pH 6,5 durante 5 min. Kryvenki & Angel (1995) obteve desinfestação de segmentos nodais de erva-mate submetendo-os à solução de álcool 70% durante 2 min, em seguida, solução de NaOCl a 1,5% durante 30 minutos e, finalmente, foram lavados várias vezes com água esterilizada.

O bicloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) tem se mostrado eficiente para muitas espécies. Porém, por apresentar alta toxicidade esse produto deve ser utilizado com cuidado (George, 1993). As combinações dos princípios ativos desinfestantes

podem variar muito (Montarroyos, 2000), sendo necessária à adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado. A desinfestação de segmentos nodais de *Hemidesmus indius* ocorreu quando estes foram imersos em solução de  $\text{HgCl}_2$  por 5 min (Patnaik & Debata, 1996). Após realizar desinfestação com o álcool 70% e fungicida sistêmico benlate, segmentos nodais de *Acácia mearnsii* foram imersos em solução com  $\text{HgCl}_2$  em concentração de 0,2% durante 15 min (Beck *et al.*, 1998).

Normalmente, adiciona-se algum tensoativo nas soluções à base de cloro, para melhorar o contato destas com a superfície dos tecidos. O tween-20 é o produto mais utilizado, nas concentrações de 0,01 a 0,1%, podendo ser substituído por detergentes neutros (Mroginski & Roca, 1991).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), podem ser utilizados fungicidas e antibióticos durante a desinfestação ou incorporá-los ao meio nutritivo. O Benomyl (fungicida sistêmico) tem sido utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas do meio e do material vegetal. Ele apresenta baixa toxicidade, de modo que não provoca fitotoxicidade ao tecido vegetal. No Brasil, existem duas marcas comerciais (Benlate 500 e Benomil Nortox), ambas contendo  $500 \text{ g.kg}^{-1}$  (Picinini, 1994).

Explantos de *Celtis* sp foram mantidos em meio de cultura contendo  $200 \text{ mg.l}^{-1}$  de fungicida Benlate por cinco dias, sendo transferidos, após, para meios sem fungicida, apenas com sais do meio MS. Esse método se mostrou eficiente no controle de fungos, inibindo seu crescimento sem causar fitotoxicidade aos explantes (Sato *et al.*, 2001). Caldas & Taketomi (1993) utilizaram concentrações que variaram de 10 a  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  de Benlate na desinfestação de explantes lenhosos de jabuticabeira, demonstrando que todas as concentrações foram eficazes na redução da contaminação.

A utilização de antibióticos, para o controle de contaminações bacterianas endógenas, possuem função bacteriostática e não-bactericida. O objetivo de sua utilização, nesse caso, seria o de manter o desenvolvimento do explante, reduzindo a multiplicação das bactérias dentro do tecido, de maneira que seja possível isolar explantes livres de contaminação. Como opção, pode-se utilizar material juvenil oriundo de sementes germinadas *in vitro*, em virtude da facilidade de assepsia e rápida resposta das brotações a essas condições. Os resultados de experimentação podem servir de base para o conhecimento da necessidade da espécie quanto às

condições ótimas de cultivo nas diferentes etapas e, a partir daí, podem ser extrapoladas para materiais oriundos de plantas adultas (De Fossard, 1974).

Quando sementes são utilizadas como explantes, estas devem ser desinfestadas antes da remoção dos embriões quando necessário, para a germinação asséptica, geralmente, utiliza-se uma combinação de HgCl<sub>2</sub>, NaOCl e etanol. Os procedimentos de desinfestação são modificados de acordo com o tamanho das sementes, a presença ou ausência de apêndices nos tegumentos e a região geográfica de origem das sementes (George, 1993). obtiveram 100% de contaminação por fungos em sementes de *Zeihera Montana*, utilizando NaOCl 0,5% durante 5 minutos no meio MS (Murashige & Skoog, 1962) enquanto que a taxa de contaminação foi de apenas 15% quando utilizaram 1% de NaOCl durante o mesmo tempo (Souza *et al.*, 1999).

## 2.6 Meio de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controla, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas, que funcionam nas plantas, são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (Caldas *et al.*, 1998). Uma grande variedade de meios de cultura vem sendo utilizada para diferentes espécies.

Geralmente, os meios consistem em uma mistura balanceada de macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento (Gamborg & Shyluk, 1981).

A formulação salina do meio MS é a mais utilizada para a cultura de Angiospermae e possui concentrações relativamente altas de macronutrientes e micronutrientes quando comparada a outras formulações salinas (George, 1993). Entretanto, com espécies lenhosas, o meio MS não se mostrou satisfatório, como por exemplo, em plantas de erva-mate, propagadas mediante o cultivo de segmentos nodais em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com a concentração original de sais reduzida a ¼, (Sansberro *et al.*, 1995).

Formulações especialmente desenvolvidas para essas espécies como, por exemplo, o meio WPM (Wood Plant Medium) tem sido utilizado como opção ao meio MS. Melo *et al.*, (1999), ao utilizar o meio WPM em explantes de *Malpighia emarginata*, obteve 2,3 brotações por explante enquanto que com o meio MS, essa média alcançou apenas 1,61 brotações por explantes. Mantovani *et al.* (2001) apresentaram, como melhores resultados para a multiplicação de brotações de louro-pardo, o meio WPM suplementado com BAP e GA<sub>3</sub>. O meio de cultura LPm (Von Arnold & Erikson, 1981), muito utilizado em processos de indução de embriogênese somática possui concentrações de macronutrientes intermediárias com relação ao MS e WPM, podendo ser estudado quanto à adaptação do cultivo de espécies nesse meio de cultura (Dal Vesco, 1998).

Os meios nutritivos podem ser utilizados nas formas semi-sólida ou líquida. Nos meios semi-sólidos, a substância utilizada na micropropagação é o agar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas que dá consistência ao meio servindo de suporte às culturas. O pH do meio induz mudanças na permeabilidade das membranas o que influencia a absorção de certos compostos. Valores de pH mais baixos dificultam a utilização do amônio, enquanto que valores mais altos diminuem a utilização do nitrato. Influencia também na solidificação do agar no meio (Martin & Rose, 1976).

## 2.7 Reguladores de Crescimento

O objetivo principal dos reguladores de crescimento é o de suprir possíveis deficiências nos teores endógenos de hormônio nos explantes isolados, além disso, visa a estimular certas respostas como a multiplicação da parte aérea ou a formação de raízes adventícias Grattapaglia e Machado (1998).

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos e que desempenham importante papel na regeneração de plantas em várias espécies vegetais estão as citocininas e as auxinas. A disponibilidade e a interação desses dois fitorreguladores podem modular a formação de raiz e parte aérea (Skoog & Miller, 1957). Em explantes de algumas espécies lenhosas, que apresentam um crescimento monopoidal natural e, muitas vezes, não ramificam suficientemente *in vitro*, a utilização de citocinina torna-se um fator determinante na indução de

brotações. Na multiplicação de espécies lenhosas, a maior parte dos trabalhos desenvolvidos inclui a adição de fitorreguladores.

Para algumas espécies, o meio de cultura pode ser suplementado com uma baixa concentração de auxina, além das citocininas, em trabalho realizado com *Cedrela fissilis*, foi observado que os reguladores BAP e ANA associados em concentrações de  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  respectivamente foram suficientes para o desenvolvimento de brotações *in vitro* (Kirst & Sepel, 1996).

Além das auxinas e citocininas, também as giberilinas são utilizadas na cultura de tecidos de plantas. Dentre as diversas giberilinas, o  $\text{GA}_3$  é o que tem sido utilizado com maior frequência. O mais conhecido efeito desse hormônio, o alongamento de partes aéreas, pode ser explorado *in vitro*, quando as partes aéreas produzidas não estão em condições de ser individualizadas para o enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998). A adição de  $\text{GA}_3$  também reverte parcialmente o efeito depressivo das citocininas sobre a proliferação de raízes (Hu & Wang, 1983).

### 2.7.1. Citocininas

As citocininas são substâncias derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas. Induzem, segundo Smith (1992), a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. Constituem o grupo de compostos indispensáveis para a quebra de dominância apical e proliferação de gemas axilares. O tipo e concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

As citocininas mais utilizadas em cultura de tecidos são cinetina (KIN), benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZEA), BA (Benziladenina), isopenteniladenina (2-ip) e thidiazuron (TDZ). A benzilaminopurina (BAP) tem grande influência no início da formação de brotos e na alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação, enquanto que o KIN e o 2-ip (2-isopenteniladenina) provocam o crescimento considerado normal (Hu & Wang, 1983). O Tidiazuron é um composto do grupo das feniluréias e tem propiciado o estímulo de meristemas e brotos em espécies lenhosas, porém deve ser utilizado em concentrações bem reduzidas em relação ao BAP (Hu & Wang, 1983). Já o BAP é uma das citocininas de menor custo e tem sido muito eficaz na multiplicação de diversas espécies.

Para Maruyama *et al.*(1989) a micropropagação de *Cedrela odorata* foi possível em razão do cultivo de gemas apicais em meio WPM suplementado com BA a  $1,25\mu\text{M.l}^{-1}$  enquanto que Nunes *et al.* (2002) obtiveram uma média de 2,5 brotações por explante em *Cedrela fissilis* quando adicionado ao meio de cultura MS 1,25 ou  $2,5\mu\text{M}$  da mesma citocinina . Taxas médias muito baixas de regeneração de brotações de *Eucalyptus globulus* foram obtidas, quando cultivadas em meio de cultura com KIN, no entanto, eram mais longas e com folhas mais verdes Bennett *et al.* (1994). Ribas *et al.* (2005) utilizaram com sucesso a citocinina ZEA (Zeatina) no desenvolvimento de brotações axilares de *Aspidosperma polyneuron*.

