

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

***CULTURA DE CALOS E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE
Cedrela fissilis VELLOZO (MELIACEAE)***

WELLINGTON LUIZ DE SOUZA LAUDANO

Florianópolis/2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

***CULTURA DE CALOS E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE
Cedrela fissilis VELLOZO (MELIACEAE)***

WELLINGTON LUIZ DE SOUZA LAUDANO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Viana

Florianópolis / 2005

Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi possível graças à contribuição de muitas pessoas. A elas dedico meu reconhecimento e peço desculpas pelas ausências. Agradeço.

A Deus pela oportunidade de viver e poder realizar mais um sonho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Viana, minha orientadora, pela orientação, compreensão, dedicação e por ter proporcionado os meios para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin por disponibilizar os equipamentos do laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal para que fossem feitas as extrações de óleo.

Ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti pela extração e análises dos compostos voláteis. Sou muito grato por suas orientações.

Ao Prof. Dr. Giorgini Augusto Venturieri pelo empréstimo e orientação de uso do programa estatístico Bio-Estat.

À Professora Maria Risoleta Freire Marques por disponibilizar equipamento para a criopreservação.

À doutoranda Renata Passos e ao mestrando Luciano Campestrini pelo auxílio e orientação nas extrações de óleos essenciais.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que demonstrou competência e profissionalismo; em especial à Prof. Dra. Vetúria Lopes

de Oliveira, à Prof. Dra. Margarida Matos de Mendonça e ao Prof. Dr. Mário Steindel.

À Joice Ferrari da Costa e à Ligia Dione da Costa, secretárias do curso de Biotecnologia, pela presteza e profissionalismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realizar este curso.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia com os quais tive a oportunidade de conviver e de compartilhar esta caminhada.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pelas conversas e discussões sobre os experimentos realizados: Talía, Eliane, Pablo, Jackson e Eunice.

Ao amigo Leandro Rodrigues pela ajuda e orientação na montagem dos experimentos de criopreservação e germinação de sementes.

À mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Eliane Moratelli pelo empréstimo de materiais e auxílio na interpretação dos dados sobre criopreservação.

Aos amigos do PPGECT pela amizade e incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização de mais esta etapa, **OBRIGADO**.

Dedico,

A meu pai Luiz Carlos Laudano (in memoriam), minha mãe Iraci de Souza Laudano e meus irmãos Luiz, Cláudia e Kátia pelo incentivo, amizade e companheirismo que foram fundamentais e me fizeram concluir mais esta etapa.

Obrigado.

Eu,

O verdadeiro sentimento é aquele que mesmo longe está sempre presente em nossa alma, no nosso descanso e no colo de um verdadeiro amor.

Obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 18

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21

2.1. Descrição Botânica.....21

2.2. Ecologia.....23

2.3. Importância Econômica.....24

2.4. Importância Medicinal, Inseticida e Fitoquímica.....25

2.5. Biotecnologia.....30

3 OBJETIVOS 34

3.1. Objetivo geral.....34

3.2. Objetivos específicos.....34

4 MATERIAIS E MÉTODOS 35

4.1. Material Vegetal.....35

4.2. Desinfecção das sementes.....35

4.3. Preparação dos meios de cultura.....35

4.4. Estabelecimento de plântulas e condições de crescimento das culturas.....36

4.5. Efeito de tipos de explantes e de diferentes concentrações de ANA combinadas com 2,5 μ M de BAP sobre o crescimento dos calos.....36

4.6. Efeito de tipos de explantes e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento de calos.....37

4.7. Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com diferentes concentrações de BAP sobre o crescimento de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares.....38

4.8. Efeito de diferentes fontes de carbono e de períodos de cultivo sobre o crescimento dos calos.....	38
4.9. Efeito de diferentes concentrações de glutamina e de sacarose sobre o crescimento de calos.....	39
4.10. Efeito de luz e escuro e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento dos calos.....	39
4.11. Efeito da idade das plântulas sobre o crescimento dos calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares.....	40
4.12. Efeito do período de cultivo sobre o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas com 18-21 semanas de idade.....	40
4.13. Determinação da massa seca e do teor de água de calos.....	41
4.14. Determinação das taxas de variação no crescimento e no teor de água dos calos em diferentes períodos de cultivo.....	41
4.15. Análise de rendimento de óleo essencial produzido por calos cultivados na luz.....	42
4.16. Análise dos constituintes voláteis biossintetizados por calos produzidos na luz e no escuro.....	42
4.17. Conservação <i>ex situ</i> através da conservação <i>in vitro</i> de propágulos vegetativos e criopreservação de sementes zigóticas.....	43
4.17.1. Conservação <i>in vitro</i> de propágulos vegetativo.....	43
4.17.2. Criopreservação de sementes zigóticas.....	43
4.17.2.1. Determinação do teor de água das sementes.....	43
4.17.2.2. Efeito do tipo de descongelamento sobre a germinação.....	44
4.17.2.3. Efeito do tipo de armazenamento após a criopreservação sobre a germinação.....	44
4.17.2.4. Efeito do armazenamento em geladeira e em nitrogênio líquido por longos períodos de tempo sobre a germinação.....	44
4.17.2.5. Condições para a germinação das sementes.....	45
4.18. Análise Estatística.....	45

5 RESULTADOS	46
5.1. Otimização do crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	46
5.1.1. Efeito de tipos de explantes e de diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP 2,5 µM sobre a indução e o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	46
5.1.2. Efeito de diferentes tipos de explantes e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	51
5.1.3. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	54
5.1.4. Efeito de diferentes fontes de carbono e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	57
5.1.5. Efeito de diferentes concentrações de sacarose e glutamina sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	68
5.1.6. Efeito da luz e do escuro e de períodos de cultivo sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	72
5.1.7. Efeito da idade das plântulas de <i>Cedrela fissilis</i> sobre o crescimento e teor de água de calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares.....	77
5.1.8. Efeito de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento e teor de água de calos de <i>Cedrela fissilis</i> iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas com 18-21 semanas de idade.....	79
5.2. Análise preliminar de óleos e essenciais de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	81
5.3. Análise dos constituintes voláteis de calos de <i>Cedrela fissilis</i> produzidos na luz e no escuro.....	82
5.4. Conservação <i>ex situ</i> de <i>Cedrela fissilis</i>	85
5.4.1. Conservação <i>in vitro</i> de segmentos nodais foliares e apicais.....	85
5.4.2. Criopreservação de sementes zigóticas.....	89
5.4.2.1. Determinação do teor de água das sementes no início do experimento.....	89
5.4.2.2. Efeito do descongelamento rápido e descongelamento lento sobre a germinação.....	90

5.4.2.3. Efeito do armazenamento após a criopreservação em temperatura ambiente ou em geladeira sobre a germinação.....	92
5.4.2.4. Efeito de períodos de armazenamento por 7, 11 e 15 meses em nitrogênio líquido sobre a germinação.....	94
6 DISCUSSÃO	95
6.1. Efeito de diferentes tipos de explantes e de diferentes concentrações de ANA e de BAP sobre a indução e o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	95
6.2. Efeito das diferentes fontes de carbono e de diferentes concentrações de sacarose, na presença ou ausência de glutamina sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	103
6.3. Efeito da presença e ausência de luz e da idade dos explantes sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i>	111
6.4. Análise do teor de óleos essenciais e dos constituintes voláteis de calos de <i>Cedrela fissilis</i> produzidos na luz e no escuro.....	116
6.5. Criopreservação de sementes e conservação <i>in vitro</i> de propágulos vegetativos de <i>Cedrela fissilis</i>	117
7 CONCLUSÕES	127
8 PERSPECTIVAS	131
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA:	Ácido indolilacético
ANA:	Ácido α -naftalenoacético
B₅ :	Meio de Gamborg, Miller e Ojima
BAP:	6-Benzilaminopurina
DAP:	Diâmetro à altura do peito
DMRT:	Teste múltiplo da escala de Duncan
HCl:	Ácido clorídico
HP:	Meio de cultura líquido Hyponex-Peptone
HPLC:	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IBA :	Ácido indol-3-butírico
IGR:	Reguladores de crescimento de insetos
JHs:	Hormônios juvenis
MF:	Massa Fresca
MS:	Massa Seca
NaOH:	Hidróxido de sódio
PLBs:	“Protocorm Likes Bodies”
TDZ:	Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-feniluréia)
TLC:	Cromatografia em Camada Fina

RESUMO

Cedrela fissilis Vellozo (Meliaceae) é uma espécie nativa da Floresta Atlântica, que produz madeira de grande valor econômico. Os objetivos deste trabalho foram estudar o crescimento de calos em diferentes condições de cultivo, realizar análises preliminares do teor de óleos essenciais e dos constituintes voláteis produzidos pelos mesmos e desenvolver estudos sobre a criopreservação de sementes e conservação *in vitro* de propágulos vegetativos. Em todos os experimentos foram utilizados segmentos nodais cotiledonares, exceto para testar o efeito de diferentes tipos de explantes, em que segmentos apicais e foliares também foram utilizados. O meio de cultura Murashige & Skoog foi utilizado em todos os experimentos, suplementado com 2,5 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 5 μM de ácido α -naftalenoacético (ANA), 0,2% de Phytigel e com 58,4 mM de sacarose, exceto nos casos em que outras fontes de carbono foram testadas ou em que foram testadas diferentes concentrações de sacarose na ausência ou na presença de glutamina ou em que diferentes concentrações de BAP e ANA foram utilizadas separadamente ou em combinação. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas (exceto as submetidas ao escuro), provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($22.3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e foram avaliadas, após quatro e oito semanas, dependendo do experimento, através da determinação da massa fresca, massa seca e do teor de água. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação de calos crescidos na luz em 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA. A extração dos constituintes voláteis foi realizada pelo método líquido-sólido e análise através de cromatografia gasosa. As sementes criopreservadas foram descongeladas em temperatura ambiente ou a 45°C , em banho-maria, por três minutos. Os segmentos nodais foliares foram armazenados, por seis

semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, com metade da concentração salina, desprovido de sacarose, a 25°C e a 5°C e após o período de armazenamento transferidos para o meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Nenhuma diferença foi detectada entre os valores de massa fresca dos calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares e apicais e os maiores valores foram obtidos com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Não foram detectadas diferenças entre os maiores valores em massa seca de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares e foliares, obtidos com oito semanas de cultivo. Os calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cresceram em todas as combinações de ANA e BAP testadas. Os maiores valores de massa seca foram obtidos em 2,5 µM de ANA com 2,5 µM de BAP, 5 µM de ANA e 2,5 µM ou 5 µM de BAP. A maior massa seca dos calos ocorreu após oito semanas de cultivo em sacarose, sendo os valores observados para glicose e frutose semelhantes. Os maiores valores de massa seca dos calos foram obtidos com 58,4 mM ou 116,8 mM de sacarose e com 87,6 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. Os calos apresentaram maior massa seca na luz, com oito semanas de cultivo e maior teor de água no escuro. Calos produzidos a partir de plântulas de diferentes idades não diferiram em massa seca, apenas no teor de água, que foi maior para os calos obtidos de explantes de plântulas com cinco semanas de idade. O rendimento de óleos essenciais extraídos por hidrodestilação, produzidos pelos calos foi de 1,17 % da massa seca. O linalol foi o composto majoritário produzido por calos crescidos na luz ou no escuro. Sete compostos voláteis foram identificados em calos crescidos no escuro e doze foram identificados em calos crescidos na luz. O germacreno apareceu em maior proporção nos calos crescidos na luz. A massa seca dos calos produzidos a partir de segmentos nodais foliares armazenados por seis semanas a 5°C foi maior do que a massa seca dos calos produzidos pelos segmentos apicais, não

havendo diferença entre as massas secas quando ambos os explantes foram armazenados a 25°C. As sementes toleraram a criopreservação por quinze meses e o descongelamento lento. O estabelecimento de diferentes condições de cultivo de calos, a detecção de compostos de interesse nos mesmos e o estabelecimento de métodos que permitem a criopreservação, por longos períodos de tempo, e a conservação *in vitro*, por curtos períodos de tempo, de propágulos vegetativos indicam o potencial da aplicação de abordagens biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários e conservação de germoplasma desta espécie.

Palavras chave: Calos, crescimento, tipos de explantes, fontes de carbono, glutamine, luz, escuro, constituintes voláteis, semente, criopreservação, conservação *in vitro*.

ABSTRACT

Cedrela fissilis Vellozo (Meliaceae) is a native species of the Atlantic Forest, important for timber production. The aim of this work is to study callus growth in different culture conditions, to carry out preliminary analysis on the content of essential oils and its volatile components and to develop studies on seed cryopreservation and *in vitro* conservation of vegetative propagules. Cotyledonary nodal segments were used in all experiments, except when different type of explants were used. The Murashige & Skoog medium supplemented with 2,5 μM 6-benzilaminopurine (BAP) and 5 μM α -naphthaleneacetic acid (ANA), 0,2% Phytigel and 58,4 mM sucrose was used in all experiments, except when different carbon sources, different sucrose concentration, in the absence or presence of glutamine or different concentration of BAP and ANA, isolated or combined, were tested. The cultures were maintained under $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 hours photoperiod (except those kept in the dark), provided by fluorescent Philips TDL ($22.3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) tubes and were assessed after either four or eight weeks, depending on the experiment, for fresh mass, dry mass and water content. The essential oils were extracted by hydrodistillation from callus grown under light in 2,5 μM BAP and 5 μM ANA. The extraction of volatile components was carried out through the liquid-solid method and the analysis by gas chromatography. Seeds cryopreserved in liquid nitrogen and thawed either at room temperature or at 45°C , in a water bath, for three minutes. Leaf nodal segments and apical shoot segments were stored at either 25°C or 5°C , for six weeks in half strength Murashige & Skoog medium, deprived of sucrose, and transferred, after storage, to the Murashige & Skoog medium supplemented with 2,5 μM BAP and 5 μM ANA. No differences were detected in the fresh mass of calluses initiated either from cotyledonary nodal segments or apical segments and the highest

values were obtained in the culture medium with 2,5 μM BAP and 5 μM ANA. No differences were detected in the highest dry mass values of calluses initiated from either cotyledonary nodal segments or leaf nodal segments, after eight weeks of culture. Growth of calluses initiated from cotyledonary nodal segments was achieved in all combination of ANA and BAP tested. Superior values of dry mass were obtained in 2,5 μM ANA with 2,5 μM BAP, 5 μM ANA and 2,5 μM or 5 μM BAP. The highest callus dry mass occurred after eight weeks of culture in sucrose, and similar values were obtained for glucose and fructose. Superior values of callus dry mass were obtained on either 58,4 mM or 116,8 mM sucrose and on 87,6 mM sucrose and 2,73 mM glutamine. Calluses showed higher dry mass in the light, when cultivated for eight weeks. Calluses produced from seedlings with different age did not differ in dry mass, only the water content was higher in callus obtained from explants of five week-old seedlings. The content of essential oils produced by the callus was 1,17 % of the dry mass. Linalool was the major compound produced by callus grown either under light or in the dark. Seven volatile compounds were identified in callus grown in the dark and twelve were identified in callus grown in the light. Germacrene appeared in higher proportion in the callus grown in the light. The dry mass of calluses produced from leaf nodal segments stored for six weeks at 5°C was higher than the dry mass of calluses produced from the apical segments, and no difference in the dry mass was detected when both explants were stored at 25°C. Seeds tolerated cryopreservation for fifteen months and the slow thawing. The establishment of different callus culture condition, the detection of important compounds produced by the callus and the establishment of methods which allow long term seed cryopreservation, and short term *in vitro* conservation of vegetative propagules indicate the potential of application of biotechnological

approaches for the production of secondary metabolites and germplasm conservation of this species.

Key words: callus, growth, explant type, carbon sources, glutamine, light, dark, volatile constituents, seed, cryopreservation, *in vitro* conservation

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia de espécies florestais, através das técnicas de cultura e conservação *in vitro* e de biologia molecular, permite que novas abordagens sejam utilizadas para o resgate e conservação genética das espécies, além de permitir o desenvolvimento de sistemas de regeneração de plantas a partir de calos, para a transformação genética, clonagem rápida e em massa de genótipos selecionados e a produção de metabólitos secundários a partir de culturas de células e/ou tecidos (Haines, 1994). A produção de metabólitos secundários *in vitro* e o desenvolvimento de sistemas que possibilitem a conservação de recursos genéticos asseguram formas alternativas para a exploração sustentável, principalmente de árvores nativas, presentes em ecossistemas ameaçados.

As técnicas de micropropagação têm sido desenvolvidas para um grande número de espécies arbóreas florestais e o progresso sem precedentes da biotecnologia durante as últimas décadas, associado com o contínuo aumento de demanda por madeira e produtos florestais no mundo, indicam que as árvores produzidas assexuadamente irão compor uma porção significativa das florestas plantadas no futuro (El-Lakanny, 1992; Haines, 1994).

No caso das espécies de árvores nativas brasileiras, o número de artigos publicados em periódicos internacionais sobre a aplicação de abordagens biotecnológicas para a propagação ou conservação é escassa. De acordo com Viana *et al.* (1999), algumas espécies que têm sido estudadas com relação ao potencial de micropropagação são: *Centrolobium tomentosum* (araribá rosa), *Melanoxylon brauna* (braúna preta), *Rapanea ferruginea* (copororoca), *Schizolobium parayba* (guarapuvú), *Zeyhera tuberculosa* (ipê felpudo), *Cariniana legalis* (jequitibá rosa), *Cordia*

trichotoma (louro), *Paratecoma peroba* (peroba amarela), *Plathymenia foliolosa* (vinhático), *Virola gardineri* (virola), *Caryocar brasiliense* (pequi), *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Pterodon pubescens* (sucupira branca), *Dalbergia miscolobium* (jacarandá do cerrado), *Aspidorperma* spp. (peroba) e *Miconia* sp. (jacatirão). De acordo com os autores acima citados, exemplos de espécies tropicais para as quais têm sido desenvolvidas técnicas de conservação *in vitro* são: *Araucaria hunsteinii*, *Theobroma cacao*, *Hevea brasiliensis*, *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis*, *Swietenia macrophylla*, *Trichilia dregeana* e *Jacaranda mimosaeifolia*.

A família Meliaceae destaca-se por seu valor econômico, medicinal, ecológico e de suas potencialidades de exploração biotecnológica. Apresenta gêneros de grande importância econômica e medicinal como *Cedrela* (cedro) e *Swietenia* (mogno), geralmente conhecidos pela excelente qualidade da madeira que produzem (Klein, 1984). Estes gêneros ocorrem predominantemente em Florestas Tropicais, que estão fortemente ameaçadas de extinção, pela excessiva exploração madeireira e destruição de suas áreas naturais de dispersão. Haines (1994) reconhece a importância da família Meliaceae e alerta para a necessidade de estudos que visem a sua conservação, uma vez que muitas espécies estão sofrendo uma forte pressão ambiental com severa erosão genética.

Em função das suas potencialidades, muitos dos representantes da família Meliaceae poderiam ser explorados em programas de reflorestamento. Porém, esforços no sentido de se estabelecer plantações homogêneas, em larga escala, de algumas dessas espécies de extrema importância, como dos gêneros *Khaya* e *Entandrophragma* na África, *Swietenia* e *Cedrela* na América Latina e *Toona* na Ásia e Austrália, invariavelmente resultam em fracasso. Este insucesso se dá em função, principalmente

do ataque da broca perfuradora de brotos, *Hypsipyla grandella* (Lepidóptera: Pyralidae - (Agostinho *et al.*, 1994) e em menor escala, podem ser atacados pelo coleóptero serraserra ou serrador (*Oncideres* sp.), da família Cerambycidae, que corta ramos novos, nas plantas de cedro em crescimento (Reitz *et al.*, 1979).

Com relação ao gênero *Cedrela*, e em especial, sobre a espécie *Cedrela fissilis*, os poucos estudos disponíveis na literatura são sobre a micropropagação, cultura de calos e conservação *in vitro* (Nunes *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2003), mas estudos complementares sobre os sistemas de conservação e sobre o crescimento de calos, de forma a assegurar a produção de biomassa, para os estudos sobre os metabólitos secundários de interesse, necessitam ser conduzidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descrição Botânica

A família Meliaceae pertence à ordem Sapindales, compreendendo cerca de 5 gêneros e 120 espécies, distribuídos por toda a Região Neotropical. Dezesesseis espécies, agrupadas em 4 gêneros, ocorrem como espécies arbóreas e nativas na Região Sul do Brasil (Lorenzi, 1998). O gênero *Cedrela* foi descrito pela primeira vez por Browne em 1756 (Tuesta, 2003 apud Patiño, 1997).

Segundo Carvalho (1994), a espécie *Cedrela fissilis* possui como sinonímia botânica: *Cedrela brasiliensis* Adr. Jussieu; *Cedrela macrocarpa* Ducke e *Cedrela tubiflora* Bertolini, e Lorenzi (1998), inclui: *Cedrela barbata* DC.; *Surenus fissilis* (Vell.) O. Kunt.; *Cedrela hirsuta* DC.; *Cedrela longiflora* DC.; *Cedrela regnelli* DC.; e *Cedrela huberi* Ducke. A espécie apresenta nomes populares como: cedro, cedro-branco, cedro-vermelho, cedro-amarelo, cedro-rosa, cedro-batata, cedro-cetim e cedro da várzea (Lorenzi, 1998). Em alguns estados do Brasil os nomes populares variam muito: acaiacá, acaiacatinga, acajatinga, acaju, acaju-caatinga, capiúva, cedro-amarelo (BA, RJ, SP), cedro-batata (BA, SC), cedro-branco (BA, ES, GO, MG, PA, RJ, SP), cedro-branco-batata (BA), cedro-cetim, cedro-fofo (BA), cedro-rosa (BA, ES, MG, MS, PR, RJ, SC, SP), cedro-rosado (BA), cedro-roxo (PA), cedro-verdadeiro (AL, BA), cedro-vermelho (BA, ES), cedro-da-Bahia, cedro-da-várzea (BA), cedro-de-carangola (BA), cedro-do-campo, cedro-do-rio (BA) (Carvalho, 1994).

Segundo Rizzini (1978), as três espécies de cedro encontradas no Brasil normalmente são confundidas com a espécie *Cedrela fissilis*. Com a finalidade de destacar as diferenças entre tais espécies ressalta que, quanto à distribuição nacional, a espécie *Cedrela odorata* L. é o cedro da Floresta Amazônica, a espécie *Cedrela angustifolia* S. & Moc. é o cedro da Floresta Atlântica e que a espécie *Cedrela fissilis* Vellozo é o cedro das matas mais secas localizadas de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul. Esse autor não desconsidera que existam áreas de interpenetrações das espécies.

Apesar da grande semelhança morfológica entre as três espécies de cedro, a espécie *Cedrela fissilis* destaca-se por apresentar folhas maiores, com 10-15 pares de folíolos agudamente acuminados, firmes, sem domácias e densamente pubescentes, na face inferior (rarissimamente com algumas domácias) e sésseis. Cápsulas medindo 4,5-10cm de comprimento. Cálice raramente fendido. Panículas menores ou iguais às folhas (Rizzini, 1978). Em suma, distingue-se pela pubescência da face inferior dos folíolos, pela falta de domácias e cápsulas maiores (Rizzini & Mors, 1976) e pelos frutos que medem cerca de 5cm de comprimento (Rizzini, 1978).

A ocorrência natural de *Cedrela fissilis* é Latitude 12°N (Costa Rica) a 33°S (Brasil, RS). O limite norte da espécie no Brasil é aproximadamente a 1°S (PA). Área de ocorrência: Costa Rica, Panamá, nordeste da Argentina, Sul da Bolívia, Colômbia, Equador, leste do Paraguai, Peru, Uruguai, Venezuela e Brasil (Carvalho, 1994; Rizzini, 1978). Segundo Lorenzi (1998) e Rizzini & Mors (1976), no Brasil, a espécie *Cedrela fissilis* tem sua distribuição desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Nos demais estados do Brasil também é encontrada, porém, sua ocorrência é menor.

2.2. Ecologia

Cedrela fissilis é uma espécie secundária inicial e secundária tardia, desenvolvendo-se no interior da floresta primária e apresenta grande agressividade na vegetação secundária. É parcialmente ombrófila, no estágio juvenil e heliófita, no estágio adulto. A árvore é caducifólia, normalmente com 10 a 25 m de altura e 40 a 80 cm de DAP e pode atingir até 40m de altura e 200 cm de DAP. Apresenta tronco cilíndrico, reto ou pouco tortuoso. Apresenta tolerância bastante variável ao frio e quando atacada pela broca-do-cedro (*Hypsipyla grandella*) apresenta crescimento tortuoso. A distribuição de uma a três árvores por hectare no sul do Brasil é uma estratégia da espécie que permite diminuir o ataque da broca-do-cedro (Carvalho, 1994). Lorenzi (1998) recomenda o plantio de *Cedrela fissilis* em agrupamentos heterogêneos, devido ao ataque da *Hypsipyla grandella*.

Os plantios puros, feitos em várias regiões do Brasil, sempre resultaram em fracasso total ou acentuado, devido às suas características ecofisiológicas. Por apresentar maior produtividade, sob condições menos intensas de luz, é adequada para plantios mistos (Carvalho, 1994). É uma planta decídua, heliófita ou esciófita, característica das Florestas Semidecíduas e menos freqüente na Floresta Ombrófila Densa, como a pluvial da Costa Atlântica (Lorenzi, 1998).

Segundo Rizzini (1978), diferentemente das espécies *Cedrela odorata* e *Cedrela angustifolia*, que preferem solos mais úmidos, a *Cedrela fissilis* ocorre preferencialmente em matas mais secas, podendo ser encontrada em descampado e até no cerrado. Desenvolve-se no interior de florestas primárias, podendo também ser igualmente encontrada como espécie pioneira na vegetação secundária. Segundo Morellato (1991), em estudo realizado em uma Floresta Semidecídua no sudoeste do

Brasil, a espécie *Cedrela fissilis* apresenta queda das folhas no período de fevereiro a maio, frutificação no período de junho a setembro, brotamento no período de julho a setembro e floração em outubro. Produz, anualmente, grande quantidade de sementes viáveis (Lorenzi, 1998).

2.3. Importância Econômica

Muitas das espécies de árvores da flora brasileira são de grande importância econômica e várias dessas espécies são cultivadas em outros países. Famílias como a das Meliáceas, onde se destacam os gêneros *Cedrela*, *Trichilia* e *Swietenia*, são responsáveis por grande parte da madeira utilizada no mundo (Lorenzi, 1998). Como exemplos brasileiros de Meliáceas destacam-se os gêneros *Cedrela*, o popular cedro, de excelente madeira avermelhada, *Carapa*, *Trichila* e a *Guarea*, todos com madeira de boa qualidade. O mogno, espécie desta mesma família, tem grande valor comercial (Joly, 1985). Todas as três espécies: *Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata* e *Cedrela angustifolia* possuem madeira uniforme, lustrosa, lisa, aromática, macia e muito durável (Rizzini e Mors, 1976).

A madeira de *Cedrela fissilis* apresenta as seguintes características: cor de alburno branco a rosado (Lorenzi, 1998); cerne variando do bege-rosado-escuro ou castanho-claro-rosado mais ou menos intenso até ao castanho avermelhado. De resistência moderada ao ataque de organismos xilófagos; resistente aos agentes exteriores (Carvalho, 1994), salvo se enterrada ou submersa, quando apodrece rapidamente (Lorenzi, 1998). Apresenta boa retenção de pregos e parafusos; excelente absorção de pigmentos e polimento (Carvalho, 1994). Outras características: entre as madeiras leves, o cedro é a que possibilita o uso mais diversificado possível, superado somente pela madeira da espécie *Araucaria angustifolia* (Pinheiro-do-Paraná).

Sua madeira é parecida com a do mogno, sendo, porém mais mole e de textura mais grossa (Carvalho, 1994). Apresenta, portanto, altíssimo valor econômico e comercial, sendo utilizada em carpintaria, marcenaria, esquadrias, forros, construção naval e aeronáutica, caixas de charutos, instrumentos musicais, arborização de parques e ruas, molduras, móveis, entre outras (Rizzini e Mors, 1976). A madeira é largamente utilizada em compensados, esculturas, obras de talha, modelos e molduras, esquadrias, móveis em geral, marcenaria, carpintaria, construção naval e aeronáutica, na confecção de caixas, lápis e instrumentos musicais. É também usada em projetos de paisagismo de parques, cidades e jardins (Lorenzi, 1998).

2.4. Importância Medicinal, Inseticida e Fitoquímica

A família Meliaceae tem sido bastante estudada pela sua importância medicinal, fitoquímica e no controle de insetos. Vários são os trabalhos publicados, com as mais diferentes espécies, tais como: *Toona ciliata*, *Cedrela odorata* e *Cedrela fissilis* (Maia *et al.*, 2000), *Toona ciliata* e *Cedrela odorata* Graft. (Silva *et al.*, 1999), *Trichilia catigua* “Catuaba” (Pizzolatti *et al.*, 2002), *Azadirachta indica* (Chattopdhyay *et al.*, 1993; Aliero, 2003; Okemo *et al.*, 2001; Wewetzer, 1998); *Melia azedarach* (Oelrichs, *et al.*, 1983; Ortego *et al.*, 1999; Hammad *et al.*, 2001; Hammad *et al.*, 2000), *Turraea wakefieldii* (Ndung’u *et al.*, 2003), *Melia toosendan* (Shu-tong *et al.*, 2001), entre outros.

Há mais de 20 anos a família Meliaceae vem sendo bastante estudada como a mais promissora fonte de compostos com propriedades inseticidas (Hammad *et al.*, 2001). Muitos gêneros desta família produzem vários compostos com ação medicinal e inseticida (Lorenzi 1998). As espécies desta família têm seu papel principalmente na medicina natural, apresentando como propriedades terapêuticas: ação anti-viral, anti-

helmíntica, anti-reumática, anti-inflamatória e anti-cancerígena (Marzalina & Krishnapillay, 1999). Segundo Borges *et al.* (2003), extratos de *Melia azedarach* têm ação inibitória no crescimento de larvas de *Boophilus microplus* e em fêmeas inibe a produção de ovos, mas não existe ação sobre os adultos deste ectoparasita. Argüelles & Fernandes (2000) verificaram que ao colocar sementes para germinar em meio Murashige e Skoog, as substâncias exsudadas após a germinação tinham ação antifúngica em hifas de *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Penicilium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. e também, em algumas leveduras. Ahn *et al.* (1994) isolaram um limonóide de *Melia azedarach* var. Japonica, que tem ação antitumoral em algumas doenças como adenocarcinoma, melanoma e carcinomas. A importância econômica da espécie *Cedrela fissilis* destaca-se também na área farmacológica, pois inúmeras são suas atividades terapêuticas, tais como ação antiviral, anti-tumoral, anti-helmíntica, anti-reumática, anti-inflamatória, anti-fúngica, inseticidas e anti-ectoparasitas, entre outras. Segundo Carvalho (1994), na medicina popular, a casca do cedro é utilizada na forma de chá como tônica, adstringente e no combate à febre. Sua decocção é utilizada para lavar feridas e úlceras. A madeira do cedro, submetida à destilação, produz óleo essencial ao qual se atribui poder repelente ao cupim. Porém, a presença deste óleo é pouco intensa, tanto na casca como no lenho (Carvalho, 1994).

A ação inseticida das espécies da família Meliaceae é diversa e os materiais utilizados para os estudos vão desde a utilização de extratos aquosos ou etanólicos de folhas, raízes ou calos até o uso dos óleos essenciais. Maia *et al.* (2000) estudaram os óleos essenciais de *Toona ciliata*, *Cedrela odorata* e *Cedrela fissilis*. O gênero *Cedrela* apresentou maior porcentagem de sesquiterpenos, formados a partir do precursor pirofosfato de *cis* e *trans*-fornesila. A espécie *Cedrela fissilis* apresentou mais sesquiterpenos extraídos de folhas jovens, com 81,18%, e a maior quantidade dos

sesquiterpenos encontrados foi biciclogermacreno, com 26,62% de óleo em folhas adultas. As respostas a eletroantogramas médios dos óleos essenciais destas espécies, em fêmeas de *Hypsipyla grandella*, foram significativamente maiores que aquelas obtidas em machos, indicando que as fêmeas utilizariam os odores destes óleos para seleção das plantas hospedeiras e na escolha de locais para ovoposição. Já Soares *et al.* (2003), verificaram através de eletroantogramas, que fêmeas e machos são atraídos para a oviposição e destruição de folhas, ramos e árvores da *Swietenia macrophylla*, pela composição do óleo essencial desta espécie. O composto β -cariofileno é o responsável, na maioria dos casos, pela oviposição de fêmeas de *Hypsipyla grandella*. Silva *et al.* (1999) analisaram os óleos essenciais de *Toona ciliata* e *Cedrela odorata* e isolaram sesquiterpenos, cicloartenos, estigmasterol, campesterol, sistostenona, limonoides e outros compostos, sendo que os limonoides tiveram ação na indução e resistência ao crescimento da *Hypsipyla grandella*.

Ndung'u *et al.* (2003) descobriram cinco novos limonóides, que foram isolados de raízes de *Turraea wakefieldii*. Três desses novos compostos químicos apresentaram atividade larvicida, quando em contato com larvas dos mosquitos *Anopheles gambiae*. Aliero (2003) estudou o efeito de extratos de sementes, folhas e cascas da espécie *Azadirachta indica*, contra larvas de mosquitos *Anopheles*. Após 12 horas de exposição aos extratos de sementes, folhas e casca, as taxas de mortalidade foram, respectivamente, 100, 98 e 48%. Portanto, para controle do mosquito *Anopheles*, o autor recomenda o uso de extratos de folhas e sementes dessa espécie. Hammad *et al.* (2001) testaram extratos de calos, frutos e folhas de *Melia azedarach* L. em adultos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) nas culturas de tomates. Observaram que os extratos dos calos e das diferentes idades de folhas e frutos de *Melia azedarach* mostraram alta atividade

repelente e provocaram decréscimo na oviposição e, conseqüentemente, na emergência de adultos dessa espécie. As taxas encontradas ficaram entre 58,9 a 67,7%. Os extratos aquosos e a base de metanol de *Melia azedarach* tiveram similar eficácia.

Shu-tong *et al.* (2001) testaram 88 espécies de 44 famílias de plantas da China em suspensões de *Phytophthora infestans*. Trinta e uma espécies tiveram efeito inibitório total na germinação de *Phytophthora infestans* e 32 espécies inibiram completamente o crescimento do micélio do fungo em cultura de batatas. A espécie *Melia toosendan*, uma meliácea, apresentou taxa de 74,24% de inibição na germinação e taxa de 100% no crescimento do micélio. Tais resultados indicam que a espécie pode ser usada para o controle do *Phytophthora infestans*. Feng *et al.* (1995) utilizaram extratos da casca da *Melia toosendan* na inibição da atividade da esterase em *Spodoptera litura* e *Melanoplus sanguinipes*. Observaram, também, a ação sinérgica ao malation, só que com menor toxicidade. Já Wewetzer (1998) estudou a produção de Azadirachtin em calos de *Azadirachta indica* através da TLC e HPLC e verificou que a produção de Azadirachtin depende da linhagem celular, do meio e da fonte de carbono utilizada.

Ortego *et al.* (1999) testaram a toxicidade de quatro terpenóides em larvas de *Leptinotarsa decemlineata* em cultivo de batatas do Colorado. Os terpenóides foram extraídos das espécies *Trichilia havanensis*, *Scutellaria alpina* e *Melia azedarach*, sendo os terpenóides extraídos, respectivamente, 1,7-di-O-acetilhavanensis, 3,7-di-O-acetilhavenensis (mistura F₁₈), escutalpina-B e azadirona. A maior mortalidade das larvas foi com a mistura F₁₈, pois ela reduziu significativamente a atividade da protease e esterase e aumentou a detoxificação enzimática. Hoffmann & Lorenz (1998) relatam os recentes desenvolvimentos na área dos IGR (reguladores de crescimento de insetos).