De acordo com Lo *et al* (1980), concentrações altas de citocinina têm prejudicado a iniciação do alongamento radicular. Quantidades excessivas de citocininas também estimulam a produção de calo, o que não é objetivo na fase de multiplicação. A formação de calos na base do segmento nodal pode comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1998). Borges Júnior *et al.* (2004) encontraram a melhor dosagem para multiplicação de brotações de *Acácia mearnsii* de  $2,0\text{ mg.l}^{-1}$  de BAP em meio B5, porém, nesse meio ocorreu a formação de calos na base dos explantes à medida que a taxa de concentração foi aumentada.

### 2.7.2. Auxinas

Os hormônios desse grupo estão envolvidos com o alongamento de ramos e internós, tropismo, dominância apical, abscisão e enraizamento (Bhojwani & Razdan, 1996). Em cultura de tecidos, as auxinas têm sido utilizadas para divisão celular e diferenciação radicular.

O uso de auxinas sozinhas ou em combinação com baixos níveis de citocinina é considerado essencial para a indução dos primórdios radiculares (Skoog & Miller,1957). Combinações de auxinas e citocininas são empregadas com o intuito de estimular o crescimento de partes aéreas de plantas regeneradas *in vitro*, embora nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicação. Segundo Skoog & Miller (1957), a indução e crescimento de órgãos são regulados pela interação entre essas substâncias, em que a auxina, na multiplicação, anula o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das brotações produzidas.

As auxinas mais utilizadas são AIA (ácido indol acético), AIB (ácido indol butírico), ANA (ácido 1-naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoacético) e Picloram. O ANA é a auxina mais utilizada em meio de multiplicação, seguido do AIB e AIA (Hu & Wang 1983), onde são largamente utilizados no enraizamento e, em interação com citocininas, para a proliferação de gemas. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o ANA e o AIB são normalmente adicionados em concentrações abaixo de  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Rajasekaran (1994), em segmentos nodais de *Grevillea robusta*, obteve uma taxa média de 6,1 brotações por explante, quando foram cultivados em meio WPM adicionado de  $1,44 \mu\text{M.l}^{-1}$  de BAP combinado de  $0,25 \mu\text{M.l}^{-1}$  de ANA.

O ácido naftalenoacético (ANA) é bastante utilizado em meios de isolamento, porém, se adicionado em concentrações acima de alguns décimos de miligramas, tende a estimular a formação de calos, enquanto que o ácido indol-butírico é uma auxina muito eficaz para o enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998).

A formação de calos na base de explantes durante a micropropagação, pode limitar movimentos eficientes de água e nutrientes nas plântulas micropropagadas (Martin, 1985).

### 2.7.3. Giberelinas

Além das auxinas e citocininas, também as giberelinas são utilizadas na cultura de tecidos de plantas. Formam um grupo com mais de 125 representantes, onde há mais de 20 giberelinas conhecidas, sendo que o  $\text{GA}_3$  é o mais utilizado (Bhojwani & Razdan, 1996).

As giberelinas são fitohormônios que produzem o alongamento celular em células jovens (Taiz & Zieger, 2004). Seu efeito está relacionado à estimulação do crescimento de órgãos, como alongamento de eixos caulinares e no desenvolvimento de embriões somáticos (Ammirato, 1983). O efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* é no alongamento das partes aéreas quando essas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998). Desempenham também funções relacionadas a fenômenos fisiológicos, como a regulação da germinação de sementes, mobilização de reservas do endosperma, crescimento da parte aérea e florescimento. É também relato o

efeito sinérgico das auxinas como as giberelinas (Guerra, 2004). Na propagação de amoreira preta, a adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura contendo BAP e ANA, proporcionou um aumento significativo no número de brotos por gema (Pasqual *et al.*, 1991).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia, pertencente ao Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 3.1 Cultivo de plantas fornecedoras de explantes *ex vitro*

Utilizou-se como fonte de explantes, para testes de desinfestação, plantas de três anos de idade fornecidas pela Estação Experimental de Silvicultura do município de Boca do Monte, RS e sementes fornecidas pela Bolsa de sementes AFUBRA. As plantas foram mantidas em sala de crescimento, sob iluminação natural, complementada por lâmpadas fluorescentes branca-frias com intensidade luminosa de aproximadamente 500 lux por 8 horas diárias, em temperatura ambiente.

Após um período de adaptação de aproximadamente 10 dias, as mudas foram podadas para estimular a formação de brotações novas. O controle fitossanitário e nutricional dessas plantas foi realizado por meio de pulverizações semanais intercaladas de fungicida sistêmico (Benomyl) e de contato (Oxicloreto de Cobre) na concentração de 2,0 g.l<sup>-1</sup>. As regas foram feitas sempre que necessário diretamente no substrato com água destilada e autoclavada, e quinzenalmente adicionou-se solução nutritiva completa de sais que compõem o meio WPM.

Das plantas matrizes cultivadas, formaram-se novas brotações das quais foram retirados segmentos nodais que serviram como fonte de explante para o estudo (Figura 1).



FIGURA 1 – Planta de *Cedrela fissilis* com três anos de idade, cultivada em sala de crescimento, podada a 10 cm da base, para emissão de novas brotações.

### 3.2 Condições de cultivo

Os meios de cultura utilizados foram o MS, WPM e LPm de acordo com o teste realizado (Tabela 1), aos quais foram adicionados agente solidificante agar (MERCK) na concentração de 6 g.l<sup>-1</sup> e sacarose nas concentrações de 15; 20 ou 30 g.l<sup>-1</sup>. O pH dos meios foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

No teste de estabelecimento de culturas assépticas, as brotações originadas de plantas de 3 anos de idade foram colocadas em frascos (30 x 70 mm) contendo 5 ml de meio de cultura . As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (20,5 x 150 mm) com 10 ml de meio de cultura. Nas etapas de obtenção de brotações múltiplas, foram utilizados frascos 50 x 80 mm contendo 15 ml de meio de cultura.

TABELA 1 - Composição dos meios MS (Murashige e Skoog,1962), WPM (Lloy e McCown, 1980) e LPm (Von Arnold & Eriksson, 1981) testados para a cultura *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.

Composição	MS (mg/l)	WPM (mg/l)	LPm mg/L
Macronutrientes			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650	400	1.200
KNO <sub>3</sub>	1.900		1.900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	96	180
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		556	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	340
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		990	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	370
Micronutrientes			
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	19,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	14,0
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	1,69
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	2,88
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	0,63
KI	0,83		0,75
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025		0,0025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025		0,0025
Tiamina-HCl	0,1	1,0	5,0
Piridoxina-HCl	0,5	0,5	0,5
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5
Glicina	2	2	2,0
Caseína hidrolisada			500
Glutamina			0,4
Ácido Fólico			0,5
Mio-inositol	100	100	0,1

Os cultivos e subcultivos foram mantidos em sala de crescimento, sob temperatura controlada (25 °C ±2 °C), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

### 3.3 Experimento 1 – Estabelecimento de culturas assépticas.

Para o estabelecimento *in vitro* da cultura, segmentos nodais de brotações obtidas pela poda de plantas de 3 anos de idade foram submetidos a testes de desinfestação utilizando como agentes desinfestantes hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio. O tempo de exposição em solução desinfestante variou desde zero até 20 minutos enquanto a concentração dos produtos utilizados para desinfestação

variou desde zero até 8% para hipoclorito de sódio e até 2% de bicloreto de mercúrio (Figura 2).

As sementes de cedro foram submetidas a vários testes de desinfestação, onde várias concentrações e tempos de exposições em solução desinfestante de hipoclorito de sódio foram testados. As concentrações variaram desde 0% até 8% de hipoclorito de sódio, enquanto os tempos de exposição à solução desinfestante foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos (Figura 2).

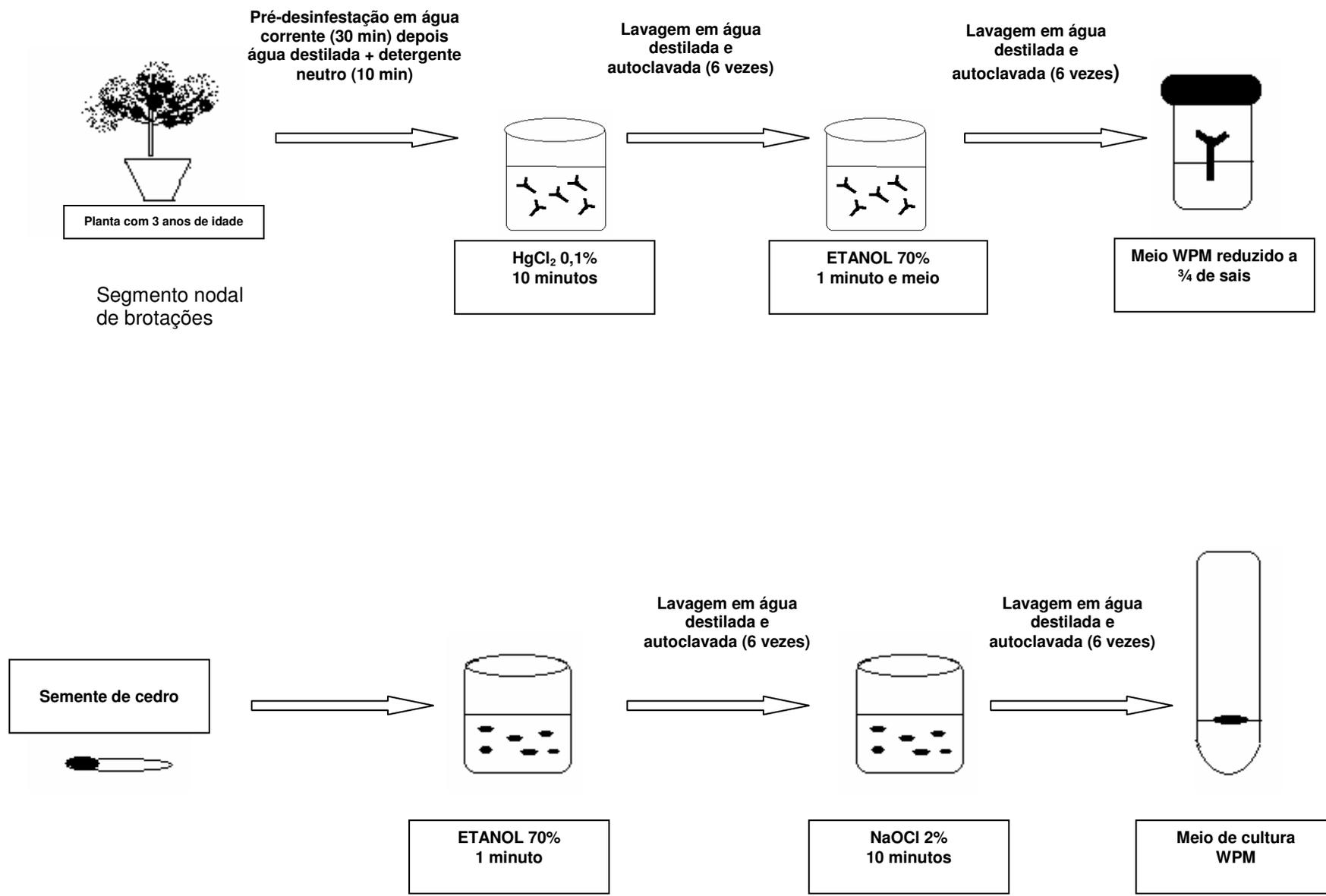


Figura 2 – Etapas realizadas no processo de desinfestação de segmentos nodais e sementes de *Cedrela fissilis* (Vell.).