Estes são hormônios que atuam na ação, crescimento e desenvolvimento de insetos. Algumas classes de hormônios como os ecdisteróides e sequiterpenóides juvenis (JHs) têm sido bastante utilizados. Eles atuam nas fases larval e pupal, na homeostase e na reprodução dos insetos. Hammad *et al.* (2000) verificaram que extratos aquosos de frutas e folhas de *Melia azedarach* tiveram a mesma eficácia que outros pesticidas comerciais, utilizados rotineiramente em culturas de ervilhas infestadas por *Liriamyza huidobrensis*, de *Beta vulgaris* var. e de *Cucumis sativus* L.

A importância medicinal e terapêutica desta família é bastante estudada. Pizzolatti *et al.* (2002) descobriram dois epiméricos de flavolignanas de *Trichilia catigua* (Catuaba). As flavolignanas 1 e 2 foram isoladas do tronco dessa espécie e estudadas para a determinação das estruturas químicas. Foi avaliada e confirmada a ação antibacteriana em *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* através da inibição do crescimento das colônias.

Chattopdhyay *et al.* (1993) estudaram extratos de folhas de *Azadirachta indica* e demonstraram o efeito dos mesmos sobre a diminuição da taxa de glicose hepática em ratos. Ratos com alta ingestão de glicose e ratos diabéticos tiveram suas taxas de glicogênio diminuídas. A insulina com os extratos de *Azadirachta indica*, reduziram também as taxas de glicogênio. Tais resultados indicam que os extratos de folhas dessa espécie possuem ação antihiper-glicêmica e hepatoprotetora. Chattopdhyay *et al.* (1993) verificaram a ação antiinflamatória de extratos desta espécie em edemas de patas de ratos. Oelrichs *et al.* (1983) verificaram a presença de quatro novos tetranortriterpenos tóxicos, pertencentes à classe dos limonoides em *Melia azedarach* L., as meliatoxinas A₁, A₂, B₁ e B₂. Evidenciaram que estes compostos são responsáveis por alterações do

sistema nervoso e morte em porcos que ingeriram os frutos desta espécie, confirmando, assim, que alguns limonoides são essenciais e outros tóxicos para humanos e animais.

Okemo *et al.* (2001) investigaram a ação dos extratos da *Azadirachta indica* em diferentes bactérias. Observaram que os extratos tiveram ação antibacteriana sobre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Chang *et al.* (2002) estudaram os extratos da espécie *Toona sinensis* em tumores de pulmão em humanos e verificavam que essa espécie inibe a proliferação e a ativação das células cancerígenas, aumentando o prognóstico de sobrevivência dos pacientes.

2.5. Biotecnologia

Atualmente, as aplicações da biotecnologia na área agrícola e florestal têm sido bastante difundidas. Kerbauy (2003) descreve várias aplicações das técnicas de biotecnologia de plantas, como a clonagem, a cultura de células, tecidos e órgãos, a obtenção de plantas haplóides a partir de cultura de anteras, a produção de metabólitos secundários em biorreatores, a geração de variantes somaclonais, a microenxertia, a tecnologia dos protoplastos e a criopreservação, entre outras.

Ford-Lloyd & Jackson (1991) constataram que através da biotecnologia vários aspectos genéticos das plantas podem ser melhorados e conservados para gerações futuras. Alguns métodos de conservação das espécies como: cultura *in vitro* através da restrição do crescimento e da criopreservação, de melhoramento genético, produção de alimentos transgênicos, criação de bancos de germoplasmas, cuidados com viroses em plantas, adotando para isso quarentena e criação de bibliotecas de DNAs, são

importantes para a conservação da diversidade genética das espécies em extinção e futuros estudos biotecnológicos.

Segundo Medeiros (2003), a clonagem de espécies criticamente ameaçadas, quando os demais métodos falharem, por exemplo, tem sido indicada como estratégia de conservação. Da mesma forma, a expansão de bancos de sementes e esporos, a manutenção de estoques de tecidos e de embriões congelados em nitrogênio líquido (-196 C) ou em seu vapor (-150 a -180 C). Esses métodos, contudo, são dispendiosos e de eficácia relativa, notadamente para bactérias, arqueanos, protistas, fungos, insetos e outros invertebrados que formam a base da biosfera. A única forma segura de salvar espécies, além de ser a mais barata e sensata, é preservar os ecossistemas naturais em que vivem atualmente essas espécies. De acordo com este autor, os estudos biotecnológicos, mesmo quando têm por objetivo estudar espécies ameaçadas de extinção, procuram agregar justificativas adicionais de ordem econômica, buscando, assim, tanto maior facilidade de financiamento quanto de aceitação, e, por conseguinte, maior disseminação de seus resultados e potencialidades.

As abordagens biotecnológicas em Meliáceas têm sido registradas na literatura, através dos trabalhos com inúmeras espécies como: *Cedrela odorata* L. (Maruyama *et al.*, 1997, Campos *et al.*, 1991 e Tuesta, 2003), *Guazuma crinita* Mart. e *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don (Maruyama *et al.*, 1997), *Azadirachta indica* (Kumar *et al.*, 1996), *Melia azedarach* (Bohnenstengel *et al.*, 1999 e Marzalina & Krishnapillay, 1999), *Switenia macrophylla* (Marzalina & Krishnapillay, 1999) e *Cedrela fissilis* (Nunes *et al.*, 2002 e 2003 e Arguelles & Fernandes, 2000).

A *Cedrela fissilis* é uma espécie com risco de extinção e, por isso, estudos biotecnológicos têm sido conduzidos para suprimir esse risco (Medeiros, 2003). Nunes

et al. (2002 e 2003) estudaram essa espécie para a produção de microplantas *in vitro*, cultura de calos, raízes e suspensões celulares, criopreservação de sementes zigóticas e encapsulamento em alginato de sódio.

A espécie *Cedrela odorata* tem sido estudada para a conservação *in vitro* e encapsulamento de seus ramos em alginato de sódio (Maruyama *et al.*,1997), produção de metabólitos secundários como os terpenos, extraídos do óleo essencial desta espécie (Campos *et al.*,1991) e embriogênese somática (Tuesta, 2003). As espécies *Guazuma crinita* Mart. e *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don (Maruyama *et al.*,1997), também têm sido encapsuladas em alginato de sódio, para sua conservação por longos períodos de tempo.

As espécies *Aglaia spectabilis* (Scheneider *et al.*, 2000), *Aglaia* sp. (Greger *et al.*, 2001), *Azadirachta indica* (Kumar *et al.*,1996), tem seu papel biotecnológico como controladoras do crescimento de larvas *Spodoptera littoralis*, através de substâncias extraídas de seu pericarpos e folhas. Outras espécies como *Melia azedarach* (Bohnenstengel *et al.*, 1999 e Marzalina & Krishnapillay, 1999), *Amoora rohituka* (Chowdhury *et al.*, 2003), *Cipadesca baccifera* (Luo *et al.*, 2000) e *Dysoxylum malabaricum* (Hisham *et al.*, 2001), têm importantes papéis a nível medicinal e terapêutico, com funções antiinflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas. Essas espécies devem ser preservadas, pois sua ação medicinal e inseticida é importante para a humanidade.

Segundo Medeiros (2003), na preservação da biodiversidade, o uso da biotecnologia é o último recurso. Em situações cada vez mais frequentes, passa a ser o único. A fragmentação e o isolamento dos remanescentes florestais podem determinar a inviabilidade da manutenção de populações inteiras de plantas e de animais. Em casos

assim, tecnologias de intervenção são indispensáveis para que se restabeleça um fluxo gênico minimamente satisfatório. O problema maior é que grande parte das perdas de biodiversidade que já provocamos, estão muito além da capacidade humana de recuperá-las. Adicionalmente, não podemos negligenciar o custo da utilização da alta tecnologia e o fato de que os recursos hoje disponíveis se encontram quase sempre nos países ricos, enquanto as grandes perdas de biodiversidade ocorrem majoritariamente nos países pobres dos trópicos. Assim, notadamente para esses países pobres, a preservação do hábitat é vista como a estratégia viável e realística. Nesse sentido, a área biotecnológica deve ser encarada como uma ponte para o futuro da humanidade e deve ser usada para diminuir as perdas de flora e fauna, para que possamos ter, ainda que no futuro, perspectivas de conservação e preservação da biota.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Estudar o crescimento de calos em diferentes condições de cultivo, realizar análises preliminares do teor de óleos essenciais e dos constituintes voláteis produzidos pelos calos e também estudar a conservação *in vitro* de propágulos vegetativos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis*.

3.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar os efeitos de reguladores de crescimento, de tipos de explantes, de fontes de carbono e de períodos de cultivo sobre o crescimento de calos.
2. Estudar o efeito de combinações de diferentes concentrações de sacarose e de glutamina sobre o crescimento de calos.
3. Verificar o efeito da presença e da ausência de luz sobre o crescimento dos calos.
4. Estudar o efeito da idade das plântulas doadoras de explantes sobre o crescimento dos calos.
5. Proceder à análise preliminar do rendimento de óleos essenciais e dos constituintes voláteis produzidos pelos calos.
6. Verificar o efeito da criopreservação sobre a viabilidade de sementes e de diferentes temperaturas sobre a conservação *in vitro* de propágulos vegetativos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas sementes e plântulas axênicas de *Cedrela fissilis*, que foram empregadas na remoção dos explantes para realização dos experimentos. As sementes foram adquiridas do Instituto Florestal de São Paulo e coletadas na Estação Experimental de Araraquara, São Paulo, em junho de 2003.

4.2. Desinfecção das sementes

As sementes, após serem lavadas abundantemente com água corrente, foram desinfetadas em condições assépticas, utilizando-se uma solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa) com 2.5% (v/v) de cloro ativo, acrescida de algumas gotas de detergente neutro, por 90 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada e inoculadas em meio de cultura.

4.3. Preparação dos meios de cultura

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o meio de cultura Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962), preparação comercial em pó, produzida pela Sigma Chemical Co., suplementado com sacarose (58,4 mM), Phytigel (2 g/L) e, em alguns experimentos específicos, reguladores de crescimento em diferentes concentrações. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem, pela adição de NaOH 0.1 M ou HCl 0.1 N. Os meios de cultura foram distribuídos em tubos de ensaio (20 x 150 mm), na quantidade de 5 mL/tubo, ou em tubos de ensaio (25 x 150 mm), na quantidade de 8 mL/tubo, dependendo do experimento a ser realizado. No caso dos experimentos cujo objetivo foi germinar as sementes e produzir plântulas

axênicas foram utilizados tubos de ensaio de 20 x 150 mm, com 5 mL de meio de cultura por tubo. Nos demais experimentos foram utilizados tubos de ensaio de 25 x 150 mm, com 8 mL de meio de cultura por tubo. Em todos os casos, os tubos foram fechados com tampas de polipropileno. A autoclavagem foi realizada por 18 minutos a 1.1 Kgf/cm², em temperatura de 121°C. Estes procedimentos foram utilizados em todos os experimentos descritos a seguir.

4.4. Estabelecimento de plântulas e condições de crescimento das culturas

As sementes desinfectadas foram inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com sacarose e Phytigel nas concentrações citadas no item 4.3. Os tubos de ensaio foram cobertos com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm), presos com elásticos de borracha. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($22.3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e umidade relativa de 70%. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, exceto quando especificado.

4.5. Efeito de tipos de explantes e de diferentes concentrações de ANA combinadas com 2,5 μM de BAP sobre o crescimento dos calos

Nesse experimento foram utilizados, como explantes, segmentos nodais cotiledonares (segmentos de 1 cm de comprimento de caule, contendo as gemas axilares existentes nos pontos de inserção dos cotilédones) e segmentos apicais (segmentos de 1 cm de comprimento do caule, contendo a gema apical). Os explantes foram removidos de plântulas de 5-6 semanas, germinadas *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com 2,5 μM de 6-

benzilaminopurina (BAP) e de concentrações de 0, 1,25, 2,5 e 5 μM de ácido *a*-naftalenoacético (ANA). As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. O crescimento das culturas foi avaliado 8 semanas após o início do experimento, através da determinação da massa fresca total das culturas, massa fresca do calo e razão massa fresca do calo/massa fresca total das culturas. Foram utilizadas no mínimo 11 repetições por tratamento.

4.6. Efeito de tipos de explantes e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento de calos

Nesse experimento foram utilizados, como explantes, segmentos nodais cotiledonares (segmentos de 1cm de comprimento de caule, contendo as gemas axilares existentes nos pontos de inserção dos cotilédones) e segmentos nodais foliares (segmentos de 1cm de comprimento do caule, contendo as gemas axilares existentes nos pontos de inserção do primeiro par de folhas, a partir do cotilédone apical). Os explantes foram removidos de plântulas de 5-6 semanas, germinadas *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com 2,5 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e de 5 μM de ácido *a*-naftalenoacético (ANA). As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. O crescimento dos calos foi avaliado após 4 e 8 semanas do início do experimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca e o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 11 repetições por tratamento.

4.7. Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com diferentes concentrações de BAP sobre o crescimento de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares

Nesse experimento foram utilizados, como explantes, segmentos nodais cotiledonares. Os explantes foram removidos de plântulas de 5-6 semanas, germinadas *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com as seguintes combinações de BAP e ANA: 0/2,5 μM , 0/5 μM , 2,5/2,5 μM , 5/2,5 μM , 2,5/5 μM e 5/5 μM . As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. O crescimento dos calos foi avaliado após 8 semanas do início do experimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca. O teor de água dos calos também foi determinado. Foram utilizadas no mínimo 10 repetições por tratamento.

4.8. Efeito de diferentes fontes de carbono e de períodos de cultivo sobre o crescimento dos calos

Segmentos nodais cotiledonares foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 58,4 mM de sacarose, frutose ou glicose, 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. O crescimento dos calos foi avaliado após 4 e 8 semanas do início dos experimentos, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Também foram calculadas as taxas de variação no crescimento e no teor de água dos calos nos diferentes intervalos de cultivo, de acordo com o método descrito no item 4.14. Foram utilizadas no mínimo 15 repetições por tratamento.

4.9. Efeito de diferentes concentrações de glutamina e de sacarose sobre o crescimento de calos

Segmentos nodais cotiledonares foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de sacarose, 2,5 μ M de BAP, 5 μ M de ANA, na ausência ou na presença de 2,73 mM de glutamina. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. O crescimento dos calos foi avaliado 8 semanas após o início dos experimentos, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 15 repetições por tratamento.

4.10. Efeito da presença e da ausência de luz e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento dos calos

Segmentos nodais cotiledonares foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 2,5 μ M de BAP e 5 μ M de ANA. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. No tratamento de escuro, os tubos de ensaio contendo os explantes foram envoltos em duas folhas de papel alumínio. O crescimento dos calos foi avaliado 4 e 8 semanas após o início dos experimentos, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 15 repetições por tratamento. Em um outro experimento independente, realizado nas mesmas condições do experimento mencionado anteriormente, o crescimento e o teor de água dos calos foram avaliados 9 semanas após o início do experimento e foram utilizadas 12 repetições por tratamento.

4.11. Efeito da idade das plântulas sobre o crescimento dos calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares

Segmentos nodais cotiledonares, obtidos de plântulas axênicas de 5 e de 18 semanas de idade, crescidas *in vitro*, foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 2,5 μM de BAP, 5 μM de ANA e 2 g/L de Phytigel. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. O crescimento dos calos foi avaliado 9 semanas após o início dos experimentos, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 12 repetições por tratamento.

4.12. Efeito do período de cultivo sobre o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas com 18-21 semanas de idade

Segmentos nodais cotiledonares, obtidos de plântulas axênicas de 18-21 semanas de idade, crescidas *in vitro*, foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 2,5 μM de BAP, 5 μM de ANA e 2 g/L de Phytigel. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. O crescimento dos calos foi avaliado 6, 9 e 10 semanas após o início dos experimentos, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 12 repetições por tratamento.

4.13. Determinação da massa seca e do teor de água de calos

Para a determinação da massa fresca, os calos foram pesados imediatamente após a remoção do meio de cultura e para a determinação da massa seca, os calos foram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro e mantidos em estufa, por 48 horas a 85°C. O teor de água dos calos foi expresso em porcentagem da massa fresca e em mg de água por mg de massa seca e determinado através das seguintes fórmulas:

Fórmula₁: Teor de água (% da massa fresca) = (massa fresca – massa seca)/massa fresca x 100.

Fórmula₂: Teor de água (mg de água/mg de massa seca) = (massa fresca – massa seca)/massa seca.

4.14. Determinação das taxas de variação no crescimento e no teor de água dos calos em diferentes períodos de cultivo

As taxas de variação do crescimento e do teor de água dos calos foram calculadas através da fórmula:

$(M_2 - M_1) / T_2 - T_1$, sendo: M_2 , a massa fresca, massa seca ou teor de água dos calos, na coleta do tempo T_2 e M_1 , a massa fresca, massa seca ou teor de água dos calos, na coleta do tempo T_1 ; e $T_1 - T_2$, o intervalo de tempo entre as coletas 1 e 2.

4.15. Análise de rendimento de óleo essencial produzido por calos cultivados na luz

Foram utilizados calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares, obtidos de plântulas axênicas de 18-22 semanas de idade, cultivados, por 8-10 semanas, na luz, no meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA. A extração e análise de rendimento da fração de interesse foram realizadas utilizando-se o equipamento de hidro-destilação, equipado com coletor graduado, segundo o protocolo descrito por Houghton & Raman (1998).