### 3.3.1 Teste 1 – Desinfestação e germinação de sementes

Sementes fornecidas pela Bolsa de Sementes da AFUBRA (Associação dos fumicultores do Brasil) do Rio Grande do Sul foram utilizadas como fontes de explante.

Os meios de cultura MS, WPM, LPm e Testemunha (água + sacarose) foram testados em suas concentrações originais de sais e vitaminas suplementados com sacarose a  $20 \text{ g.l}^{-1}$  e solidificados com agar a  $6 \text{ g.l}^{-1}$ . Os tratamentos de desinfestação das sementes consistiram de imersão em álcool 70% por um minuto e enxágüe em água destilada e autoclavada por seis vezes, após, imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), variando as concentrações de 1% ou 2% de cloro ativo e tempo de imersão de 5 ou 10 minutos e, finalmente seis enxágües com água destilada e autoclavada.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x4 e quatro repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi composta de dez plantas por parcela.

Foram avaliados a porcentagem de contaminação e o número de sementes germinadas aos 15 e 30 dias de cultivo

### 3.3.2 Teste 2 – Controle da contaminação e oxidação de segmentos nodais de cedro desinfestados com $\text{HgCl}_2$

Segmentos nodais de 1,5 cm de comprimento, coletados de plantas de cedro (com 3 anos de idade, mantidas em sala de crescimento), foram colocados em recipientes com água corrente por 30 minutos (pré-desinfestação e controle da oxidação).

Após serem submetidos à água corrente, os segmentos foram imersos em água destilada adicionada de 4-5 gotas de detergente neutro, permanecendo sob agitação durante 10 minutos. Posteriormente foram enxaguados por seis vezes em água destilada e autoclavada.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram submetidos a tratamento asséptico de imersão em soluções de  $\text{HgCl}_2$  a 0,1% durante 10 min e álcool a 70% durante um minuto e meio, após foram enxaguados 6 vezes em água destilada e autoclavada.

Os segmentos nodais foram cortados na extremidade basal e inoculados em frascos de cultura contendo meio WPM reduzido a três quartos de sua concentração original, adicionado de sacarose em concentração de 15 g.l<sup>-1</sup> e ágar 6 g.l<sup>-1</sup>. Ao meio de cultura, foram adicionadas substâncias inibidoras do crescimento de patógenos, diferindo-o em quatro tratamentos: Testemunha (meio de cultura), meio de cultura mais fungicida sistêmico (Benlate na concentração de 300mg.l<sup>-1</sup>), meio de cultura mais bactericida (Sulfato de Estreptomicina na concentração de 10 mg.l<sup>-1</sup>) e meio de cultura mais fungicida sistêmico e bactericida.

As avaliações da percentagem de necrose, de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana e de sobrevivência foram feitas após três semanas de cultivo.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento e dez plantas por parcela.

### **3.4 Experimento 2 – Indução de crescimento e proliferação de gemas axilares**

Foram realizados os testes de multiplicação e de indução de crescimento de gemas axilares por meio de segmentos nodais retirados de plântulas assépticas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro* (Figura 3).

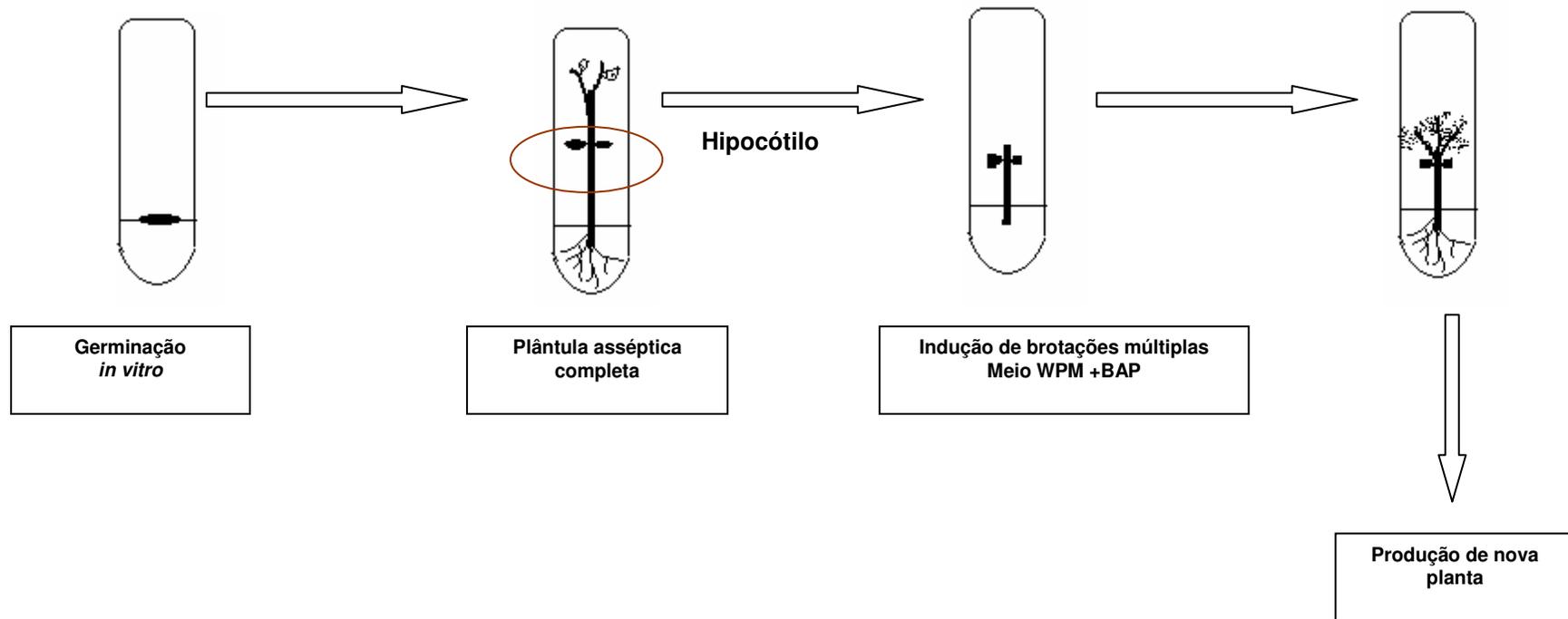


Figura 3 – Fases do processo de cultivo *in vitro* realizados no cedro.

### 3.4.1 Teste 1 - Efeito do meio de cultura, BAP e KIN na indução de brotações múltiplas em nós cotiledonares de cedro

Nós cotiledonares de plântulas germinadas *in vitro* com 30 dias de idade e com comprimento de 1cm foram utilizados como explante.

As formulações salinas MS e WPM combinadas com as citocininas BAP e KIN foram utilizadas na indução de brotações múltiplas de segmentos do nó cotiledonar de cedro. Os meios basais foram utilizados em suas concentrações integrais de sais, enquanto que as citocininas foram adicionadas a  $5 \mu\text{M.l}^{-1}$  conforme a Tabela 2. Os meios de cultivo foram suplementados com sacarose a  $20 \text{g.l}^{-1}$  e ágar  $6 \text{g.l}^{-1}$ .

Tratamentos	Meio de cultura	Citocinina
1	MS	---
2	MS	BAP ( $5.0 \mu\text{M.l}^{-1}$ )
3	MS	KIN ( $5.0 \mu\text{M.l}^{-1}$ )
4	WPM	---
5	WPM	BAP ( $5.0 \mu\text{M.l}^{-1}$ )
6	WPM	KIN ( $5.0 \mu\text{M.l}^{-1}$ )

TABELA 2 – Tratamentos utilizados para indução de brotações múltiplas em explantes de nós cotiledonares de cedro (*Cedrela fissilis* Vell), obtidos de plântulas com 30 dias.

Foram avaliados, aos 30 dias de cultivos, a frequência de explantes que formaram brotações, número médio de brotações por explante e comprimento médio de brotações por explante.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x3 com quatro repetições e dez plantas por unidade experimental.

### 3.4.2 Teste 2 – Indução do crescimento de gemas axilares

Segmentos do nó cotiledonar, de plântulas germinadas *in vitro*, foram coletados e submetidos aos tratamentos de indução de brotações múltiplas. Foram testadas concentrações de BAP (0; 1,25; 2,5 e  $5,0 \mu\text{M.l}^{-1}$ ), combinadas ou não com  $0,5 \mu\text{M.l}^{-1}$  de AIB ou ANA. O meio de cultura utilizado foi o WPM adicionado  $30 \text{g.l}^{-1}$  de sacarose e  $6 \text{g.l}^{-1}$  de ágar.