4.16. Análise dos constituintes voláteis biossintetizados por calos produzidos na luz e no escuro.

Foram utilizados calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados por 9 semanas, na luz ou no escuro, no meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA. Os constituintes voláteis foram extraídos dos calos por extração líquido sólido. Um grama de massa fresca dos calos foi triturada com 10 mL de água destilada e transferida para um frasco apropriado com “head space”. Os constituintes voláteis foram então extraídos por uma hora e injetados num cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa, para a obtenção dos cromatogramas e identificação dos contituintes voláteis.

4.17. Conservação *ex situ* através da conservação *in vitro* de propágulos vegetativos e criopreservação de sementes zigóticas

4.17.1. Conservação *in vitro* de propágulos vegetativos

Segmentos nodais foliares e apicais foram removidos de plântulas axênicas com 5 semanas de idade e inoculados em meio de cultura Murashige & Skoog, contendo a metade da concentração salina, suplementado com 2 g/L de Phytigel. Foram inoculados 5 explantes por tubo de ensaio e os mesmos foram armazenados por 6 semanas, em câmara de crescimento, a $25\pm 2^\circ\text{C}$, nas condições descritas no item 4.4 ou na geladeira, a 5°C , no escuro. Após 6 semanas os explantes foram transferidos para o meio de cultura, descrito no item 4.3, suplementado com $2.5\ \mu\text{M}$ de BAP e $5\ \mu\text{M}$ de ANA. As culturas foram mantidas nas mesmas condições do item 4.4. O crescimento dos calos foi avaliado 8 semanas após o início dos experimentos, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas de 12-15 repetições por tratamento.

4.17.2. Criopreservação de sementes zigóticas

4.17.2.1. Determinação do teor de água das sementes

O teor de água das sementes foi determinado no início dos experimentos. Foram utilizadas, para a determinação do teor de água, 3 repetições contendo 25 sementes cada. Após a determinação da massa fresca as sementes foram colocadas para secar em estufa por um período de 16 horas a 103°C , para a determinação da massa seca (Reed *et al.*, 2002). O teor de água (%) foi determinado segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Fórmula}_1: \text{Teor de água (\%)} = ((\text{peso fresco} - \text{peso seco})/\text{peso fresco}) \times 100.$$

4.17.2.2. Efeito do tipo de descongelamento sobre a germinação

Para testar o efeito do tipo de descongelamento sobre a germinação das sementes criopreservadas, as mesmas foram imersas em nitrogênio líquido por 60 minutos e em seguida submetidas ao descongelamento rápido, através da imersão em banho-maria a 45°C, por 3 minutos, ou ao descongelamento lento, a 25°C por 30 minutos. Em seguida foram colocadas para germinar. Foram utilizadas cinco repetições de 25 sementes por tratamento.

4.17.2.3. Efeito do tipo de armazenamento após a criopreservação sobre a germinação

Os tratamentos de armazenamento das sementes, após a criopreservação, foram realizados por períodos de 1 e 2 semanas. As sementes, após terem sido submetidas à imersão em nitrogênio líquido (-196°C) por 60 minutos e descongeladas a 25°C por 30 minutos (descongelamento lento) foram armazenadas em geladeira (5°C) e em temperatura ambiente (25°C). Após os diferentes períodos de armazenamento, foram colocadas para germinar. Foram utilizadas cinco repetições de 25 sementes por tratamento.

4.17.2.4. Efeito do armazenamento em geladeira e em nitrogênio líquido por longos períodos de tempo sobre a germinação

Para testar o efeito do armazenamento em geladeira e em nitrogênio líquido sobre a germinação, lotes de sementes foram mantidos em geladeira (5°C) ou em nitrogênio líquido (-196°C) por períodos de 7, 11 e 15 meses. Ao final de cada período de armazenamento as sementes foram removidas e colocadas para germinar. Foram utilizadas cinco repetições de 25 sementes por tratamento.

4.17.2.5. Condições para a germinação das sementes

As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri, sobre duas camadas de papel de filtro embebidas com água destilada. As placas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. A germinação foi monitorada em intervalos de dois dias, até a estabilização da mesma.

4.18. Análise estatística

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student, ao nível de 5% de probabilidade, quando a comparação se restringiu a apenas dois tratamentos, ou de análise de variância simples ou multifatorial, com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, quando mais de dois tratamentos foram comparados (Gomez & Gomez, 1984). A separação de médias dos experimentos de criopreservação, quando mais de dois tratamentos foram comparados, foi realizada pelo Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ao nível de 5% de probabilidade. Quando pertinente, os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada da porcentagem antes da realização da análise estatística. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software estatístico Statgraphics versão 7.0.

5 RESULTADOS

5.1. Otimização do crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

5.1.1. Efeito de tipos de explantes e de diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP 2,5 μM sobre a indução e o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados indicam que na ausência de ANA ou na concentração de 1,25 μM de ANA houve formação de ramos em 92-100% das culturas iniciadas, tanto com segmento nodal cotiledonar como apical, sendo os máximos valores de formação de calos de 25%, para segmento apical e de 50%, para segmento nodal cotiledonar (**Tabela 1**). A partir da concentração de 2,5 μM de ANA os valores de indução de calos aumentaram, respectivamente, para 50 % e 91,7%. Quando 5 μM de ANA foi utilizado os valores de porcentagem de indução de calos alcançaram, respectivamente, 100% e 91,7%, enquanto que as porcentagens de culturas com ramos decresceram para 75% e 25%, respectivamente. Na ausência de ANA, houve formação de calos em 18,2% das culturas iniciadas com segmentos apicais e em apenas 9,1% das culturas iniciadas com segmentos nodais cotiledonares. Com 5 μM de ANA e na sua ausência, não houve formação de raízes nas culturas iniciadas com segmentos nodais apicais. A maior porcentagem de formação de raízes foi verificada com as culturas iniciadas com segmentos nodais cotiledonares nas concentrações de ANA 2,5 e 5 μM , com 16,7 e 16,7%, respectivamente.

Tabela 1. Efeito de tipos de explante e de concentrações de ANA sobre a morfogênese de culturas *in vitro* de *Cedrela fissilis* originadas em meio Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μM de BAP, após 8 semanas de cultivo.

ANA (μM)	BAP (μM)	Tipo de explante	Número de explantes inoculados	Formação de calos (%)	Formação de ramos (%)	Formação de raízes (%)
0	2,5	Apical	11	18,2	100	0
0	2,5	Cotiledonar	11	9,1	100	9,1
1,25	2,5	Apical	12	25	100	8,3
1,25	2,5	Cotiledonar	12	50	92	8,3
2,5	2,5	Apical	16	50	75	12,5
2,5	2,5	Cotiledonar	12	91,7	50	16,7
5	2,5	Apical	12	100	75	0
5	2,5	Cotiledonar	12	91,7	25	16,7

A análise de variância multifatorial dos resultados sobre o efeito de diferentes tipos de explantes indicou interação significativa entre os fatores tipo de explante e concentrações de ANA apenas para o parâmetro massa fresca total das culturas (**Tabela 2**). Observa-se que, o valor máximo da massa fresca total das culturas foi obtido com o segmento nodal cotiledonar e com 5 μM de ANA (1277,4 mg). Este valor diferiu significativamente de todos os demais tratamentos, porém, foi estatisticamente semelhante aos valores obtidos com segmento nodal cotiledonar e 2,5 μM de ANA (1216,1 mg) e com segmento apical e 5 μM de ANA (977,0 mg). Os valores significativamente menores de crescimento das culturas em massa fresca foram observados no tratamento com segmento nodal cotiledonar e na ausência de reguladores de crescimento (349,5 mg). Entretanto este valor foi estatisticamente semelhante aos

obtidos em todos os tratamentos com segmentos apicais, exceto com 5 μM de ANA, e com segmentos nodais cotiledonares e 1,25 μM de ANA.

Tabela 2. Efeito de tipos de explante e de concentrações de ANA sobre o crescimento em massa fresca de culturas *in vitro* de *Cedrela fissilis* mantidas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μM de BAP, após 8 semanas de cultivo.

Fatores	Níveis	MF total (mg) ^{a*}	MF do calo (mg) ^a	Razão MF do calo/MF total ^a x 100
Explante	NC	908,5 b	784,2 b	74,8 a
	NA	679,1 a	501,3 a	70,3 a
ANA (μM)	0	428,9 a	164,2 a	37,4 a
	1,25	619,4 ab	473,2 b	72,3 b
	2,5	928,1 b	818,4 c	84,2 c
	5,0	1133,8 b	1059,1 c	92,5 c
Interação Explante x ANA				
	NC 0 μM	349,5 a	171,1	39,4
	NC 1,25 μM	744,3 abc	590,6	74,6
	NC 2,5 μM	1216,1 cd	1086,8	87,4
	NC 5,0 μM	1277,4 d	1237,3	95,0
	NA 0 μM	508,1 ab	157,3	35,6
	NA 1,25 μM	494,5 ab	355,8	70,0
	NA 2,5 μM	733,6 ab	603,6	81,7
	NA 5,0 μM	977,0 bcd	864,6	89,9

^aMédias de no mínimo onze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * = interação significativa; NC= nó cotiledonar; NA= nó apical; MF= massa fresca.

As análises estatísticas conduzidas, considerando os efeitos isolados dos fatores tipo de explante e concentrações de ANA, para os parâmetros massa fresca do calo e razão massa fresca do calo/massa fresca total da cultura, que não apresentaram interação significativa, como pode ser observado na **Tabela 3** que, tanto para os para os segmentos nodais cotiledonares como para os apicais os valores significativamente maiores de massa fresca foram encontrados nas concentrações de 2,5 μM (1086,8 mg e 603,6 mg, respectivamente) e 5,0 μM (1237,3 mg e 864,6 mg, respectivamente) de ANA. No caso dos segmentos nodais cotiledonares, os valores de massa fresca obtidos nestas concentrações diferiram significativamente dos observados na concentração de 1,25 μM de ANA e do tratamento com ausência de ANA (171,1 mg), mas no caso dos segmentos apicais, verifica-se que o valor obtido na concentração de 2,5 μM de ANA foi estatisticamente similar ao valor observado com 1,25 μM de ANA, o qual, por sua vez, também não foi estatisticamente diferente do tratamento desprovido de ANA (157,3 mg). Observa-se que, apenas na concentração de 2,5 μM de ANA houve diferença significativa, entre os valores de massa fresca dos calos, sendo que a massa fresca dos calos produzidos, a partir de segmentos nodais cotiledonares (1086,8 mg) foi significativamente superior à massa fresca dos calos produzidos a partir de segmentos apicais (603,6 mg). Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os valores de razão massa fresca do calo/massa fresca total da cultura, obtidos a partir dos segmentos nodais cotiledonares ou apicais, em nenhuma das concentrações de ANA utilizadas e mesmo na ausência deste regulador de crescimento. Tanto para os segmentos nodais cotiledonares como para os apicais os valores significativamente maiores de razão massa fresca do calo/massa fresca total da cultura foram encontrados nas concentrações de 2,5 μM (87,4mg e 81,7 mg, respectivamente) e 5,0 μM (98,1 mg e 89,9 mg, respectivamente) de ANA. Os menores valores encontrados foram na ausência

de ANA, para os dois tipos de explantes (39,4 e 35,6 mg, respectivamente) e estes valores não diferiram estatisticamente do tratamento com 1,25 μM de ANA.

Tabela 3. Efeito de tipos de explante e de concentrações de ANA sobre o crescimento em massa fresca dos calos de *Cedrela fissilis* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μM de BAP, após 8 semanas de cultivo.

Tipo de explante	ANA (μM) ^a				Média
	0	1,25	2,5	5,0	
MF dos calos (mg)					
Nó cotiledonar	171,1 Aa	590,6 Aa	1086,8 Bb	1237,3 Ab	784,2 B
Nó apical	157,3 Aa	355,8 Aab	603,6 Abc	864,6 Ac	501,3 A
Média	164,2 a	473,2 b	853,8 c	1059,1 c	
Razão MF dos calos/MF total					
Nó cotiledonar	39,4 Aa	74,6 Ab	87,4 Abc	98,1 Ac	74,8 A
Nó apical	35,6 Aa	69,9 Ab	81,7 Abc	89,9 Ac	70,3 A
Média	37,4 a	72,3 b	84,2 c	92,5 c	

^aMédias de no mínimo onze repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$) e com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca.

5.1.2. Efeito de diferentes tipos de explantes e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*.

A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos no experimento conduzidos para estudar o efeito dos diferentes tipos de explantes (segmentos nodais cotiledonares e foliares) e de diferentes períodos de cultivo das culturas (4 e 8 semanas) sobre o crescimento dos calos de *Cedrela fissilis*, em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 2,5 μM de BAP e de 5 μM de ANA. A análise de variância multifatorial não indicou interação significativa entre os fatores tipo de explante e períodos de tempo, para nenhum dos parâmetros avaliados. Entretanto, as análises estatísticas conduzidas para cada fator, isoladamente, indicou não haver diferenças estatísticas significativas entre os valores de massa fresca obtidos a partir de segmentos nodais cotiledonares e foliares, em nenhum dos períodos de tempo de cultivo analisados. Observa-se, também, que no período de cultivo de oito semanas os valores de massa fresca obtidos, tanto para segmentos nodais cotiledonares (1266,9 mg) como para os apicais (1287,2 mg), foram significativamente maiores do que os obtidos no período de cultivo de quatro semanas de cultivo (859,2 mg e 658,9 mg, respectivamente).

Em termos de massa seca, verifica-se que, no período de cultivo de quatro semanas, a massa seca dos calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares (33,9 mg) foi superior ao valor observado para os calos obtidos a partir de segmentos nodais foliares (27,4 mg). No período de cultivo de oito semanas, os valores de massa seca dos calos, tanto para os iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares como foliares, foram superiores (60,3 mg e 59,2 mg, respectivamente) e estatisticamente diferentes dos valores de massa seca obtidos na quarta semana de cultivo.

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de razão massa seca/massa fresca dos calos originados a partir do cultivo de segmentos nodais cotiledonares ou foliares, em nenhum dos períodos de cultivo avaliados. Entretanto, para os segmentos nodais cotiledonares, valor maior de razão massa seca/massa fresca dos calos (0,050 mg) foi observado com oito semanas de cultivo, em relação ao período de quatro semanas de cultivo. No caso dos calos originados a partir de segmentos nodais foliares não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de razão massa seca/massa fresca, para os períodos de cultivo de quatro ou de oito semanas.

Para os parâmetros teor de água, em miligramas por unidade de massa seca, e em porcentagem da massa fresca, observa-se que não houve diferença significativa entre os valores obtidos para os calos originados a partir de segmentos nodais cotiledonares ou foliares, em nenhum dos períodos de cultivo. Entretanto, no período de cultivo de oito semanas os teores de água dos calos, tanto dos oriundos de segmentos nodais cotiledonares como foliares, foram menores (19,7 mg de água/mg de massa seca e 94,9%, e 20,1 mg de água/mg de massa seca e 94,9%, respectivamente) em relação ao período de cultivo de quatro semanas.

Tabela 4. Efeito de tipos de explantes e de períodos de cultivo sobre o crescimento e o teor de água de calos de *Cedrela fissilis* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP e 5 μ M de ANA.

Tipo de Explante	Tempo (semanas) ^a		Média
	4	8	
MF (mg)			
Nó cotiledonar	859,2 Aa	1266,9 Ab	1063,1 A
Nó foliar	658,9 Aa	1287,2 Ab	999,3 A
Média	774,5 a	1276,4 b	
MS (mg)			
Nó cotiledonar	33,9 Ba	60,3 Ab	47,1 A
Nó foliar	27,4 Aa	59,2 Ab	44,6 A
Média	31,1 a	59,8 b	
Razão MS/MF			
Nó cotiledonar	0,041 Aa	0,050 Ab	0,045 A
Nó foliar	0,043 Aa	0,051 Aa	0,047 A
Média	0,042 a	0,050 b	
Teor de água (mg de água/ mg MS)			
Nó cotiledonar	23,9 Ab	19,7 Aa	21,8 A
Nó foliar	22,5 Aa	20,1 Aa	21,2 A
Média	23,3 b	19,9 a	
Teor de água (% MF)			
Nó cotiledonar	95,9 Ab	94,9 Aa	95,4 A
Nó foliar	95,6 Ab	94,9 Aa	95,2 A
Média	95,8 b	94,9 a	

^aMédias de no mínimo onze repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.1.3. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*.

A **Tabela 5** apresenta os resultados do experimento conduzido para avaliar o efeito das diferentes concentrações de ANA e de BAP, utilizadas isoladamente ou em combinação, sobre a indução e o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis*. Os resultados sobre a indução de calos indicam a formação de calos em 100% dos explantes inoculados, em todos os tratamentos. Nos tratamentos somente com ANA, nas concentrações de 2,5 e 5 μM , foram obtidos os valores significativamente menores de massa fresca (519,7 mg e 333,1 mg, respectivamente) e de massa seca (25,9 e 18,4 mg, respectivamente), em relação aos demais tratamentos. Os valores de massa fresca e de massa seca observados nos tratamentos apenas com 2,5 μM ou 5 μM de ANA não diferiram estatisticamente. Em termos de massa fresca observa-se que, o maior valor foi obtido no tratamento com 5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP (1914,1 mg). Este valor de massa fresca, entretanto foi significativamente superior aos obtidos nos demais tratamentos, mas similar, estatisticamente, ao valor observado quando foram utilizados 2,5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP (1422,1 mg), que por sua vez, não diferiram estatisticamente dos tratamentos com 2,5 μM de ANA e 5 μM de BAP (1387,6 mg) e do tratamento com 5 μM de ANA e 5 μM de BAP (1253,7 mg).

Os tratamentos com 2,5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP, 2,5 μM de ANA e 5 μM de BAP e 5 μM de ANA e 5 μM de BAP propiciaram os maiores valores de massa seca, respectivamente de 75,3 mg, 77,7 mg e de 67,9 mg. O valor obtido com 2,5 μM de ANA e 5 μM de BAP foi significativamente superior aos tratamentos apenas com ANA e ao tratamento com 5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP, enquanto que os valores obtidos

com 2,5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP e com 5 μM de ANA e 5 μM de BAP foram estatisticamente semelhantes ao tratamento com 5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP (60,7 mg).