O número de brotações por explante, número médio de nós por explante, o comprimento médio de brotações e a formação de calo ou raiz na base foram feitas durante o cultivo inicial e nos três subcultivos subseqüentes em intervalos de quatro semanas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x4, com cinco repetições e cinco plantas por unidade experimental. As médias foram comparadas pela pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os efeitos dos níveis de fitorreguladores foram comparados por análise de regressão.

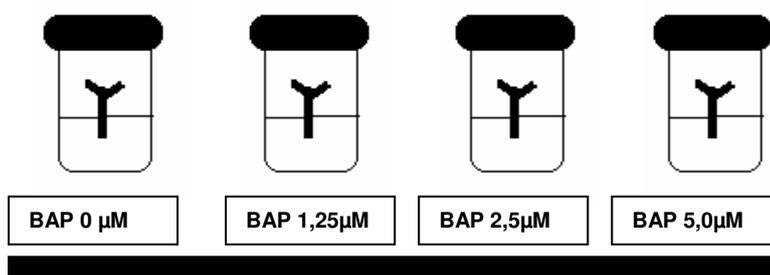
### 3.4.3 Teste 3 – Efeito residual do BAP no alongamento e enraizamento de brotações de cedro

Brotações primeiro sub-cultivo em meio de cultura WPM adicionado de BAP a concentrações de (0; 1,25; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) foram submetidos à adição de  $3\mu\text{M.l}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  (Figura 4).

O meio de cultivo foi suplementado com  $3\text{ g.l}^{-1}$  de sacarose e  $6\text{ g.l}^{-1}$  de agar.

Para realização do teste foi cortado o calo formado na base de cada explante antes da transferência para meio contendo  $\text{GA}_3$ .

A avaliação do número médio de nós por explante, percentagem de crescimento e percentagem de formação de calo ou raiz na base foram feitas após 30 dias de cultivo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições e 8 plantas por unidade experimental. Os efeitos dos níveis de fitorreguladores foram comparados por análise de regressão.



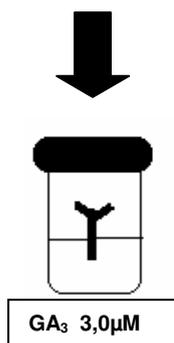


Figura 4 – Procedimento utilizado para testar o efeito residual de BAP no comprimento e enraizamento de explantes de *Cedrela fissilis* Vell.

### 3.3 Análise Estatística

Os resultados obtidos em cada teste foram submetidos ao software SOC/EMBRAPA – Campinas, SP. Fontes de variação qualitativas foram avaliadas pela análise da variância, e quantitativas, pela análise de regressão. A comparação entre as médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabelecimento de culturas assépticas

Soluções de hipoclorito de sódio, durante períodos prolongados, foram testados previamente na imersão de segmentos nodais e não foram utilizados em consequência do aumento da porcentagem de necrose em 75% dos segmentos nodais (dados não apresentados).

O tratamento sem agente desinfestante (testemunha) não foi realizado em segmentos nodais e em sementes, porque testes preliminares apresentaram praticamente 100% de contaminação bacteriana e fúngica, indicando, com isso, a necessidade da desinfestação das fontes de explantes.

#### 4.1.2 Desinfestação e germinação de sementes de *Cedrela fissilis*

O resultado do processo de desinfestação das sementes pode ser observado na Figura 5. A contaminação por fungos, aos 15 dias de cultivo, foi mais freqüente nos meios de cultura MS, WPM e Testemunha. No meio de cultura LPm, a contaminação ocorreu a partir do 15º dia, salvo quando as sementes foram desinfestadas com o tratamento 1 (NaOCl a 1% durante 5 minutos).

Não houve diferença entre os meios de cultura avaliados aos 15 e 30 dias de cultivo, apenas 10% de sementes contaminaram em meio LPm, enquanto que no meio MS, houve 12,5% de contaminação por fungos. Em todos os tratamentos testados, não houve a contaminação por bactérias nas sementes.

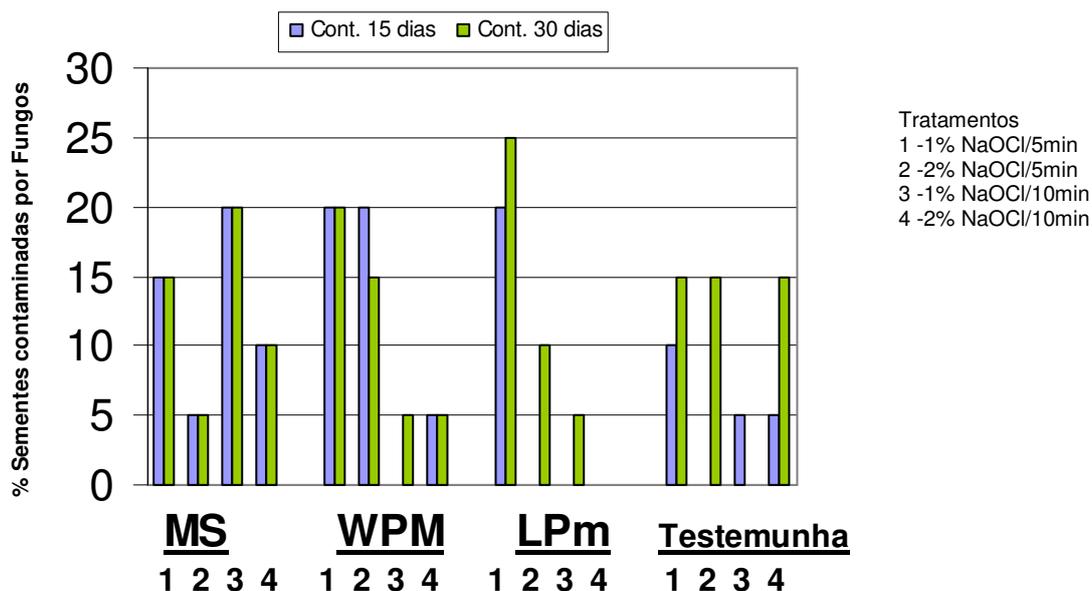


FIGURA 5 – Porcentagem de contaminação de sementes de *Cedrela fissilis* por fungos aos 15 e 30 dias submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação e submetidos a diferentes meios de cultura.

O tratamento de desinfestação de sementes (T4) contendo 2% de concentração de NaOCl durante imersão de 10 minutos foi o que apresentou a menor taxa de contaminação (7%) diferindo estatisticamente a um nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tuckey do tratamento (T1), contendo 1% de NaOCl durante 5 minutos de imersão das sementes (18%)(Tabela 3).

TABELA 3 – Efeito dos diferentes tratamentos de desinfestação na contaminação por fungos em sementes de *Cedrela fissilis* (30dias).

Tratamento	Contaminação (%)	
T1 (NaOCl 1%) 5'	18,8	a
T2(NaOCl 2%) 5'	8,75	ab
T3(NaOCl 1%) 10'	10,0	ab
T4(NaOCl 1%) 10'	7,0	b

Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem significativamente a um nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

A germinação das sementes começou cinco dias após a instalação do teste, caracterizando-se pelo seu intumescimento. Após, houve a protusão da radícula que, com sua elongação, percebeu-se a diferenciação da radícula e do hipocótilo. Com o crescimento, surgiram as raízes secundárias (Figura 6) enquanto que os

cotilédones libertam-se do tegumento e expandiram-se. Aos 30 dias ficou caracterizada a plântula normal originada de germinação epígea.

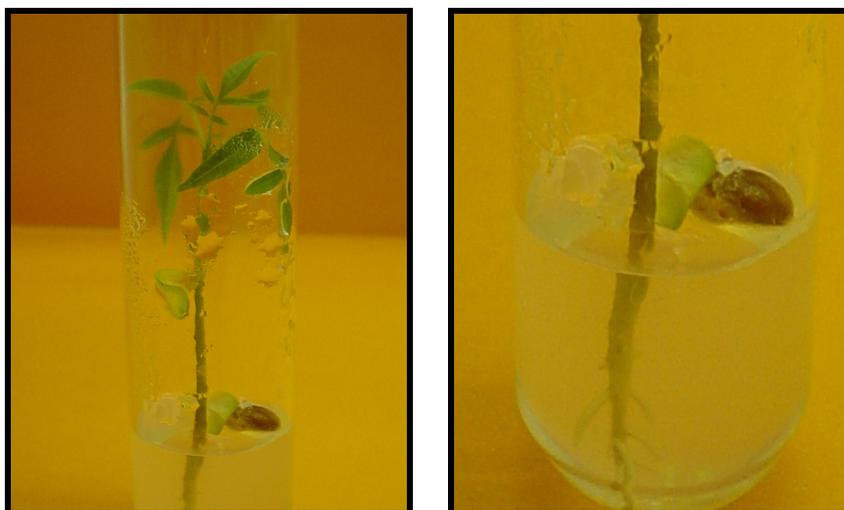


FIGURA 6 – (A) Aspecto das plântulas de *Cedrela fissilis* no estabelecimento de sementes em meio de cultura WPM após 30 dias de inoculação; (B) detalhe da formação da radícula após 30 dias de cultivo.

A porcentagem de germinação das sementes mostrou-se homogênea. Não ocorreu diferença entre os meios de cultura aos 30 dias de cultivo, nos meios MS e WPM a maior porcentagem de sementes germinadas foi de 90%, enquanto que no meio LPm foi apenas 65%.

O tratamento de desinfestação 4 (2% de NaOCl durante 10 minutos) apresentou 80% de sementes germinadas e o tratamento 1 (1% de NaOCl durante 5 minutos) apenas 55%. Os tratamentos de desinfestação, entretanto, não diferiram significativamente entre quando analisada a porcentagem de germinação (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentagem de germinação de sementes de cedro submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação e inoculadas em diferentes meios de cultura após 30 dias de cultivo.

Tratamento de desinfestação	Meio de Cultura			
	MS	WPM	LPm	Testemunha
T1 (NaOCl 1%) 5'	70%	50%	45%	55%
T2(NaOCl 2%) 5'	85%	60%	65%	70%
T3(NaOCl1%) 10'	45%	90%	70%	80%
T4(NaOC 1%) 10'	90%	90%	65%	45%

Não houve interação significativa entre os tratamentos de desinfestação e os meios de cultura utilizados, tanto no estabelecimento das sementes quanto em sua germinação, porém, os resultados mostraram que quando utilizado o tratamento 4 associado aos meios MS e WPM, obteve-se as percentagens mais altas no processo de germinação (Figura 7).

Os resultados aqui obtidos, na maioria dos tratamentos testados, isto é, acima de 60% de sementes germinadas são indicativos da boa qualidade das sementes de cedro usadas neste experimento.

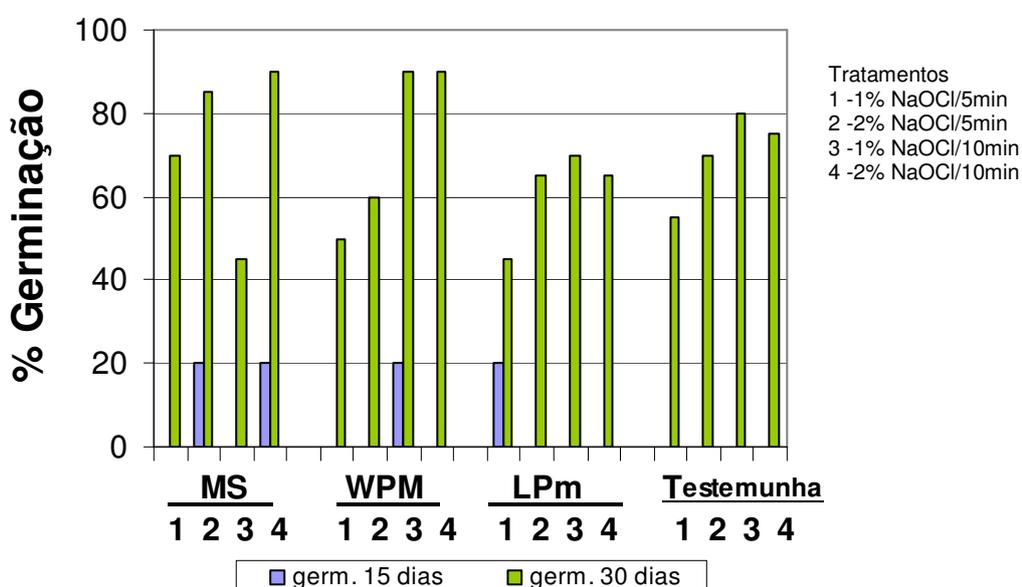


FIGURA 7 – Porcentagem de germinação de sementes de *Cedrela fissilis* submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação e inoculadas em diferentes meios de cultura após 15 e 30 dias de cultivo.

A percentagem de sementes germinadas foi inversamente proporcional ao de contaminação por fungos, levando a concluir que no processo de germinação as plântulas que tentam se estabelecer no meio de cultura, quando não desinfestadas adequadamente, competem juntamente com microorganismos por nutrientes. Porém, a natureza do meio de cultura (concentração e combinação de sais, sacarose e pH) pode facilitar ou não o crescimento desses microorganismos, ao mesmo tempo em que podem ser mais adequados ou não à espécie vegetal inoculada. Algumas sementes contaminadas por fungos foram capazes de germinar, porém seu estado fisiológico não possibilitou desenvolvimento normal das plântulas.

Esses resultados estão de acordo com Ribas (1999) que utilizou semente de *Aspidosperma polyneuron* no meio de cultura WPM para fonte de explantes e Nunes *et al.* (2002) que utilizaram 2,5% de cloro ativo para desinfestação de sementes de *Cedrela fissilis* durante 75 minutos as quais foram inoculadas em meio de cultura MS.

Couto (2004) obteve a menor taxa de contaminação bacteriana em sementes de *Swietenia macrophylla* quando essas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% durante 10 e 30 minutos de embebição e inoculadas em meio de cultura MS. Já Souza *et al.* (1999) avaliaram o efeito de diferentes meios de cultura na desinfestação e germinação *in vitro* de *Zeihera montana* Mart onde obteve apenas 6% contaminação fúngica quando utilizado o meio de cultura Knudson C enquanto que, quando utilizado o meio MS, a porcentagem de contaminação foi 100% .

Sementes de *Dydimopanax morototoni* não germinaram em meio MS, submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação , devido a grande incidência de fungos saprófitos e sua proliferação, apesar da assepsia (Franco *et al.*, 2002).

Kalil Filho *et al.*, (2000) obtiveram 100% de capacidade de germinação em *Swietenia macrophylla*, mesmo quando as sementes apresentavam 11,8% de contaminação por fungos. Sementes de *Acácia mearnsii* quando inoculadas *in vitro*, não germinaram quando estavam presentes fungos e bactérias se desenvolvendo junto às sementes (Corder & Borges, 1999).

#### 4.1.1 Controle da contaminação e oxidação de segmentos nodais de cedro desinfestados com $HgCl_2$

A porcentagem de contaminação fúngica, de necrose e de sobrevivência, não apresentou diferença entre os tratamentos de segmentos nodais (tabela 5).

Não houve contaminação por fungos, o que mostra que o processo de desinfestação utilizando bicloreto de mercúrio foi eficiente no controle desse tipo de patógeno. No entanto, a contaminação bacteriana apresentou-se maior no meio de cultura sem adição de fungicida e bactericida, alcançando uma média de 47% de segmentos nodais ou explantes contaminados.

TABELA 5 – Percentagem de segmentos nodais com contaminação bacteriana em *Cedrela fissilis* nos diferentes tratamentos de assepsia.

Meio de cultura	(%)	
Testemunha	46,67	A
Benomyl	33,3	Ab
Estreptomicina	23,3	Ab
Benomyl + treptomicina	13,3	B

Médias não-seguidas por mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey a um nível de 5% de probabilidade de erro.

O meio de cultura contendo benlate e estreptomicina mostrou ser o mais eficaz no controle de contaminação bacteriana, com apenas 13% dos explantes contaminados, não diferindo estatisticamente de explantes cultivados nos meios de cultura contendo apenas benlate ou estreptomicina ( Figura 8).

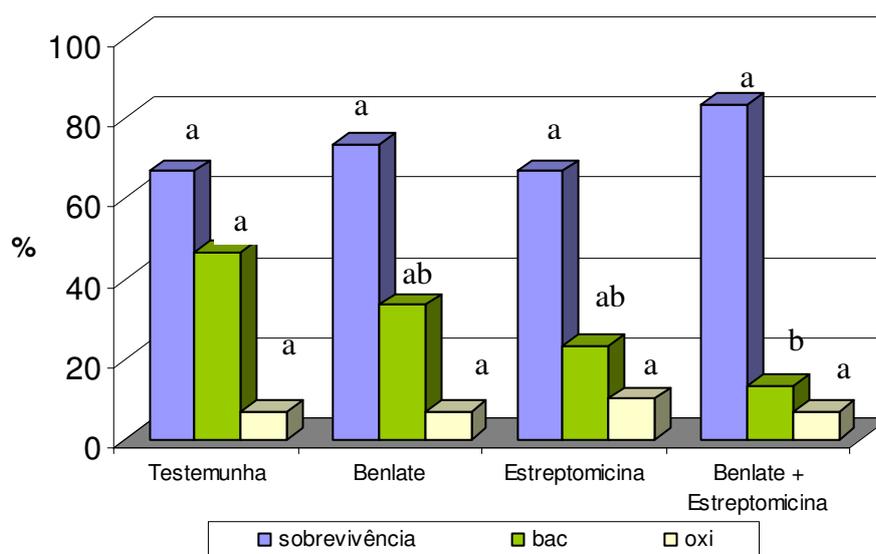


FIGURA 8 – Percentagem de oxidação, contaminação bacteriana e sobrevivência de segmentos nodais de *Cedrela fissilis* Vell. em meio WPM reduzido a  $\frac{3}{4}$  de sua concentração salina.

Estes resultados mostraram que a ocorrência de oxidação dos explantes não foi alta. A maior taxa de oxidação foi observada no meio contendo estreptomicina (10%). Modgil *et al.* (1999) relatam que a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, e de acordo com Grattapaglia & Machado (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina.

O meio contendo Benlate apresentou menor percentual de contaminação por bactérias em relação ao meio testemunha. Isso pode ser explicado pelo fato de o Benlate poder controlar a contaminação de fungos endógenos que, em associação com bactérias, favorecem o aumento da população em ambientes propícios. Esses resultados diferem daqueles encontrados por Sato *et al.* (2001) no controle de contaminação de *Celtis* sp, em que o meio de cultura contendo Benomyl apresentou maior contaminação por bactérias em relação ao meio de cultura testemunha.

Verificou-se ainda, nesta fase de isolamento dos segmentos nodais de cedro, a presença sobretudo de bactérias de natureza endógena provavelmente presentes na seiva dos explantes que, por encontrarem nas condições *in vitro* um ambiente favorável se multiplicaram rapidamente nos primeiros dias de cultivo. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), apesar de se realizar a desinfestação dos explantes,

diversos microorganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados já na planta-matriz.

Os tratamentos fitossanitários aplicados às plantas fornecedoras de explantes, descritos no item anterior, foram favoráveis à redução da contaminação. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a manutenção das plantas matrizes em casa de vegetação, mediante a aplicação de fungicida, bactericida e protegida de intempéries, pode ser uma medida que previne a contaminação dos explantes, sempre tendo o devido cuidado com o estado fisiológico de onde são retirados os explantes, pois também afeta o estabelecimento *in vitro* destes.