O menor valor de razão massa seca/massa fresca dos calos foi verificado no tratamento com 5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP (0,038). Este valor não diferiu estatisticamente apenas do valor observado no tratamento com apenas 2,5 μM de ANA (0,051).

Valor significativamente superior de teor de água dos calos, em miligramas por unidade de massa seca foi obtido no tratamento com 5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP (33,5 mg de água/mg de massa seca). O maior valor de teor de água, em termos de porcentagem da massa fresca foram detectados em calos produzidos no mesmo tratamento citado anteriormente (96,2%), sendo que este valor não diferiu significativamente do obtido no tratamento com apenas 2,5 μM de ANA (94,9%).

Tabela 5. Efeito de BAP e ANA sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares e cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, por 8 semanas na luz.

ANA (μ M)	BAP (μ M)	Formação de calos (%)	MF (mg) ^a	MS (mg) ^a	Teor de água (mg água/mg MS) ^a	Razão MS/MF ^a	Teor de água (% MF) ^a
2,5	0	100	519,7 a	25,9 a	19,2 a	0,051 ab	94,9 ab
5	0	100	333,1 a	18,4 a	17,4 a	0,056 b	94,5 a
2,5	2,5	100	1422,1 bc	75,3 bc	17,5 a	0,058 b	94,2 a
2,5	5	100	1387,6 b	77,7 c	16,5 a	0,059 b	94,1 a
5	2,5	100	1914,1 c	60,7 b	33,5 b	0,038 a	96,2 b
5	5,0	100	1253,7 b	67,9 bc	17,7 a	0,055 b	94,5 a

^aMédias de no mínimo 10 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.1.4. Efeito de diferentes fontes de carbono e de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*.

A **Tabela 6** apresenta os resultados do experimento realizado para avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono e de períodos de cultivo sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*, obtidos a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 5,0 μM de ANA e 2,5 μM de BAP e com 58,4 μM de sacarose ou glicose ou frutose. Os resultados indicam que houve interação significativa entre os fatores fontes de carbono e períodos de cultivo, para os parâmetros massa fresca e massa seca. O maior valor de massa fresca dos calos (1843,4 mg) foi obtido em sacarose com oito semanas de cultivo. Este valor foi significativamente superior em relação aos demais tratamentos. Os valores de massa fresca dos calos cultivados por quatro semanas, em sacarose, glicose e frutose não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, sendo, respectivamente, de 829,9 mg, 562,9 mg e 558,9 mg. Na oitava semana de cultivo os calos crescidos na presença de glicose apresentaram valor de massa fresca de 1117,3 mg, estatisticamente semelhante aos crescidos em frutose (1267,9 mg) e aos crescidos na presença de sacarose com quatro semanas de cultivo (829,9 mg).

Em termos de massa seca, o valor significativamente maior em relação aos demais tratamentos foi o obtido para os calos cultivados por oito semanas em sacarose (63,4 mg). Os valores de massa seca apresentados pelos calos crescidos na presença de glicose (32,7 mg) e frutose (35,9 mg), por oito semanas foram estatisticamente superiores aos verificados no período de quatro semanas (21,4 mg e 17,1 mg, respectivamente), mas semelhantes ao valor verificado em sacarose com quatro semanas de cultivo (33,6 mg).

Tabela 6. Efeito de fontes de carbono e do período de cultivo sobre o crescimento e teor de água de culturas de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP, 5 μ M de ANA e com 58,4 mM de sacarose, glicose ou frutose.

Fatores	Níveis	MF (mg) ^{a*}	MS (mg) ^{a*}	Teor de água (mg água/mg MS) ^a	Razão MS/MF ^a	Teor de água (% MF) ^a
Tempo (semanas)	4	650,6 a	24,2 a	26,4 a	0,038 a	96,2 a
	8	1399,7 b	43,6 b	31,6 b	0,034 a	96,7 a
Fontes de carbono	sacarose	1319,0 b	48,0 b	25,4 a	0,041 b	96,0 a
	glicose	840,1 a	27,1 a	29,1 ab	0,035 ab	96,5 ab
	frutose	913,4 a	26,8 a	32,4 b	0,031 a	96,9 b
Interação						
Fontes de carbono x Tempo						
	Sacarose 4 semanas	829,9 ab	33,6 b	23,7	0,041	95,9
	Sacarose 8 semanas	1843,4 d	63,4 c	27,3	0,040	96,0
	Glicose 4 semanas	562,9 a	21,4 a	25,1	0,039	96,1
	Glicose 8 semanas	1117,3 bc	32,7 b	33,0	0,032	96,8
	Frutose 4 semanas	558,9 a	17,1 a	30,3	0,033	96,7
	Frutose 8 semanas	1267,9 c	35,9 b	34,4	0,029	97,1

^aMédias de pelo menos quinze repetições seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$) ou com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * = interação significativa; MF= massa fresca; MS= massa seca.

A **Tabela 7** mostra os valores de razão massa seca/massa fresca e de teores de água dos calos crescidos nas diferentes fontes de carbono, por diferentes períodos de tempo. As análises estatísticas conduzidas, considerando o efeito de cada fator, fontes de carbono e períodos de cultura, isoladamente, para os parâmetros que não apresentaram interação significativa, pela análise de variância multifatorial, indicam que, na quarta semana de cultivo o valor de razão massa seca/massa fresca dos calos foi significativamente superior (0,041) em sacarose, da mesma forma que na oitava semana de cultivo (0,040). Entretanto, o maior valor observado na oitava semana de cultivo com a sacarose não diferiu estatisticamente do valor verificado com a glicose (0,032), no mesmo período de cultivo, o qual, por sua vez, não diferiu do valor obtido em frutose (0,029). Na presença de sacarose não houve diferença estatística significativa entre os valores de razão massa seca/massa fresca obtidos nos períodos de cultivo de quatro e de oito semanas. Entretanto, para a glicose e frutose, foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os períodos de cultivo, sendo os valores obtidos na oitava semana de cultivo (0,032 e 0,029, respectivamente) menores do que os observados na quarta semana de cultivo (0,039 e 0,033, respectivamente).

Em relação ao teor de água, em miligramas de água por unidade de massa seca, observa-se que, na quarta semana de cultivo, o valor observado para os calos crescidos na presença de frutose foi significativamente maior (30,3 mg de água/mg de massa seca) do que os obtidos para os calos crescidos na presença de sacarose e glicose, que não foram significativamente diferentes entre si (23,7 mg de água/mg de massa seca e 25,1 mg de água/mg de massa seca, respectivamente). No período de cultivo de oito semanas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos nas três diferentes fontes de carbono. Entretanto, os calos cultivados por oito semanas

nas três diferentes fontes de carbono, apresentaram valores significativamente superiores de teores de água, de 27,3 mg de água/mg de massa seca, em sacarose, 33,0 mg de água/mg de massa seca, em glicose e de 34,4 mg de água/mg de massa seca, em frutose). Os valores de teor de água, em porcentagem da massa fresca, foram significativamente diferentes, dependendo da fonte de carbono utilizada. Tanto na quarta como na oitava semanas de cultivo, os valores obtidos para a frutose, de 96,7% e de 97,1%, respectivamente, foram superiores. Na quarta semana de cultivo o valor obtido para a frutose foi significativamente diferente em relação aos demais tratamentos, enquanto que na oitava semana de cultivo o valor obtido para a frutose foi estatisticamente semelhante ao obtido na presença de glicose. Diferenças estatísticas significativas, entre os períodos de cultivos, foram observadas para os valores de teor de água, em porcentagem da massa fresca dos calos produzidos em glicose e frutose, mas não em sacarose. Verifica-se que, em glicose e frutose os teores de água, na oitava semana de cultivo, foram respectivamente de 96,8% e de 97,1%, superiores aos obtidos na quarta semana de cultivo, com as mesmas fontes de carbono.

Tabela 7. Efeito de fontes de carbono e do período de cultivo sobre a razão massa seca/massa fresca e o teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP, 5 μ M de ANA e com 58,4 mM de sacarose, glicose ou frutose.

Fontes de carbono	Tempo (semanas) ^a		Média
	4	8	
Razão MS/MF			
Sacarose	0,041 Ba	0,040 Ba	0,039 B
Glicose	0,039 Ab	0,032 ABa	0,035 AB
Frutose	0,033 Ab	0,029 Aa	0,031 A
Média	0,038 a	0,034 a	
Teor de água (mg de água/mg MS)			
Sacarose	23,7 Aa	27,3 Ab	28,6 A
Glicose	25,1 Aa	33,0 Ab	29,1 A
Frutose	30,3 Ba	34,4 Ab	32,4 A
Média	26,4 a	31,6 b	
Teor de água (% MF)			
Sacarose	95,9 Aa	96,0 Aa	96,1 A
Glicose	96,1 Aa	96,8 ABb	96,5 AB
Frutose	96,7 Ba	97,1 Bb	96,9 B
Média	96,2 a	96,7 b	

^aMédias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

A **Tabela 8** apresenta as taxas de variação no crescimento e no teor de água, em intervalos de quatro semanas, de calos de *Cedrela fissilis* produzidos a partir do cultivo de segmentos nodais cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5,0 μM de ANA e 58,4 μM de sacarose ou glicose ou frutose. A análise de variância multifatorial indicou interação significativa entre os fatores intervalos de tempo e fontes de carbono, apenas para o parâmetro teor de água, em miligramas de água por unidade de massa seca. Observa-se que, os valores significativamente maiores de teor de água, em relação aos demais tratamentos, foram obtidos em sacarose (23,6 mg de água/mg de massa seca), glicose (25,1 mg de água/mg de massa seca) e frutose (30,3 mg de água/mg de massa seca) no intervalo de 0-4 semanas de cultivo, sendo que estes valores foram estatisticamente semelhantes entre si.

A **Tabela 9** apresenta os valores obtidos para os parâmetros massa fresca, massa seca e razão massa seca/massa fresca dos calos crescidos nas diferentes fontes de carbono, por diferentes intervalos de tempo. As análises estatísticas conduzidas considerando os efeitos isolados dos fatores intervalos de tempo e fontes de carbono indicaram que, em termos de massa fresca, a sacarose, no intervalo de 0-4 semanas de cultivo, promoveu aumento significativo, de 853,8 mg, em relação às demais fontes de carbono, enquanto que não foram detectadas diferenças significativas entre as fontes de carbono para o intervalo de 4-8 semanas, sendo que os valores variaram de 554,3 mg (para a glicose) a 989,6 mg (para a sacarose). Os resultados também mostram que em nenhuma das fontes de carbono utilizadas foram observadas diferenças entre as taxas de variação em massa fresca nos intervalos de tempo analisados.

Em termos de massa seca verifica-se que os valores das taxas de variação obtidos em sacarose foram significativamente superiores em relação à glicose e à

frutose, tanto no intervalo de 0-4 semanas (34,6 mg) como no intervalo de 4-8 semanas (28,7 mg) de cultivo. Os valores observados para a glicose e frutose foram estatisticamente similares em ambos os intervalos estudados. Apenas para a glicose, a taxa de variação em massa seca foi maior no intervalo de 0-4 semanas (21,4 mg) do que no intervalo de 4-8 semanas (11,5 mg). Para a sacarose, as taxas de variação em massa seca foram, respectivamente, de 34,6 mg e 28,7 mg e para a frutose os valores foram de 17,7 mg e de 18,1 mg, respectivamente.

No intervalo de 0-4 semanas de cultivo, as maiores taxas de variação da razão massa seca/massa fresca dos calos foram verificadas para sacarose (0,041) e glicose (0,039). Estes valores foram estatisticamente diferentes do observado para a frutose (0,033), mas foram estatisticamente semelhantes entre si. No intervalo de 4-8 semanas de cultivo não foram detectadas diferenças significativas nas taxas de variação da razão massa seca/massa fresca, entre as fontes de carbono. Em todas as fontes de carbono, os valores das taxas de variação da razão massa seca/massa fresca dos calos foram significativamente superiores no intervalo de 0 – 4 semanas, em relação ao intervalo de 4-8 semanas de cultivo. Em todas as fontes de carbono, os valores das taxas de variação da razão massa seca/massa fresca dos calos foram negativos no intervalo de 4-8 semanas, indicando que, em todas as fontes de carbono ocorreu diminuição nos valores absolutos de razão massa seca/massa fresca dos calos, em relação ao período de quatro semanas de cultivo.

Em relação às taxas de variação no teor de água dos calos crescidos em diferentes fontes de carbono por diferentes intervalos de tempo, as análises estatísticas conduzidas com cada fator (intervalos de tempo e fontes de carbono), isoladamente, indicaram que, no intervalo de 0-4 semanas, a taxa de variação no teor de água, em

miligramas, dos calos crescido na presença de sacarose (819,1 mg) foi significativamente maior do que as verificadas com a glicose (541,5 mg) e a frutose (541,1 mg) (**Tabela 10**).

No intervalo de 4-8 semanas de cultivo, entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores obtidos nas diferentes fontes de carbono. Os resultados também indicam não ter havido, em nenhuma das fontes de carbono estudadas, diferenças significativas entre os valores das taxas de variação no teor de água em miligramas, obtidos para os intervalos de 0-4 semanas e de 4-8 semanas de cultivo. Em termos das taxas de variação do teor de água em miligramas de água por unidade de massa seca dos calos, verifica-se no intervalo de 0-4 semanas que, na presença de frutose o valor foi maior (30,3 mg de água/mg de massa seca) do que os observados na presença de sacarose (23,6 mg de água/mg de massa seca) e glicose (25,1mg de água/mg de massa seca). Os valores obtidos para a sacarose e glicose foram estatisticamente similares. No intervalo de 4-8 semanas, contudo, não foram verificadas diferenças significativas entre as fontes de carbono, porém, em cada fonte de carbono o valor obtido neste período foi significativamente menor do que o verificado no intervalo de 0-4 semanas. Assim, neste intervalo os valores das taxas de variação no teor de água obtidos foram de 3,7 mg de água/mg de massa seca, para a sacarose, de 7,8 mg de água/mg de massa seca, para a glicose, e de 4,0 mg de água/mg de massa seca, para a frutose. Em relação ao teor de água em porcentagem da massa fresca, observa-se que o valor maior do que os observados nos demais tratamentos foi obtido com a frutose (96,7%), no intervalo de 0-4 semanas. No intervalo de 4-8 semanas as taxas de variação no teor de água, em porcentagem, não diferiram entre as fontes de carbono, mas, em todas as fontes de carbono foram inferiores às verificadas no intervalo de 0-4 semanas, sendo as diferenças significativas.

Tabela 8. Efeito de fontes de carbono e de intervalos de períodos de cultivo sobre as variações no crescimento e teor de água de culturas de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP, 5 μ M de ANA e com 58,4 mM de sacarose, glicose ou frutose.

Fatores	Níveis	MF (mg) ^a	MS (mg) ^a	Teor de água (mg água/mg MS) ^{a*}	Razão MS/MF ^a	Teor de água (% MF) ^a	Teor de água (mg) ^a
Intervalos de tempo (semanas)	0-4	654,1 a	24,4 b	26,4 b	0,038 b	96,3 b	629,7 a
	4-8	745,6 a	19,2 a	5,2 a	-0,004 a	0,40 a	737,4 a
Fontes de carbono	sacarose	921,7 b	31,7 b	13,6 a	0,020 a	48,0 a	907,4 b
	glicose	558,6 a	16,4 a	16,5 a	0,016 a	48,4 a	616,0 a
	frutose	634,0 b	17,9 a	17,2 a	0,014 a	48,6 a	542,2 a
Interação							
Fontes de carbono x Intervalos de tempo							
	Sacarose 0-4 semanas	853,8	34,6	23,6 b	0,041	95,9	819,1
	Sacarose 4-8 semanas	989,6	28,7	3,7 a	-0,0009	0,09	995,6
	Glicose 0-4 semanas	562,9	21,4	25,1 b	0,039	96,1	541,5
	Glicose 4-8 semanas	554,3	11,5	7,8 a	-0,0074	0,74	542,9
	Frutose 0-4 semanas	558,9	17,7	30,3 b	0,033	96,7	541,1
	Frutose 4-8 semanas	709,1	18,1	4,0 a	-0,0037	0,37	690,9

^aMédias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$) ou com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * = interação significativa; MF= massa fresca; MS= massa seca.

Tabela 9. Efeito de fontes de carbono e de intervalos de períodos de cultivo sobre as variações no crescimento de culturas de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP, 5 μ M de ANA e com 58,4 mM de sacarose, glicose ou frutose.

Fontes de carbono	Intervalos de tempo (semanas) ^a		Média
	0-4	4-8	
MF (mg)			
Sacarose	853,8 Ba	989,6 Aa	921,7 B
Glicose	562,9 Aa	554,3 Aa	558,6 A
Frutose	558,9 Aa	709,1 Aa	634,0 B
Média	654,1 a	745,6 a	
MS (mg)			
Sacarose	34,6 Ba	28,7 Ba	31,7 B
Glicose	21,4 Ab	11,5 Aa	16,4 A
Frutose	17,7 Aa	18,1 Aa	17,9 A
Média	24,4 b	19,2 a	
Razão MS/MF			
Sacarose	0,041 Bb	0,030 Aa	0,035 A
Glicose	0,039 Bb	0,020 Aa	0,029 A
Frutose	0,033 Ab	0,025 Aa	0,029 A
Média	0,038 b	-0,0040 a	

^aMédias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

Tabela 10. Efeito de fontes de carbono e de intervalos de períodos de cultivo sobre as variações, no decorrer do tempo, do teor de água de culturas de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP, 5 μ M de ANA e com 58,4 mM de sacarose, glicose ou frutose.