A porcentagem de sobrevivência dos explantes não diferiu após três semanas de cultivo e não apresentou diferença para o tipo de tratamento utilizado (figura8). Porém, aquele tratamento que continha os dois agentes controladores de patógenos apresentou mais explantes sobreviventes (83%) e os meios contendo apenas Estreptomicina ou o testemunha apresentaram uma média de 67%. Esse resultado está diretamente relacionado à oxidação e contaminação bacteriana que, de maneira geral, foram maiores nesses meios, conseqüentemente nesses tratamentos, menos explantes sobreviveram (66%).

Estudos similares realizados com outras espécies demonstram o quanto esta fase é importante. Por exemplo, Erig & Schuch (2003) obtiveram explantes de macieira livre de patógenos após 21 dias de cultivo com uma taxa média de 15,5% de sobrevivência. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et al.* (2004) com explantes de mirtilo retirados de plantas matrizes mantidas durante 15 dias no escuro.

Fica claramente demonstrada a eficiência dos tratamentos testados no cedro. Em sua maioria, os explantes contaminados por bactéria, sobreviveram até os vinte e um dias de cultivo, porém já mostravam indícios de tecidos vegetais comprometidos quando em contato com os patógenos. Os microorganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (Montarroyos, 2000).

A Figura 9B mostra o estado dos explantes após 21 dias de cultivo em meio de cultura. A sobrevivência de explantes *in vitro*, principalmente de espécies lenhosas apresenta dois problemas principais, a contaminação e a oxidação e,

segundo Sato *et al.* (2001), esses são problemas que, em espécies nativas, variam em função das suas características.

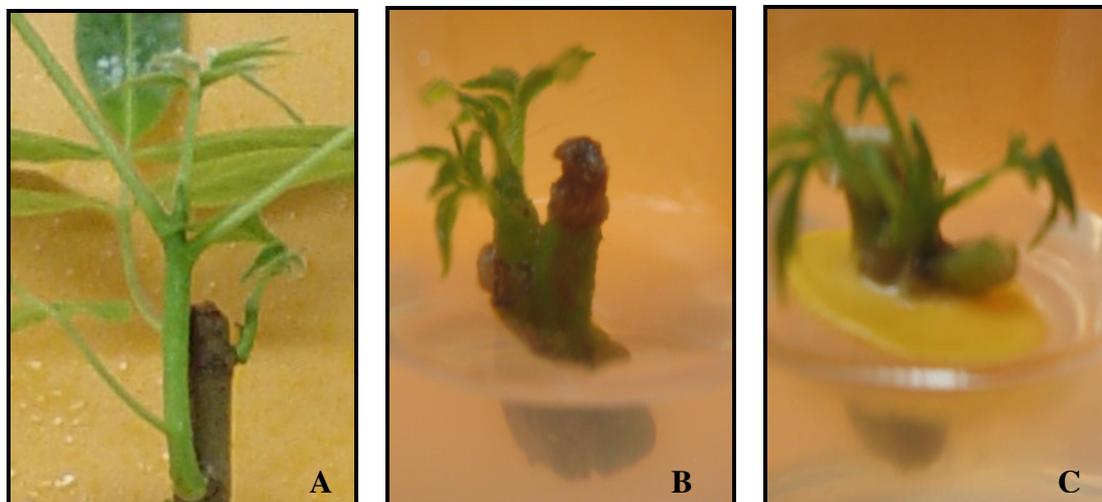


FIGURA 9 – **A**: Brotação emitida, nas plantas doadoras de explante, após poda realizada; **B**: Segmento nodal estabelecido em meio de cultura  $\frac{3}{4}$  dos sais de WPM adicionado de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, Benlate ( $300 \text{ mg.l}^{-1}$ ) e Sulfato de Estreptomicina ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ); **C**: Segmento nodal contaminado com bactéria após 10 dias de cultivo.

#### 4.2 Efeito do meio de cultura, do BAP e KIN na indução de brotações múltiplas em nós cotiledonares de *Cedrela fissilis*.

A análise da variância revelou efeito da citocinina sobre o número de brotações por explante de cedro, em que a citocinina BAP a  $5 \mu\text{M.l}^{-1}$  apresentou maior média em relação a citocinina KIN a  $5 \mu\text{M.l}^{-1}$  e a ausência destas (Tabela 6).

TABELA 6 – Número de brotações de *Cedrela fissilis* formadas por explantes aos 30 dias de cultivo, nos meios de cultura MS e WPM suplementados ou não por BAP ou KIN.

Nível do fator D Citocinina	Número de brotações/explante	
BAP ( $5 \mu\text{M.l}^{-1}$ )	2.7	a
Testemunha (s/ citocinina)	1.8	b
KIN ( $5 \mu\text{M.l}^{-1}$ )	1.7	b

\* Níveis do fator com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Não houve diferença entre meio de cultura sobre o número de brotações formadas por explante e não houve interação entre os fatores meio de cultura e efeito da citocinina. Resultado similar foi encontrado por Melo *et al.*, (1999), no cultivo *in vitro* de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), onde o meio WPM mostrou-se mais eficiente em relação ao MS quando se analisou o número de brotações por explantes. Enquanto que Nunes *et al.* (2001), testaram vários meios de cultura adicionados de BA (Benziladenina) a 2,5  $\mu$ M, encontrando uma taxa de multiplicação de brotações aos 30 dias de idade de 3,2 e 2,6 nos meios MS e WPM respectivamente. Mantovani (1997), comparando os meios de cultura MS e WPM para a espécie *Didymopanax morototoni*, verificou que o meio WPM proporcionou maior porcentagem de explantes com novas brotações (36,7%) em relação ao MS (18,3%). Em cedro Nunes *et al.*,(2002) obteve os melhores resultados das brotações com 1,25-2,5  $\mu$ BA, no qual formou 2,6 e 2,7 brotações por explantes.

Murashige & Skoog (1962) chamam a atenção para a inter-relação entre os sais inorgânicos presentes no meio de cultura e os reguladores de crescimento adicionados a ele que pode, em parte, explicar as diferenças na capacidade de multiplicação de brotações de cedro. Segundo Kirby *et al.* (1994), a maioria dos meios de cultura, incluindo aqueles usados para cultura de células e tecidos de espécies florestais, incorporam ambos sais de nitrato e amônio como fonte de nitrogênio para o crescimento. Para Bojwani & Razdan (1996), o nitrogênio é um dos mais importantes elementos que contribuem para o crescimento de plantas *in vitro* e *in vivo*, sendo que a forma do nitrogênio, como amônia ou nitrato tem uma influência drástica na resposta morfogênica de tecidos vegetais *in vitro*. O meio MS e WPM têm amônio similar, ou seja, doses de nitrato, mas a concentração total no de WPM é 45% da MS. Mercier e Kerbauy (1991), verificaram o efeito da fonte de nitrogênio sobre o desenvolvimento de *Epidendrum fulgens* Brong. onde a forma e a concentração do nitrogênio tiveram uma influência significativa na síntese de citocininas endógenas.

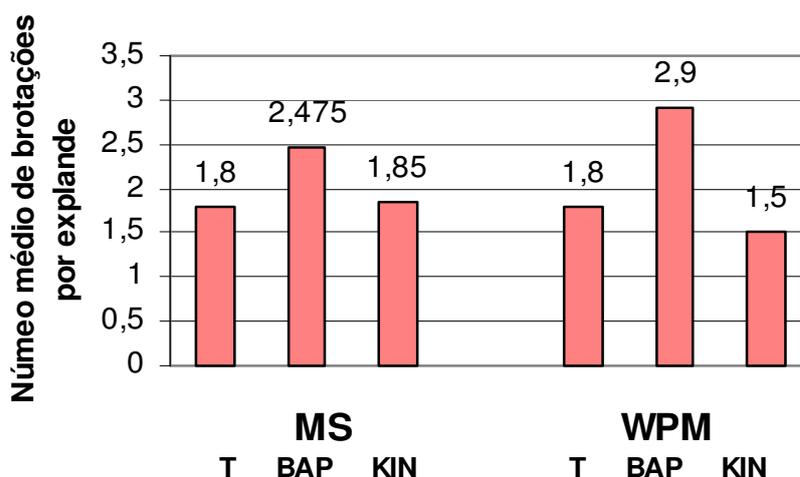


FIGURA 10 – Número médio de brotações de *Cedrela fissilis* formado aos 30 dias em meio de cultivo MS e WPM adicionados ou não de citocininas BAP ou KIN.

A adição de BAP ao meio de cultura, tanto MS como WPM, proporcionou um aumento do número de brotações por explante (Figura 10). Para a espécie *Aspidosperma polyneuron*, Ribas (1999) obteve uma taxa de multiplicação de 2,31 brotações/explante em meio de cultura WPM mais BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e 2,03 brotações/explantes quando adicionado de KIN, aos 30 dias de cultivo. Enquanto Cordeiro, (2004) verificou que, para *Schyzolobium amazonicum*, a concentração de BAP(3mg.l<sup>-1</sup>) proporcionou o maior número de brotos por explante (2,14).

Comparando-se o efeito das citocininas na multiplicação das brotações de cedro, verifica-se que o BAP induziu melhores resultados que o KIN, em que o meio de cultura WPM, quando adicionado dessa citocinina, apresentou média no número de brotações menor que o meio WPM sem a sua adição. Dentre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies lenhosas. Alguns dados sugerem que essa citocinina parece ser, por excelência, a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (Hu & Wang, 1983). Já o efeito da KIN tem sido o de promover taxas médias de regeneração de brotações baixas, ou para algumas espécies, de induzir apenas o alongamento de brotações, sendo menos eficiente que BAP. Tindrade *et al.* (1990) confirmam esses resultados para a espécie

*Eucalyptus globulus*. A superioridade do BAP, em relação às demais citocininas foi verificada por Borges Júnior *et al.* (2004) ao estudarem a multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii*. Testaram-se várias citocininas adicionadas ao meio B5. (Gamborg *et al.*, 1968) e, dentre os reguladores testados, o BAP obteve o maior índice e proliferação de gemas num total de 3,1, enquanto que a KIN apresentou uma média de 2,1 brotações por explante.

Ribas *et. al* (2005) obtiveram as melhores taxas de indução de brotações múltiplas de peroba-rosa com o uso de BAP e ZEA (Zeatina) enquanto que a KIN proporcionou maior alongamento das brotações. De acordo com Preece (1995), as citocininas têm função primordial na divisão celular e podem estar envolvidas na síntese de proteínas, fundamentais ao processo de mitose, e atuam também, na quebra da dominância apical e na indução e crescimento e brotações.

Após 30 dias de cultivo, o desenvolvimento de gemas formando brotações ocorreu em todos os tratamentos, inclusive no meio sem adição de citocinina, a freqüência média de formação de brotações variou entre 90 a 100% (Figura 11).

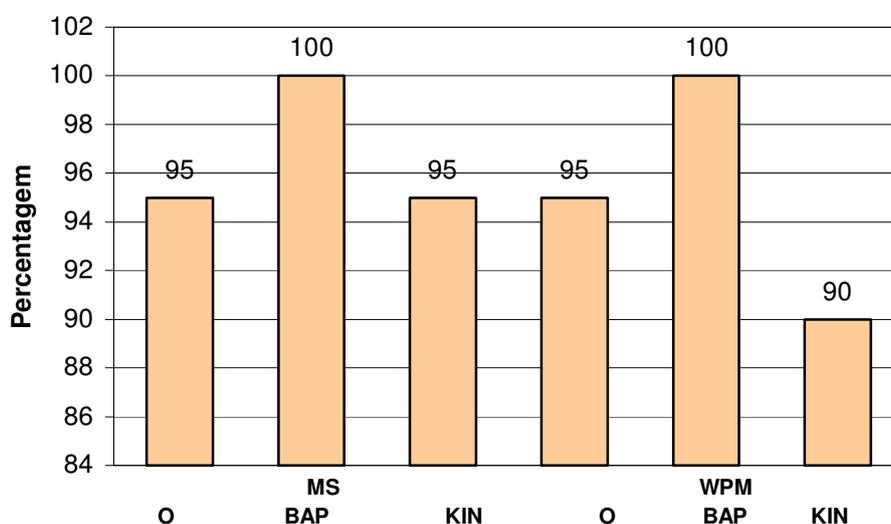


FIGURA 11 – Freqüência de explantes que emitiram brotações aos 30 dias de cultivo de *Cedrela fissilis* em meio de cultivo MS e WPM adicionados ou não de citocininas BAP ou KIN.

Pode-se notar que o meio de cultura WPM suplementado com a citocinina KIN, além de apresentar uma baixa média de brotações por explante, também obteve os menores resultados na frequência média de brotações por explante.

A formação de raízes em 60-65% das brotações ocorreu apenas nos meios de cultura na qual não foram adicionadas as citocininas, enquanto que a formação de calos na base dos explantes ocorreu nos meios adicionados de BAP (100 e 95%) para MS e WPM respectivamente, e quando foi adicionado de KIN, apresentou (50 e 35%) para MS e WPM (Figura 12). Resultados similares foram obtidos por Borges Júnior *et al.* (2004) que verificaram em *Acacia mearnsii* o desenvolvimento de calo na base dos explantes quando ao meio de cultura foram adicionadas as citocininas BAP, BA, KIN e 2iP em diversas concentrações (1, 2 e 3 mg.l<sup>-1</sup>).

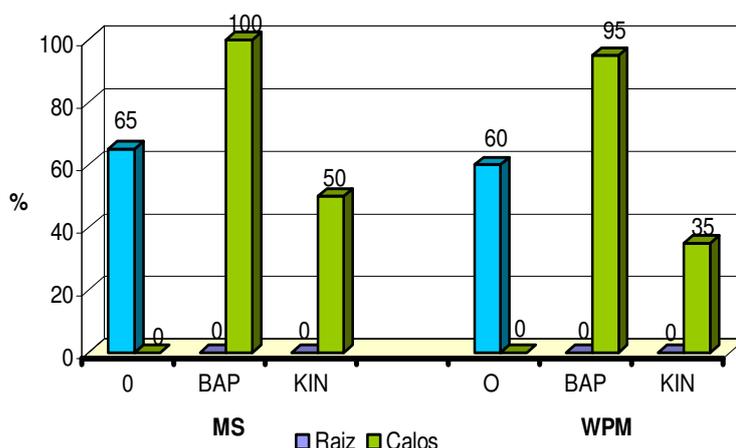


FIGURA 12 – Percentagem de formação de raízes e calos em segmentos nodais de *Cedrela fissilis* em meio de cultivo MS e WPM adicionados ou não de citocininas BAP ou KIN.

De maneira geral, os dois meios de cultura testados foram eficientes para promover a quebra da dominância apical e o desenvolvimento de brotações de cedro, sendo que o meio WPM proporcionou a maior média quando associado com BAP (5µM.l<sup>-1</sup>). A suplementação, com a citocinina, mostrou ser mais eficiente com relação à suplementação com KIN para a multiplicação e diferenciação de gemas.

Esses resultados indicam que, para o enraizamento de cedro, não há necessidade de uma fonte exógena de auxina. A interação do meio de cultura, em

termos de nutriente, concentração iônica, tipo de regulador de crescimento e concentração e estado fisiológico dos explantes, podem explicar os resultados nas diferentes condições de cultura testada. Pois esta ocorreu de forma espontânea nos segmentos nodais cultivados na ausência da citocinina BAP.

#### **4.3 Indução de crescimento de gemas axilares em segmentos do nó cotiledonar**

O número de brotações formadas por segmentos do nó cotiledonar não aumentou com a adição de auxina ao meio de cultura, aos 30 dias de cultivo.

Nos tratamentos sem adição de auxina e nos tratamentos com adição de ANA, o efeito da citocinina BAP foi cúbico, enquanto que nos tratamentos com adição de AIB, o efeito do BAP foi linear. Isso significa que o número de brotações formadas em meios suplementados com AIB, aumentou com o aumento das concentrações de BAP e nos meios de cultura sem adição de auxina ou com adição de ANA, combinados com BAP a  $1,25\mu\text{M.l}^{-1}$  o número de brotações foi menor do que quando não houve adição da citocinina, porém com concentrações maiores do que esse valor, a produção aumentou com o aumento de doses de BAP até  $5\mu\text{M.l}^{-1}$  (figura 13).

Estudos realizados por Nunes *et al.*, (2002), na multiplicação de *Cedrela fissilis*, indicaram que o número médio de brotações por explante foi de 2,5 em meio MS composto de BA a  $2,5\mu\text{M.l}^{-1}$ . Ribas *et al.* (2005), obteve uma média de 2 brotações por segmento nodal de *Aspidosperma polineurum* em meio WPM adicionado de BAP a  $4,4\mu\text{M.l}^{-1}$ , enquanto Moreno (1995) obteve formação de ramos múltiplos de cedro, aos 30 dias de cultivo, com BAP a 0,25 e 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  respectivamente.

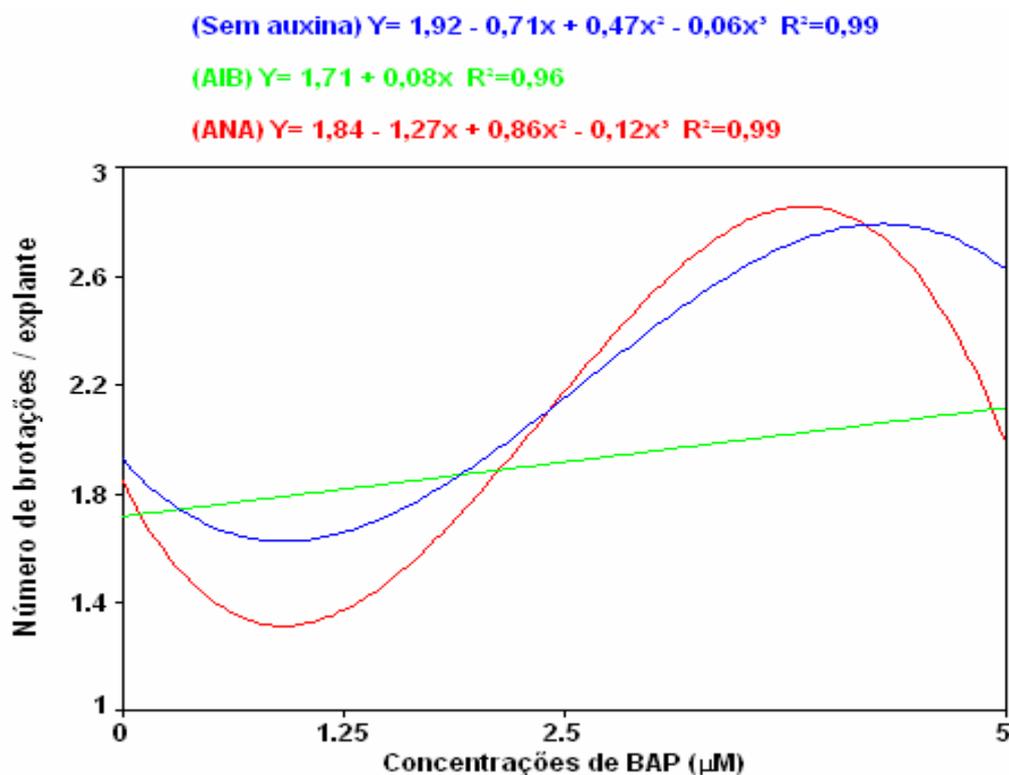


FIGURA 13 – Número de brotações por segmento do nó cotiledonar de *Cedrela fissilis* em meio WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de  $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$  aos 30 dias de cultivo.

O número médio de brotações nos tratamentos com meio de cultura sem auxina foi de 1,96, enquanto que, nos meios contendo AIB e ANA, foi de 1,68 e 1,84 respectivamente (Tabela 7). Esses resultados revelam que, aos 30 dias de cultivo, segmentos do nó cotiledonar com, a presença de auxinas não influenciou na taxa média de brotações formadas nesse explante.