Fontes de carbono	Intervalos de tempo (semanas) ^a		Média
	0-4	4-8	
Teor de água (mg)			
Sacarose	819,1 Ba	995,6 Aa	907,4 B
Glicose	541,5 Aa	542,9 Aa	542,2 A
Frutose	541,1 Aa	690,9 Aa	616,0 A
Média	629,7 a	737,4 a	
Teor de água (mg água/mg MS)			
Sacarose	23,6 Ab	3,7 Aa	13,6 A
Glicose	25,1 Ab	7,8 Aa	16,5 A
Frutose	30,3 Bb	4,0 Aa	17,2 A
Média	26,4 b	5,2 a	
Teor de água (% MF)			
Sacarose	95,9 Ab	0,086 Aa	48,0 A
Glicose	96,1 Ab	0,74 Aa	48,4 A
Frutose	96,7 Bb	0,37 Aa	48,6 A
Média	96,3 b	0,40 a	

^aMédias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.1.5. Efeito de diferentes concentrações de sacarose e glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*.

A Tabela 11 apresenta os resultados do experimento realizado para estudar o efeito de diferentes concentrações de sacarose (58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM) e de glutamina (0 e 2,73 mM) sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2,5 μ M de BAP e 5,0 μ M de ANA. A análise de variância multifatorial indicou interação significativa entre os fatores concentrações de glutamina e de sacarose, para todos os parâmetros avaliados. O maior valor de massa fresca ocorreu com sacarose na concentração 58,4 mM e na ausência de glutamina. Este valor, de 1759,5 mg, foi estatisticamente diferente em relação aos demais tratamentos. Os menores valores de massa seca foram obtidos com 58,4 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina, com 87,6 mM de sacarose e ausência de glutamina e com 116,8 mM, na ausência ou presença de glutamina. Entretanto, o valor observado com 116,8 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina não diferiu significativamente do valor obtido com 87,6 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. Os valores de massa seca obtidos nestes tratamentos foram estatisticamente semelhantes e variaram de 558,5 mg a 947,2 mg.

Os maiores valores de massa seca dos calos foram verificados nos tratamentos com 116,8 mM de sacarose e ausência de glutamina (82,1 mg), 87,6 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina (73,5 mg) e 58,4 mM de sacarose e ausência de glutamina (72,3 mg). O valor obtido com 116,8 mM de sacarose e ausência de glutamina foi estatisticamente diferente dos tratamentos com sacarose 58,4 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina, 87,6 mM de sacarose e ausência de glutamina e 116,8 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. Valores menores de massa seca dos calos foram

observados nos tratamentos com 58,4 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina e 87,6 mM de sacarose e ausência de glutamina, sendo este último valor estatisticamente semelhante ao observado com 116,8 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. Nas concentrações de 58,4 mM e de 116,8 mM de sacarose, a presença de glutamina inibiu significativamente o crescimento (45,4 mg e 63,6 mg, respectivamente), em relação aos tratamentos com as mesmas concentrações de sacarose mas sem glutamina (72,3 mg e 82,1 mg, respectivamente). Apenas na concentração de sacarose de 87,6 mM, a presença de glutamina promoveu o aumento em massa seca dos calos (73,5 mg), em relação ao tratamento com a mesma concentração de sacarose, mas sem glutamina (49,1 mg), sendo a diferença significativa.

Os valores maiores de razão massa seca/massa fresca dos calos, de 0,091, 0,093 e 0,094 foram obtidos, respectivamente, nos tratamentos com 87,6 mM de sacarose e ausência de glutamina, com 116,8 mM de sacarose e ausência de glutamina e com 116,8 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. O menor valor de razão massa seca/massa fresca dos calos (0,044), estatisticamente diferente dos demais tratamentos, foi observado com 58,4 mM de sacarose e ausência de glutamina.

Em termos do teor de água dos calos, em miligramas por unidade de massa seca, observa-se que o maior valor, de 23,3 mg de água/mg de massa seca foi obtido no tratamento com 58,4 mM de sacarose e ausência de glutamina, tratamento este que também propiciou o maior teor de água, em termos de porcentagem da massa fresca, 95,6%. Estes valores diferiram significativamente dos obtidos nos demais tratamentos. Os menores valores de teor de água dos calos foram observados nos tratamentos com 87,6 mM de sacarose e ausência de glutamina (10,2 mg de água/mg de massa seca e 90,9%) e com 116,8 mM de sacarose e ausência de glutamina (10,2 mg de água/mg de

massa seca e 90,7%) ou com 2,73 mM de glutamina (9,8 mg de água/mg de massa seca e 90,6%). Contudo, em relação ao teor de água em miligramas por unidade de massa seca, os valores obtidos nestes tratamentos não diferiram significativamente do valor obtido com 58,4 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina.

Tabela 11. Efeito de concentrações de sacarose e de glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA, após 8 semanas.

Fatores	Níveis	MF (mg) ^{a*}	MS (mg) ^{a*}	Teor de água (mg água/mg MS) ^{a*}	Razão MS/MF ^{a*}	Teor de água (% MF) ^{a*}
Glutamina (mM)	0	1088,4 a	67,8 b	14,5 a	0,076 a	92,4 a
	2,73	887,2 a	60,8 a	13,0 a	0,077 a	92,3 a
Sacarose (mM)	58,4	1233,4 b	58,8 a	18,4 b	0,059 a	94,1 c
	87,6	900,5 ab	61,3 ab	12,8 a	0,077 b	92,3 b
	116,8	827,5 a	73,1 b	10,0 a	0,094 c	90,6 a
Interação						
Sacarose x Glutamina						
Sacarose 58,4 mM + Glutamina 0 mM		1759,5 c	72,3 cd	23,3 c	0,044 a	95,6 c
Sacarose 58,4 mM + Glutamina 2,73 mM		707,3 a	45,4 a	13,5 ab	0,074 b	92,6 b
Sacarose 87,6 mM + Glutamina 0 mM		558,5 a	49,1 ab	10,2 a	0,091 c	90,9 a
Sacarose 87,6 mM + Glutamina 2,73 mM		1242,5 b	73,5 cd	15,4 b	0,063 b	93,7 b
Sacarose 116,8 mM + Glutamina 0 mM		947,2 ab	82,1 d	10,2 a	0,093 c	90,7 a
Sacarose 116,8 mM + Glutamina 2,73 mM		699,1 a	63,6 bc	9,8 a	0,094 c	90,6 a

^aMédias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$) ou com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * = interação significativa; MS = massa seca; MF = massa fresca.

5.1.6. Efeito da presença e ausência de luz e de períodos de cultivo sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

A **Tabela 12** apresenta os resultados do experimento realizado para avaliar o efeito da presença e ausência de luz e dos períodos de cultivo sobre o crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA. A análise multifatorial indicou interação significativa entre os fatores presença e ausência de luz e períodos de cultivo, para os parâmetros massa fresca, teor de água, em miligramas por unidade de massa seca, razão massa seca/massa fresca e teor de água, em porcentagem da massa fresca dos calos. Verifica-se que, os maiores valores de massa fresca dos calos foram obtidos em luz (1266,9 mg) e escuro (1474,7 mg) com oito semanas de cultivo. Estes valores não diferiram significativamente entre si, mas foram estatisticamente significativos em relação aos demais tratamentos. O menor valor de massa fresca dos calos (492,9 mg) foi observado quando os calos foram crescidos no escuro com quatro semanas de cultivo. Este valor diferiu significativamente do obtido quando os calos, com quatro semanas, foram cultivados na presença de luz (859,2 mg).

Os maiores valores de teor de água, em miligramas por unidade de massa seca, foram encontrados em calos cultivados no escuro por oito semanas (27,9 mg de água/mg de massa seca) e na luz, por quatro semanas (23,9 mg de água/mg de massa seca). O valor obtido no escuro com oito semanas foi significativamente superior aos valores obtidos na luz com oito semanas e no escuro com quatro semanas, mas o valor obtido na luz com quatro semanas foi estatisticamente semelhante a todos os demais tratamentos. O menor valor para o teor de água (19,7 mg de água/mg de massa seca) foi

encontrado em calos com oito semanas, cultivados na presença de luz, sendo este valor estatisticamente semelhante ao obtido no escuro, com quatro semanas. Os calos que apresentaram os maiores teores de água, em porcentagem da massa fresca, foram os crescidos por quatro semanas na luz e por oito semanas no escuro (95,9% e 96,4%, respectivamente). O valor obtido para oito semanas no escuro diferiu significativamente dos demais tratamentos, enquanto que o valor obtido para quatro semanas na luz foi estatisticamente semelhante ao observado com quatro semanas no escuro.

Os calos cultivados por oito semanas na luz e por quatro semanas no escuro apresentaram os maiores valores de razão massa seca/massa fresca. Estes valores, respectivamente, de 0,050 e 0,045, foram estatisticamente semelhantes, sendo que o valor obtido na luz com oito semanas diferiu significativamente dos tratamentos de quatro semanas na luz e de oito semanas no escuro. O tratamento de quatro semanas no escuro não diferiu significativamente do tratamento com quatro semanas na luz.

A **Tabela 13** mostra os valores de massa seca obtidos para os calos crescido em luz ou escuro, por diferentes períodos de tempo. As análises estatísticas realizadas para avaliar os efeitos dos fatores presença e ausência de luz e dos períodos de cultivo, isoladamente, indicam que tanto com quatro como com oito semanas de cultivo, os valores de massa seca dos calos produzidos na luz foram significativamente superiores (33,9 mg e 60,3 mg, respectivamente) em relação aos valores obtidos quando os calos foram cultivados no escuro (22,1 mg e 50,9 mg, respectivamente). Os valores de massa seca observados no período de cultivo de oito semanas, tanto na luz (60,3 mg), como no escuro (50,9 mg), foram superiores aos valores observados no período de quatro semanas de cultivo (33,9 mg e 22,1 mg, respectivamente), sendo as diferenças estatísticas entre os valores significativas.

A **Tabela 14** apresenta os valores de crescimento e de teor de água de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados por nove semanas em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com BAP 2,5 μM e ANA 5,0 μM , na luz e no escuro. Observa-se que o valor maior em massa fresca, de 2609,3 mg, foi obtido em calos cultivados no escuro, enquanto que a maior massa seca, 67,8 mg, foi verificada em calos crescidos na luz. O maior valor de razão massa seca/massa fresca, de 0,033, também foi obtido em calos crescidos na luz e este valor diferiu significativamente daqueles cultivados no escuro. O maior teor de água dos calos, tanto em miligramas por unidade de massa seca (39,6 mg de água/mg de massa seca, com em porcentagem da massa fresca (97,4%) foi detectado em calos crescidos no escuro, e as diferenças em relação aos valores observados na luz foram significativas).

Tabela 12. Efeito da presença e ausência de luz e de períodos de cultivo sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP e 5 μ M de ANA.

Fatores	Níveis	MF (mg) ^{a*}	MS (mg) ^a	Teor de água (mg água/mg MS) ^{a*}	Razão MS/MF ^{a*}	Teor de água (% MF) ^{a*}
Luz	Luz	1063,1 a	47,1 b	21,8 a	0,045 b	95,4 a
	Escuro	983,8 a	36,5 a	24,7 b	0,040 a	95,9 b
Tempo (semanas)	4	676,0 a	27,9 a	22,63 a	0,043 a	95,7 a
	8	1370,8 b	55,6 b	23,8 a	0,043 a	95,7 a
Interação Luz x Tempo						
	Luz 4 semanas	859,2 b	33,9	23,9 ab	0,041 ab	95,9 bc
	Luz 8 semanas	1266,9 c	60,3	19,7 a	0,050 c	94,9 a
	Escuro 4 semanas	492,9 a	22,1	21,4 a	0,045 bc	95,4 ab
	Escuro 8 semanas	1474,7 c	50,9	27,9 b	0,035 a	96,4 c

^aMédias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$) ou com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * = interação significativa; MS = massa seca; MF = massa fresca.

Tabela 13. Efeito da presença e ausência de luz e de períodos de cultivo sobre o crescimento em massa seca (mg) de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP e 5 μ M de ANA.

Tratamentos	Tempo (semanas) ^a		Média
	4	8	
Luz	33,9 Ba	60,3 Bb	47,1 B
Escuro	22,1 Aa	50,9 Ab	36,5 A
Média	27,9 a	55,6 b	

^aMédias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de t de Student ($p \leq 0,05$).

Tabela 14. Efeito de luz e escuro sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados por 9 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μ M de BAP e 5 μ M de ANA.

Tratamentos	MF (mg) ^a	MS (mg) ^a	Teor de água (mg água/mg MS) ^a	Razão MS/MF ^a	Teor de água (% MF) ^a
Luz	2057,9 a	67,8 b	29,1 a	0,033 b	96,4 a
Escuro	2609,3 b	64,3 a	39,6 b	0,025 a	97,4 b

^aMédias de doze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.1.7. Efeito da idade das plântulas de *Cedrela fissilis* sobre o crescimento e teor de água de calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares

A **Tabela 15** mostra os resultados do experimento realizado para avaliar o efeito da idade das plântulas (cinco e dezoito semanas), cultivado in vitro na presença de luz, sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*, iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio Murashige & Skoog, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5,0 µM de ANA, na luz, por nove semanas. Verifica-se, que o maior valor de massa fresca dos calos, de 2057,9 mg, obtidos a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas com cinco semanas de idade foi maior e diferiu do valor observado para os calos produzidos, a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas de dezoito semanas. Em termos de massa seca, porém, verifica-se que os valores obtidos em ambos os tratamentos não diferiram estatisticamente, sendo os mesmos, respectivamente de 67,8 mg e 68,4 mg. O valor de razão massa seca/massa fresca dos calos obtidos de plântulas de dezoito semanas (0,046) foi superior e diferente do valor observado para os calos obtidos de plântulas de cinco semanas de idade. Os maiores teores de água dos calos, tanto em termos de miligrama por unidade de massa seca (29,1 mg de água/mg de massa seca) como em porcentagem da massa fresca (96,4%) foram detectados quando os mesmos foram originados a partir de plântulas de cinco semanas de idade. As diferenças entre estes valores e os obtidos com plântulas de dezoito semanas de idade foram significativas.

Tabela 15. Efeito da idade das plântulas e do período de cultivo sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados por 9 semanas, na luz, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA.

Idade das plântulas (semanas)	MF (mg)^a	MS (mg)^a	Teor de água (mg água/mg MS)^a	Razão MS/MF^a	Teor de água (% MF)^a
5	2057,9 b	67,8 a	29,1 b	0,036 a	96,4 b
18	1535,2 a	68,4 a	21,5 a	0,046 b	95,4 a

^aMédias de doze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de t de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.1.8. Efeito de diferentes períodos de cultivo sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas com 18-21 semanas de idade

A **Tabela 16** apresenta os resultados do experimento realizado para avaliar o efeito de diferentes períodos de cultivo (seis, nove e dez semanas) sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas com 18-21 semanas de idade. Os calos foram cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2,5 μM de BAP e 5,0 μM de ANA, na presença de luz. Os dados indicam que não foram detectadas diferenças significativas entre os três períodos de cultura para os parâmetros massa fresca, razão massa seca/massa fresca, teor de água, em miligramas de água por unidade de massa seca e teor de água, em porcentagem da massa fresca dos calos. Os valores variaram de 1535,2 mg a 1929,4 mg de massa fresca, de 0,037 a 0,046 de razão de massa seca/massa fresca, de 21,5 mg de água/mg de massa seca a 27,8 mg de água/mg de massa seca e de 95,4% a 96,2% de água. Para a massa seca, porém, verifica-se que os calos cultivados durante nove e dez semanas apresentaram valores significativamente maiores, de 68,4 mg e 77,2 mg, respectivamente, em relação aos cultivados por seis semanas (55,6mg).

Tabela 16. Efeito do período de cultivo sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares de plântulas com 18-21 semanas de idade e cultivados na luz, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA.

Período de cultura (semanas)	MF (mg)^a	MS (mg)^a	Teor de água (mg água/mg MS)^a	Razão MS/MF^a	Teor de água (% MF)^a
6	1624,6 a	55,6 a	27,8 a	0,037 a	96,2 a
9	1535,2 a	68,4 b	21,5 a	0,046 a	95,4 a
10	1929,4 a	77,2 b	24,0 a	0,042 a	95,7 a

^aMédias de doze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.2. Análise preliminar de óleos e essenciais de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados mostrados na **Tabela 17** indicam a presença de óleos essenciais nos calos de *Cedrela fissilis* produzidos, na luz, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA. O rendimento de óleos essenciais neste experimento foi de 1,17% da massa seca. Entretanto, estes resultados não se repetiram em dois outros experimentos subsequentes, em que foram utilizados calos produzidos nas mesmas condições de cultivo.

Tabela 17. Teores de óleos essenciais em calos de *Cedrela fissilis* produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados por 9 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA

Repetições	MS (g)	Teor de óleo (ml)	Teor de óleo (% MS)
1	7,2	0,09	1,25
2	7,49	0,09	1,20
3	6,57	0,07	1,07
Média \pm DP^a	7,09\pm0,47	0,08\pm0,012	1,17\pm0,093

^aMédias \pm desvio padrão de três repetições. MS = massa seca.

5.3. Análise dos constituintes voláteis de calos de *Cedrela fissilis* produzidos na luz e no escuro

Os cromatogramas obtidos da extração em fase sólida dos constituintes voláteis produzidos por calos cultivados por nove semanas, no escuro e na luz, no meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA são mostrados na **Figuras 1 e 2**. Observa-se que os cromatogramas apresentam perfis significativamente diferentes. Nos calos produzidos no escuro foram detectados sete compostos voláteis em quantidades significativas, com predominância do monoterpene linalol (representado pelo **Pico 4** da **Figura 1**). Já nos calos crescidos na luz, observou-se uma maior produção de metabólitos voláteis e foram identificados doze compostos, sendo o linalol (representado pelo **Pico 4** da **Figura 2**) o constituinte majoritário. Outros constituintes importantes como o 1,8-cineol (representado pelo **Pico 1** da **Figura 1 e 2**), cânfora (representado pelo **Pico 2** da **Figura 1 e 2**), 3-careno (representado pelo **Pico 3** da **Figura 1 e 2**) e fenol 2,6-bis (1,1-dimetil etil-4-metil) (representado pelo **Pico 6** da **Figura 1** e **Pico 10** da **Figura 2**) foram igualmente produzidos pelos calos cultivados na luz e no escuro. No entanto, os calos cultivados na luz produziram outros compostos, que não foram observados no escuro, tais como o tetradecano e o tetradecanol. O sesquiterpene germacreno foi observado na luz em proporções significativas (representado pelo **Pico 8** da **Figura 2**), não tendo sido, porém, detectado no material cultivado no escuro.