TABELA 7 – Número médio de regeneração de brotações de *Cedrela fissilis*, obtidas no cultivo inicial, no primeiro e segundo subcultivo em meio de cultura WPM, suplementado com BAP, combinado ou não com AIB ou ANA.

BAP( $\mu\text{M}$ )	0			AIB (0,5 $\mu\text{M}$ )			ANA (0,5 $\mu\text{M}$ )		
	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
0	1,96	1,96	1,96	1,68	1,80	1,80	1,84	1,84	1,84
1,25	1,64	1,8	1,92	1,88	1,88	1,88	1,36	1,65	1,91
2,5	2,08	2,28	2,28	1,74	1,86	2,01	2,16	2,16	2,19
5,0	2,16	2,29	2,46	2,00	2,25	2,80	2,00	2,25	2,40

S<sub>0</sub> = cultivo inicial (30dias)    S<sub>1</sub> = primeiro subcultivo (60 dias)    S<sub>2</sub> = segundo subcultivo (90 dias)

No primeiro subcultivo (60 dias), não houve interação entre a utilização de auxinas e as doses de BAP utilizadas. Os meios sem adição de auxina apresentaram o maior número de brotações formadas, não diferindo significativamente do meio com adição de AIB, enquanto que os meios contendo ANA, foram os que apresentaram o menor número de brotações (Tabela 7). A dose de BAP que proporcionou o maior número de brotações aos 60 dias, independente da adição de auxina foi  $5,0 \mu\text{M.l}^{-1}$ , com uma média de 2,29 ; 2,25 e 2,25 brotações por explantes nos meios sem auxina, com AIB e com ANA respectivamente. O efeito da citocinina aos 60 dias foi cúbico (Figura 14). Kirst & Sepel (1996), utilizando segmentos de nó cotiledonar de cedro, obtiveram, aos 60 dias de cultivo, uma média de 2,15 brotações por explante em meio MS contendo BAP ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) mais ANA ( $0,01\text{mg.l}^{-1}$ ).

$$(60 \text{ dias}) Y = 1,71 + 0,11x \quad R^2 = 0,91$$

$$(90 \text{ dias}) Y = 1,70 + 0,17x \quad R^2 = 0,99$$

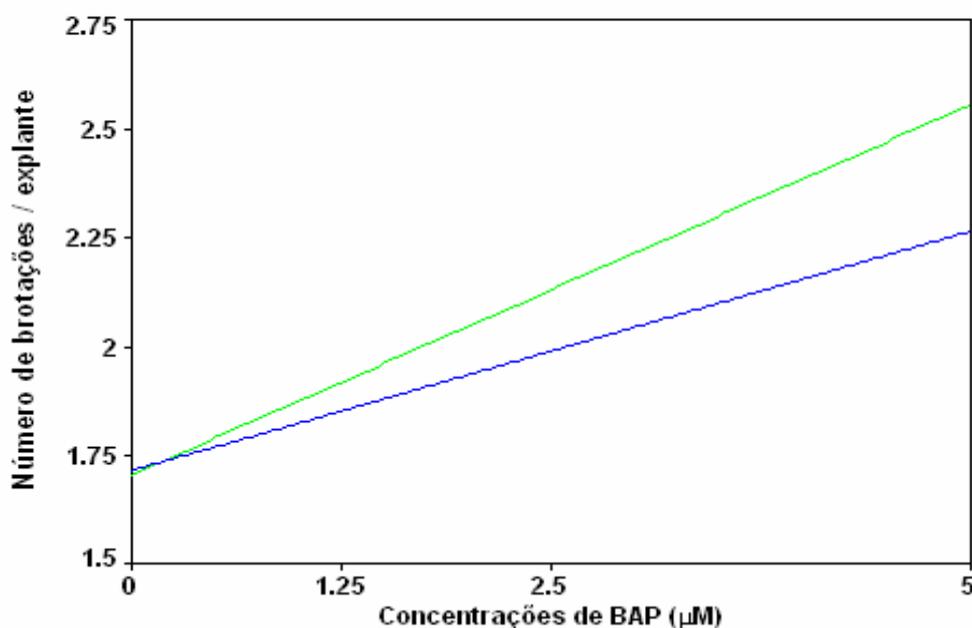


FIGURA 14 – Número de brotações por segmento do nó cotiledonar de *Cedrela fissilis* em meio WPM complementado com BAP a diferentes concentrações, associado ou não com AIB ou ANA na concentração de  $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$ , obtidas aos 60 e 90 dias de cultivo.

Pode-se observar, na Figura 11, que a concentração de BAP continuou a influenciar na formação de brotações de cedro após o cultivo inicial.

Aos 90 dias de cultivo não houve diferença significativa para o efeito da adição de auxina ao meio de cultura. O número de brotações formadas em meio

sem adição desta foi de 2,15, enquanto que nos meios contendo AIB e ANA foi de 2,12 e 2,08 respectivamente (Tabela 8). Na combinação entre o meio contendo AIB a  $0,5 \mu\text{M.l}^{-1}$  mais BAP a  $5,0 \mu\text{M.l}^{-1}$  houve formação de 2,8 brotações por explante.

TABELA 8 – Taxa média de regeneração de brotações de *Cedrela fissilis*, obtidas no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivo em meio de cultura WPM suplementado ou não com auxina.

<b>Presença de auxina</b>	<b>Tempo (dias)</b>		
	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>
Sem Auxina	1,89 a	2,08 a	2,15 a
AIB ( $0,5\mu\text{M}$ )	1,83ab	1,94ab	2,12 a
ANA ( $0,5\mu\text{M}$ )	1,84 b	1,97ab	2,08 a

\* Níveis do fator com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (5%).

A citocinina a uma concentração de  $1,25 \mu\text{M.l}^{-1}$  mostrou menor eficácia na produção de brotações do que quando não-adicionada. Isso indica que a indução de proliferação de gemas de cedro é influenciada pela concentração de BAP partindo de determinadas concentrações, de acordo com o nível endógeno de citocinina presente no tecido. Pode-se notar também que a média de brotações formadas em segmentos do nó cotiledonar de cedro, nos meios contendo auxina, foi menor quando comparado ao meio sem adição desta.

O efeito da citocinina BAP, para número médio de brotações foi linear aos 90 dias, sendo que a concentração a  $5,0\mu\text{M.l}^{-1}$  apresentou as maiores taxas de multiplicação, com 2,46; 2,8 e 2,4 brotações por explantes nos meios sem auxina, com AIB e com ANA respectivamente (Figura 14).

A multiplicação de gemas ocorreu como resultado da liberação de gemas axilares da dominância apical por causa do BAP presente no meio de cultura, pois originalmente havia apenas duas gemas por explante que vieram a se desenvolver (Figura 15).

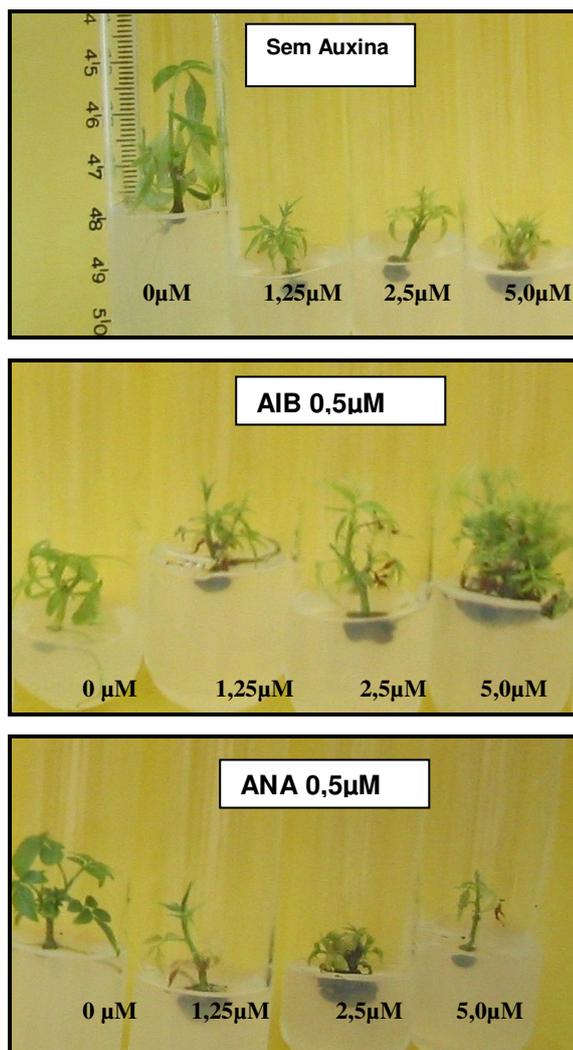


FIGURA 15 – Efeito da citocinina BAP (0; 1,25; 2,5 e  $5\mu\text{M.l}^{-1}$ ) na formação de brotações de cedro em meio de cultura WPM combinada ou não com AIB ou ANA a  $0,5\mu\text{M.l}^{-1}$  aos 60 dias de cultivo.

Para a variável número médio de nós/explante não houve interação entre as doses de BAP e a presença de auxina ao meio de cultura nas três avaliações realizadas (30, 60, 90 dias). Aos 30 dias de cultivo, não houve diferença para o efeito da adição de auxina ao meio de cultura. Aos 60 dias de cultivo, a média dos tratamentos sem adição de auxina foi de 3,6 nós/explante, o que diferiu significativamente dos tratamentos com adição de AIB e ANA, com médias de 3,02 e 2,92 nós/explante respectivamente (Tabela 9). Nunes *et. al.*, (2002) obtiveram, aos 60 dias uma média de 6 nós/ explante e, aos 90 dias uma média de 7 nós/explante em meio MS contendo  $2,5\mu\text{M.l}^{-1}$  de BA.

Aos 90 dias de cultivo não diferença de média dos tratamentos sem auxina com relação aos tratamentos contendo AIB e ANA. Os tratamento sem adição de