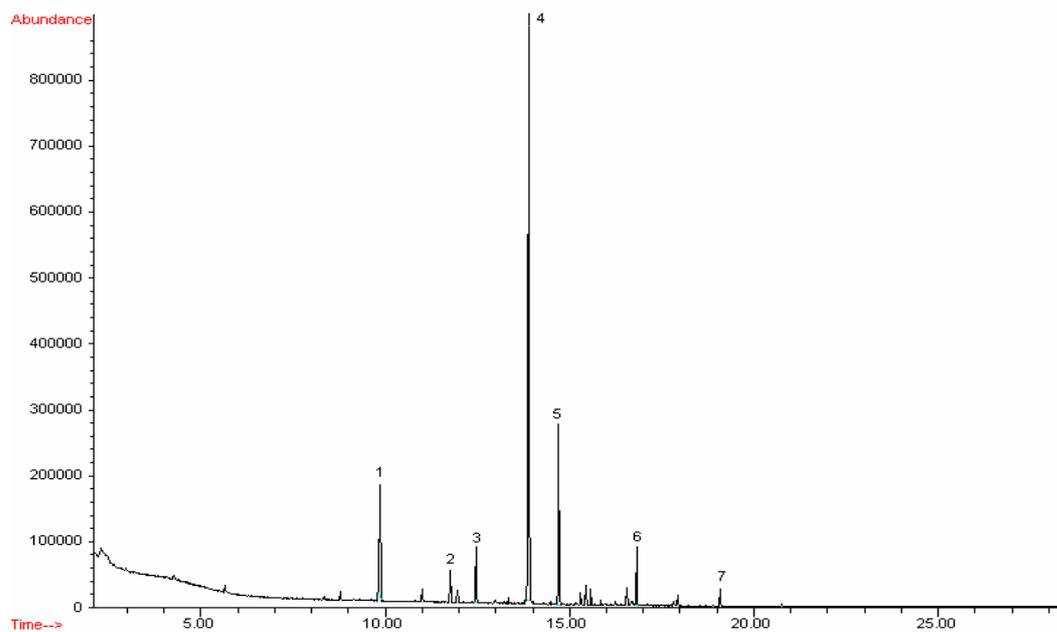


Figura 1. Cromatograma dos compostos voláteis obtidos por extração em fase sólida de calos de *Cedrela fissilis*, produzidos no escuro, a partir do cultivo, por nove semanas, de segmentos nodais cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 58,4 mM de sacarose, 2,5 μ M de BAP e 5 μ M de ANA.

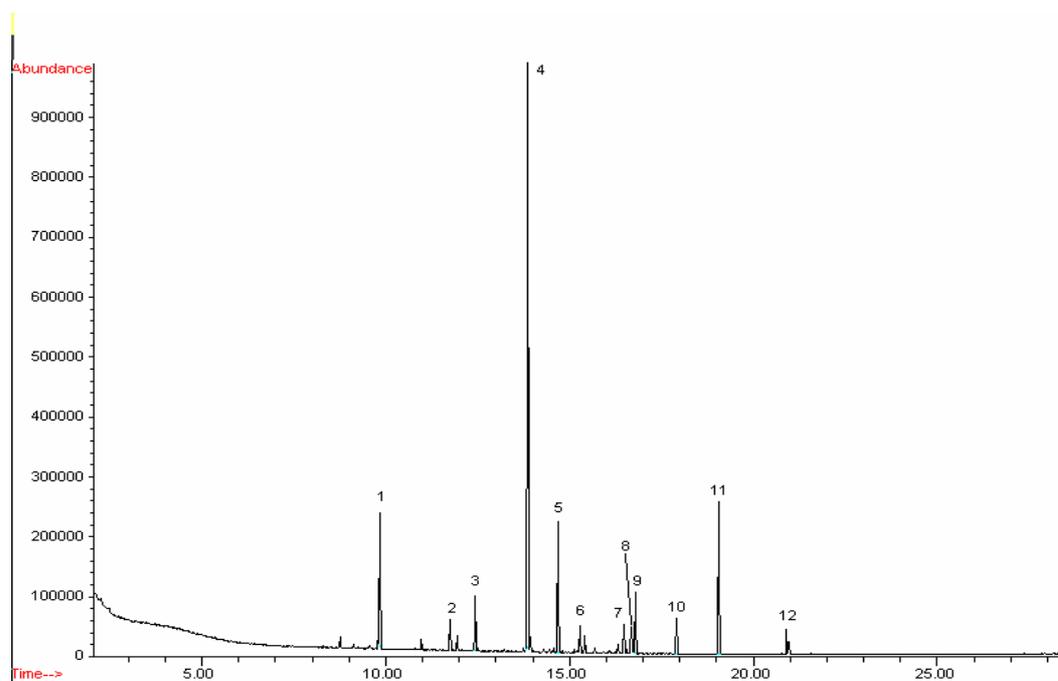


Figura 2. Cromatograma dos compostos voláteis obtidos por extração em fase sólida de calos de *Cedrela fissilis*, produzidos na luz, a partir do cultivo, por nove semanas, de segmentos nodais cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 58,4 mM de sacarose, 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA.

5.4. Conservação *ex situ* de *Cedrela fissilis*

5.4.1. Conservação *in vitro* de segmentos nodais foliares e apicais

A Tabela 18 mostra os resultados do experimento realizado para estudar o efeito de diferentes condições de armazenamento por seis semanas (5°C, escuro e 25°C, luz) de segmentos nodais foliares e apicais, sobre o crescimento e teor de água de calos de *Cedrela fissilis*. Os explantes foram cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2,5 µM de BAP e 5,0 µM de ANA, na presença de luz. A análise de variância multifatorial não indicou interação significativa entre os fatores tipo de explante e condição de armazenamento, para nenhum dos parâmetros analisados. As análises estatísticas conduzidas considerando o efeito de cada fator, tipo de explante e tipo de armazenamento, isoladamente indicam que, em termos de massa fresca e massa seca dos calos, não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes condições de armazenamento, tanto para os calos originados a partir de segmentos nodais foliares como para aqueles originados a partir de segmentos apicais. Os valores obtidos para os calos originados a partir de segmentos nodais foliares e apicais foram, respectivamente de 1188,3 mg de massa fresca (55,6 mg de massa seca) e 599,7 mg de massa fresca (38 mg de massa seca), quando os segmentos foram armazenados a 5°C no escuro, e de 849,7 mg massa fresca (46,5 mg de massa seca) e 643,7 mg de massa fresca (39,4 mg de massa seca), quando os mesmos foram armazenados a 25°C na luz. Apenas para o armazenamento a 5°C no escuro houve diferença estatística significativa entre os tipos de explantes, sendo os valores de massa fresca e massa seca obtidos para os calos produzidos a partir de segmentos nodais foliares superiores (1188,3 mg e 55,6 mg, respectivamente) aos observados para os segmentos apicais (599,7 mg e 38,0 mg).

Os valores de razão massa seca/massa fresca dos calos não diferiram significativamente nas diferentes condições de armazenamento, tanto para segmentos nodais foliares como para os apicais. Para os segmentos nodais foliares estes valores foram de 0,053 (5°C no escuro) e 0,058 (25°C na luz). Para os segmentos apicais os valores de razão massa seca/massa fresca dos calos foram, respectivamente de 0,070 e 0,062. Apenas na condição de armazenamento a 5°C no escuro é que foram detectadas diferenças significativas entre os explantes, sendo que os calos originados de segmentos apicais apresentam valor de razão massa seca/massa fresca significativamente maior (0,070) do que os originados a partir de segmentos nodais foliares (0,053), armazenados na mesma condição.

Tabela 18. Efeito do armazenamento de diferentes tipos de explantes *in vitro*, a 5°C e 25°C, por 6 semanas sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, por 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.

Tipo de Armazenamento	Tipos de explantes ^a		Média
	Nó foliar	Nó apical	
MF (mg)			
5°C, escuro	1188,3 Ab	559,7 Aa	988,3 A
25°C, luz	849,7 Aa	643,7 Aa	764,9 A
Média	1052,8 b	601,7 a	
MS (mg)			
5°C, escuro	55,6 Ab	38,0 Aa	50,0 A
25°C, luz	46,5 Aa	39,4 Aa	43,6 A
Média	52,0 b	38,7 a	
Razão MS/MF			
5°C, escuro	0,053 Aa	0,070 Ab	0,059 A
25°C, luz	0,058 Aa	0,062 Aa	0,059 A
Média	0,055 a	0,066 b	

^aMédias de no mínimo sete repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

Em termos do teor de água, em miligramas e em porcentagem da massa fresca dos calos observa-se, na **Tabela 19**, que não foram detectadas diferença significativa entre os tipos de armazenamento, para nenhum dos tipos de explante utilizados. Apenas na condição de armazenamento de 5°C no escuro, o teor de água dos calos originados de segmentos nodais foliares foi significativamente superior em relação aos originados a partir de segmentos apicais, tanto quando expresso em miligramas (1132,7 mg) como quando expresso em porcentagem da massa fresca (94,7%). Entretanto, os valores de teor de água dos calos, em miligramas por unidade de massa seca, diferiram estatisticamente entre os tipos de armazenamento, para os segmentos nodais foliares mas não para os segmentos apicais. O valor obtido a 5°C no escuro (19,2 mg de água/mg de massa seca) foi superior

em relação ao observado quando os segmentos nodais foliares foram armazenados a 25°C na luz (17,0 mg de água/mg de massa seca). Apenas na condição de armazenamento de 5°C no escuro o teor de água foi superior em calos produzidos a partir de segmentos nodais foliares (19,2 mg de água/mg de massa seca) do que naqueles originados a partir de segmentos apicais, armazenados na mesma condição (13,6 mg de água/mg de massa seca).

Tabela 19. Efeito do armazenamento de diferentes tipos de explantes *in vitro*, a 5°C e 25°C, por 6 semanas sobre o teor de água de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, por 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.

Tipo de Armazenamento	Tipos de explantes ^a		Média
	Nó foliar	Nó Apical	
Teor de água (mg)			
5°C, escuro	1132,7 Ab	521,7 Aa	938,3 A
25°C, luz	803,2 Aa	604,3 Aa	721,3 A
Média	1000,9 b	563,0 a	
Teor de água (mg de água/mg MS)			
5°C, escuro	19,2 Bb	13,6 Aa	17,4 A
25°C, luz	17,0 Aa	15,4 Aa	16,3 A
Média	18,3 b	14,5 a	
Teor de água (% MF)			
5°C, escuro	94,7 Ab	93,0 Aa	94,2 A
25°C, luz	94,2 Aa	93,8 Aa	94,0 A
Média	94,5 b	93,4 a	

^aMédias de no mínimo sete repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.4.2. Criopreservação de sementes zigóticas

5.4.2.1. Determinação do teor de água das sementes no início do experimento

Os dados da **Tabela 20** indicam que as sementes de *Cedrela fissilis* possuíam teor de água de 10 ± 0.37 % no início dos experimentos.

Tabela 20. Valores de massa fresca, massa seca e teor de água de três repetições de 25 sementes de *Cedrela fissilis*, após secagem em estufa a 103° C por 16 h.

Repetições	MF (mg)	MS (mg)	Teor de água (% MF)
1	669	602	10
2	686	622	9,3
3	718	640	11
Média \pm DP	691\pm25	621,3\pm19	10\pm0,4

^aMédias \pm desvio padrão de três repetições de 25 sementes, cada. MF = massa fresca; MS = massa seca.

5.4.2.2. Efeito do descongelamento rápido e descongelamento lento sobre a germinação

Na **Figura 3** são apresentadas as curvas de germinação de sementes que não foram criopreservadas (controle) ou que foram criopreservadas em nitrogênio líquido por 60 minutos e que foram submetidas ao descongelamento rápido ou ao descongelamento lento. Observa-se que, em todos os tratamentos, a germinação estabilizou-se no valor máximo, após 10 dias do início do experimento e que as análises estatísticas conduzidas no tempo de 6 dias e no tempo de 14 dias não indicaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os valores máximos de germinação alcançados aos quatorze dias do experimento foram de 92%, para o controle, 90,4%, para o descongelamento rápido e 85,6% de germinação, para o descongelamento lento.

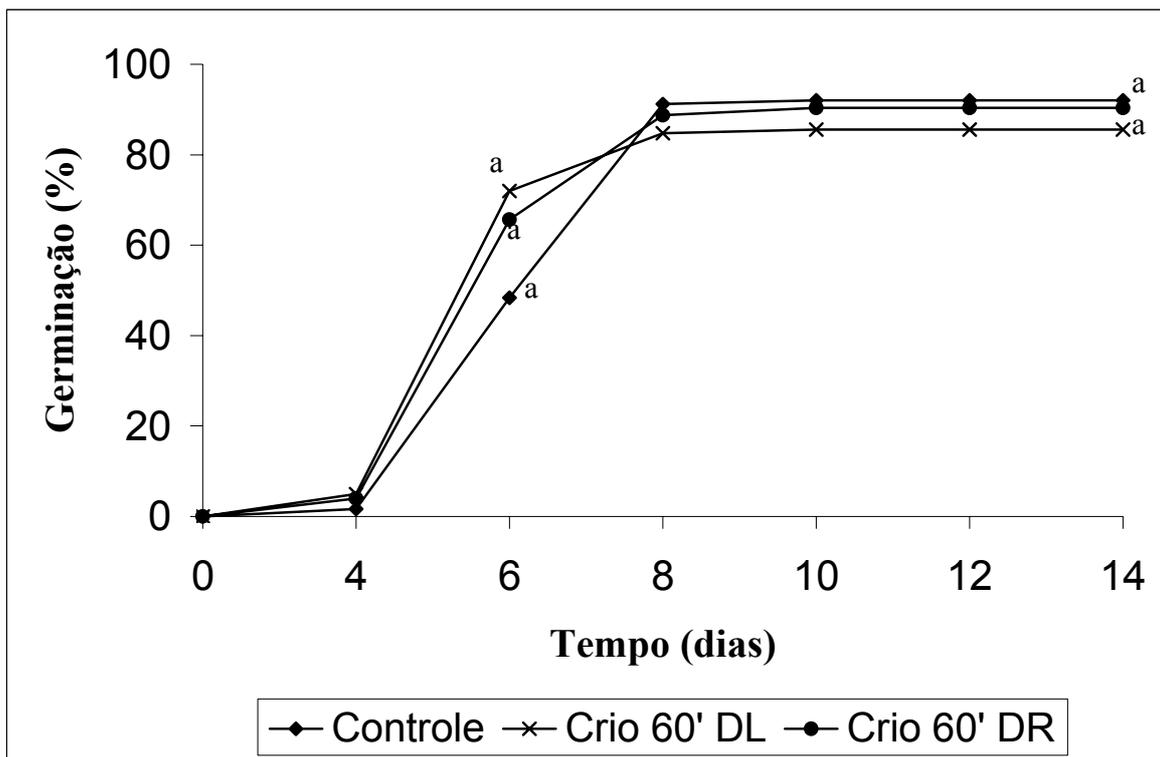


Figura 3. Curva de germinação de sementes de *Cedrela fissilis* não criopreservadas (controle) e criopreservadas por 60 minutos e submetidas ao descongelamento lento (Crio 60 DL) ou ao descongelamento rápido (Crio 60 DR). Letras similares não indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

5.4.2.3. Efeito do armazenamento após a criopreservação em temperatura ambiente ou em geladeira sobre a germinação

Na **Figura 4** são apresentadas as curvas de germinação de sementes que não foram criopreservadas (controle) e de sementes, que foram imersas em nitrogênio líquido por 60 minutos, submetidas ao descongelamento lento e em seguida armazenadas, por 1 e duas 2 semanas, em geladeira ou em temperatura ambiente. As análises estatísticas realizadas, para os tempos de 6 dias e de 14 dias não detectaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Em todos os tratamentos a germinação estabilizou-se nos valores máximos após 12 dias do início do experimento. Os valores máximos de germinação observados foram de 78,6%, para o controle, 92,1% para o armazenamento em temperatura ambiente por uma semana, 86,4%, para o armazenamento em geladeira por uma semana, 85,6 %, para o armazenamento em temperatura ambiente por duas semanas e de 80,8%, para o armazenamento em geladeira por duas semanas.

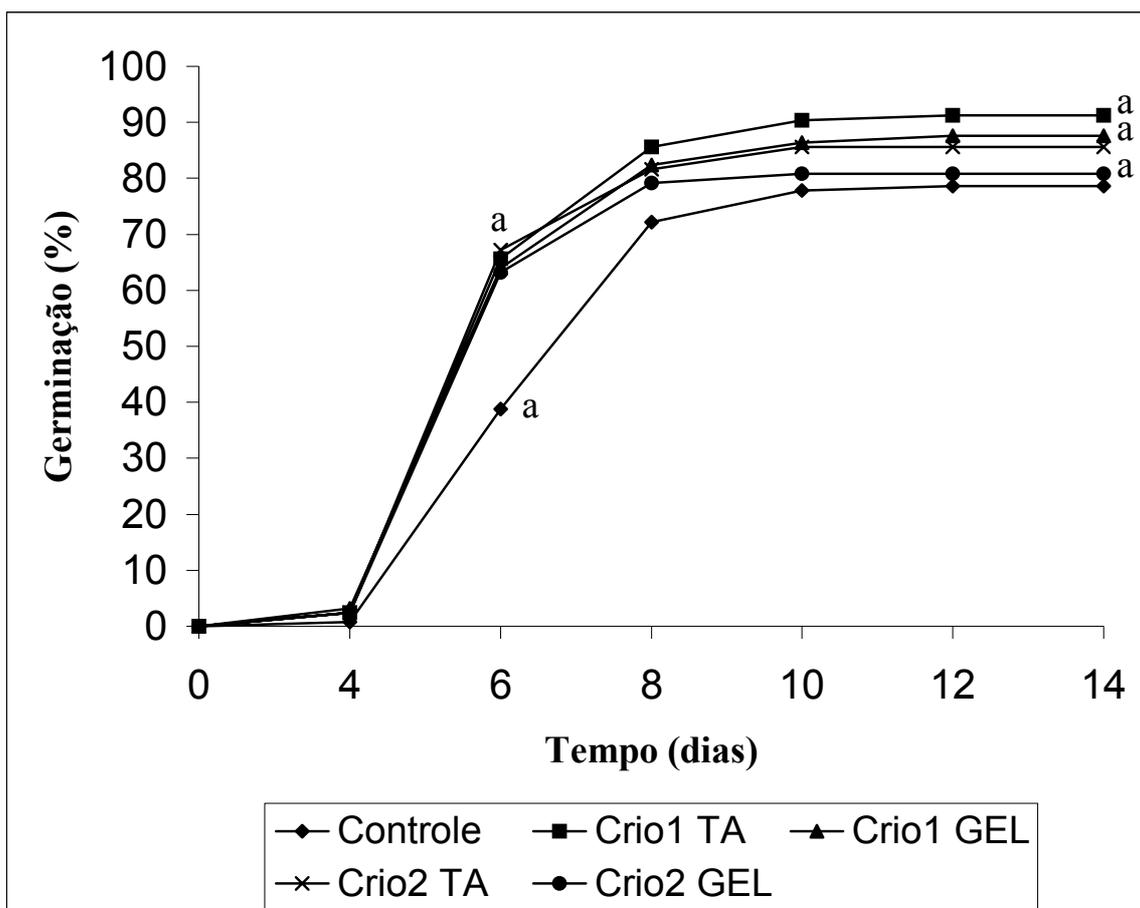


Figura 4. Curvas de germinação de sementes de *Cedrela fissilis* não criopreservadas (controle) e criopreservadas por 60 minutos, submetidas ao descongelamento rápido e armazenadas por uma semana em temperatura ambiente (Crio1 TA), por uma semana em geladeira (Crio1 GEL), por duas semanas em temperatura ambiente (Crio2 TA) e por duas semanas em geladeira (Crio2 GEL). Letras similares não indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

5.4.2.4. Efeito de períodos de armazenamento por 7, 11 e 15 meses em nitrogênio líquido sobre a germinação

Na **Tabela 21** estão apresentados os valores de porcentagem de germinação de sementes de *Cedrela fissilis* no início do experimento (período zero de armazenamento) ou que foram armazenadas por períodos de 7, 11 e 15 meses, na geladeira ou em nitrogênio líquido. As análises estatísticas conduzidas com as porcentagens máximas de germinação obtidas, em todos os tratamentos, aos doze dias do início dos experimentos de germinação indicam não haver diferenças estatísticas entre os tipos de armazenamento, em nenhum dos períodos de armazenamento estudados. Também não foram detectadas diferenças estatísticas entre as porcentagens de germinações obtidas no período zero de armazenamento (início do experimento) e no período de quinze meses de armazenamento, tanto para o armazenamento em geladeira (92,0% e 84,8%, respectivamente), como para o armazenamento em nitrogênio líquido (85,6% e 84,0%, respectivamente).

Tabela 21. Efeito do armazenamento de sementes de *Cedrela fissilis* em geladeira e nitrogênio líquido, por diferentes períodos de tempo, sobre a germinação.

Períodos de armazenamento (meses)	Tipo de armazenamento ^a	
	Geladeira	Nitrogênio líquido
0	92,0 a	85,6 a
7	92,0 a	91,6 a
11	92,8 a	82,4 a
15	84,8 a	84,0 a

^a Médias das porcentagens de no mínimo cinco repetições com vinte e cinco sementes cada. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1. Efeito de diferentes tipos de explantes e de diferentes concentrações de ANA e de BAP sobre a indução e o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados obtidos neste trabalho, com relação à influência dos tipos de explantes e de diferentes concentrações de ANA em combinação com 2,5 μM de BAP permitem destacar as seguintes respostas, que foram comuns aos dois tipos de explantes: 1- para a indução de maior porcentagem de culturas com calos, assim como para induzir calos com maior massa fresca e para que a proporção da massa fresca de calos seja maior em relação à massa fresca total das culturas foram necessários 2,5 μM de BAP combinados com pelo menos 2,5 μM de ANA; 2- para a indução de maior porcentagem de culturas com ramos foram necessários 2,5 μM de BAP com, no máximo, 1,25 μM de ANA; 3- para induzir maiores porcentagens de raízes foram necessárias combinações com concentrações de ANA de pelo menos 2,5 μM , sendo que, no caso do segmento apical a combinação com 5 μM de ANA foi inibitória. Os resultados sobre indução e crescimento dos calos estão de acordo com registrado na literatura, sendo os melhores tratamentos aqueles em que as concentrações de ANA foram maiores do que as do BAP, ou seja, que possivelmente permitiram um balanço endógeno em que as auxinas predominaram sobre as citocininas, provocando a melhor indução e crescimento dos calos (Krikorian *et al.*, 1990).

É interessante notar, que para o segmento nodal cotiledonar, mesmo com suprimentos exógenos iguais de ANA e BAP também houve ótima indução e crescimento dos calos. Talvez esta resposta possa ser explicada pelo fato deste tipo de explante ter um balanço endógeno de hormônios, que em interação com iguais concentrações exógenas de ANA e BAP, resultaram no nível ótimo necessário para desencadear a formação e o crescimento

dos calos, o que não aconteceu com o segmento apical, quando exposto às mesmas concentrações exógenas dos referidos reguladores de crescimento. As respostas obtidas com relação à indução de ramos nas culturas também estão de acordo com o mencionado na literatura sobre o fato de que a mesma é potencializada quando, no balanço endógeno predominam as citocininas. A rizogênese também é favorecida pelas auxinas, o que explica o aumento das porcentagens de culturas com raízes quando concentrações de 2,5 μM de ANA e 5 μM de ANA foram utilizadas.

É importante ressaltar que, apesar dos calos terem sido induzidos tanto a partir de segmentos nodais cotiledonares como apicais, ocorreram diferenças no crescimento em massa fresca dos mesmos, o que mostra que, para os segmentos apicais as concentrações de reguladores exógenos, que propiciaram a ótima indução podem não ser as mesmas requeridas para otimizar o crescimento em massa fresca dos mesmos. Já para os segmentos nodais cotiledonares, as mesmas concentrações de reguladores de crescimento poderiam ser utilizadas, tanto para assegurar altas porcentagens de indução, como também o melhor crescimento em massa fresca dos calos. Portanto, para otimizar o crescimento em massa fresca dos calos obtidos de segmentos apicais, novos experimentos devem ser conduzidos para testar, talvez concentrações maiores de ANA e BAP. É provável, que as diferentes nas respostas entre os tipos de explante sejam devidas às condições fisiológicas dos mesmos, em termos de balanço endógeno de hormônios, uma vez que o segmento nodal cotiledonar localiza-se mais próximo às raízes da plântula, que são fontes de citocininas, devendo ter um balanço hormonal diferente do segmento apical, pois o meristema apical é fonte de auxinas.

Essas mesmas considerações podem ser feitas quando se considera as respostas obtidas para os segmentos nodais foliares, que apresentaram respostas de crescimento e teores de água, que não diferiram das obtidas com os segmentos nodais cotiledonares, sugerindo, pela semelhança de respostas, serem fisiologicamente semelhantes, em termos de balanço endógeno de hormônios, pois quando expostos às mesmas concentrações exógenas de reguladores, alcançaram os balanços endógenos ótimos requeridos tanto para a melhor indução como para o melhor crescimento dos calos.

Nunes *et al.* (2003) utilizando segmentos nodais cotiledonares de plântulas de *Cedrela fissilis*, produzidas a partir de sementes de outra procedência, verificaram a mesma tendência na morfogênese: formação de calos em 100% das culturas com 2,5 μM de BAP e 2,5 μM de ANA, com um máximo de peso fresco, após 4 semanas de cultivo, entre 759 e 811 mg, por explante. A formação de ramos ocorreu entre 83 e 100 % das culturas, sendo que nas maiores concentrações de BAP foi observado o maior número de ramos por explante, apenas, que com 2,5 μM de BAP e 1,25 μM de ANA, foi induzido um percentual maior de enraizamento das culturas, de 66 %.

Há vários outros exemplos, na literatura, sobre a utilização de diferentes explantes e de reguladores de crescimento, entre eles o ANA e o BAP, na indução e crescimento de calos, que, em sua maioria confirmam os resultados obtidos no presente trabalho. Por exemplo, Amutha *et al.* (2003), utilizaram segmentos nodais cotiledonares e de hipocótilo para induzir calos de *Vigna radiata* (L.). Os reguladores de crescimento, ANA (1 μM) e BAP (2,22 μM) foram avaliados. Foi verificada a formação de calos em 30% das culturas. Os calos apresentavam aspecto nodular e coloração amarelada e eram friáveis. Com os segmentos nodais cotiledonares houve formação de ramos em 72,6% dos calos.

Sairam *et al.* (2003), utilizando nó cotiledonar, para cultivares de soja, e observaram o crescimento de calos após 28 dias de indução. Utilizou o 2,4-D e o BAP (8,88 μM), ANA em diferentes concentrações (26,9 -107,4 μM) e 2,4 D e cinetina. Foi observado que a alta razão citocinina: auxina produziu uma baixa porcentagem de indução de calos.

Thao *et al.* (2003) utilizaram os reguladores ANA e BAP para estudar a organogênese em calos de *Alocasia micholitziana*. Os testes foram feitos na luz e escuro, para verificar a formação de ramos. As concentrações utilizadas foram de 0-50 μM e a melhor concentração foi a de BAP 0,5 μM e ANA 0 μM , que formou ramos em 33,3% dos calos, na luz. O enraizamento ocorreu em 100% das culturas com ANA 0,5 μM e BAP 0,5 μM , na luz.

Schestibratov *et al.* (2003) utilizaram embriões com três dias de idade e segmentos nodais cotiledonares de plântulas de *Pinus radiata*, para testar a indução de calos com diferentes concentrações de sacarose, BAP e ANA. Os explantes foram colocados na posição horizontal. Após cinco semanas de cultivo foi determinado o crescimento. Para o enraizamento das culturas foram testadas combinações de concentrações diferentes de ANA, BAP e IBA. Somente com os segmentos nodais cotiledonares houve a formação de calos em 93% das culturas, na presença de 22,2 μM de BAP e de 2,69 μM de ANA. Com 0,44 μM BAP houve formação de 61% de ramos em calos nodulares. Já o autor, Vengadesan *et al.* (2000) utilizaram vários tipos de explantes, tais como, folhas jovens, hipocótilo e cotilédone da espécie *Acacia sinuata*. Testaram, em meio Murashige & Skoog, diferentes concentrações de reguladores de crescimento, entre eles BAP e ANA. Também observaram diferenças nas respostas dos explantes, sendo que o melhor explante utilizado foi o hipocótilo. Utilizando 8,08 μM de ANA, isoladamente houve formação de calos em

60% das culturas, enquanto que o uso de 2,22 μM de BAP combinado com 6,78 μM de 2,4-D induziu cerca de 90% de calos nas culturas. O ANA na concentração de 8,08 μM gerou raízes em 70% das culturas.

Thengane *et al.* (2003) testaram vários reguladores de crescimento não apenas na indução e crescimento de calos, mas também na produção do alcalóide camptotecina pelos mesmos. Testaram o BAP e o ANA em segmentos nodais de plântulas de *Nothapodytes faetida*. O crescimento dos calos foi determinado com 15, 30, 45 e 60 dias, levando-se em conta a massa fresca. Com 16,11 μM de ANA e 2,22 μM de BAP induziram resposta de formação de calos em 65,55% dos segmentos nodais cotiledonares mas não encontraram camptotecina, aparecendo somente traços desta substância, quando foi utilizado 26,85 μM de ANA e 4,44 μM de BAP, com uma resposta de formação de calos em 64,81% das culturas.

Anzidei *et al.* (2000) utilizando também como explante o hipocótilo de *Foeniculum vulgare*, observaram a organogênese e indução de calos em várias combinações de reguladores de crescimento, entre eles, ANA e BAP. Após um mês de cultivo, verificou 100% de formação de calos com 2,5 μM de ANA 10 μM de BAP. Os calos apresentaram formação de ramos e raízes e após 9 meses de cultura, foi observada a formação de 4 ramos em média, por cada cultura. Nobre *et al.* (2000) utilizaram na micropropagação da *Viburnum tinus*, o regulador BAP, em diferentes concentrações, sendo que a melhor concentração para a formação de ramos foi de 4,4 μM e para o enraizamento o ANA, na dosagem de 5,4 μM , onde 100% das culturas tiveram formação de raízes. Através do uso isolado destes reguladores de crescimento foi possível a determinação de um protocolo de organogênese para esta espécie.

Outros tipos de explantes também podem ser utilizados para a formação de calos em culturas de diversas espécies de árvores. Entre eles, podemos citar: ramos, embriões, folhas, pecíolos entre outros. Wu *et al.*(2004) testaram a formação de embriões de *Oncidium* “Gowe Ramsey” utilizando calos desta espécie, que foram induzidos com BAP e ANA isoladamente e observou que em BAP a 0,5 mg/L e ANA a 0,5 e 2 mg/L, após 30 dias de cultivo, havia formação de calos em 80% das culturas. Wang *et al.*(2003), utilizando ramos de *Areca catechu* como explante, observaram, após 60 dias de cultivo, que houve formação de 100% de calos utilizando BAP e TDZ na concentração de 0,2 mg/L. Também foi constatado que 50-60% dos calos formaram ramos e que esses calos, após imersão em 0,1 mg/L de ANA por 1 hora e após 30 dias, formaram raízes em 90% das culturas.

Tyankova *et al.* (2003) estudaram a influência individual de 8 linhagens diferentes de *Aegilops langissima* na formação e morfogênese de calos, mas utilizando embriões imaturos com idade de 14 dias, colocados em meio Murashige & Skoog, suplementado com ANA e BAP a 1 mg/L e 0,5 mg/L. Foi observada a indução de calos em 80% das culturas, em três linhagens e a morfogênese em 50% destas mesmas três linhagens. O calo formado apresentava uma estrutura globular e amarelada. Entretanto Ramarosandratana *et al.* (2003) utilizando também embriões zigóticos maduros de *Picea abies*, observou que a melhor produção de calos foi em 5,0 µM de BAP e de 10 µM ANA.

Bhau & Wakhlu (2001) utilizaram três variedades diferentes de *Morus alba* (vars. Chinese White , Kakusa-27 e Ichiose) em cultura de calos. Foram utilizadas folhas, segmentos nodais foliares e segmentos de pecíolos como explante. A formação de calos foi dependente do tipo de explante e do regulador de crescimento utilizado. Já Shimura & Koda (2004) avaliaram o crescimento de sementes de orquídea *Cypripedium macranthos*

em meio líquido HP, suplementado com ANA e BAP, na concentração de 1 μM , verificando a formação de PLBs. Também foi testada a formação de calos na mesma concentração a partir dos PLBs e foi verificado uma formação em torno de 100% das culturas.

Também há exemplos na literatura de casos em que o BAP foi combinado com outros tipos de auxinas, para a indução de calos. Sementes de *Poa pratensis* foram cultivadas por 6 semanas em meio Murashige & Skoog, suplementado com BAP (0,04 a 1,3 μM) e 2,4-D (4,5 a 9,0 μM) e com 30 g/L de sacarose. Observou-se a formação de 80% de calos friáveis e 90% de ramos nas culturas desta espécie (Van der Valk *et al.*, 1995). Já na espécie *Hieracium aurantiacum* utilizando o mesmo meio de cultura, suplementado com BAP 2,2 μM e IBA 2,5 μM e a mesma concentração de sacarose, cultivados por 4 semanas na presença de luz, verificou-se a formação de calos, ramos e raízes (Bicknell, 1994).

Diferentes dosagens de citocininas e auxinas são geralmente utilizadas na organogênese. Quando as concentrações de auxinas são maiores que as de citocininas, ocorre a formação de raízes nas culturas (rizogênese), o inverso gera a formação de ramos e quando ocorre o equilíbrio entre as concentrações, ocorre a calogênese. Portanto a depender do que se deseja produzir, existe uma combinação ideal entre as auxinas e citocininas (Krikorian *et al.*, 1990). Kannan & Jasrai (1996) testaram altas concentrações de BAP e ANA, em culturas de *Gmelina arborea*, espécie arbórea da família Verbenaceae, e observaram formação de calos de forma bastante acentuada em todas as culturas. Rey e Mroginski, (1996) observaram que em explantes de plântulas de *Aeschynomene spp.*, foram produzidos calos em 100% das culturas, com diferentes concentrações de ANA e

BAP, o que ressalta a importante função destes reguladores de crescimento na indução e no crescimento de calos.

Um outro aspecto importante, observado no presente trabalho, é que com diferentes combinações de concentrações de ANA e BAP, para um mesmo tipo de explante (segmento nodal cotiledonar), foram observados diferentes valores de massa fresca, massa seca e teor de água, o que indica que, certamente, os calos formados na presença de diferentes combinações de concentrações destes reguladores apresentaram níveis de atividade metabólica diferenciados. É possível constatar a necessidade da presença de BAP, para que altos valores de massa seca fossem obtidos, mas dependendo da concentração de ANA, modificações metabólicas devem ter sido induzidas que culminaram no maior acúmulo de água pelos calos. A relevância destes resultados está no fato de que cada uma das combinações de BAP e ANA testada deve estar induzindo modificações metabólicas, que poderiam influir no metabolismo secundário, o que pode ser averiguado em futuros estudos. Um outro aspecto importante é que, como nenhum estudo anatômico ou citoquímico dos calos foi conduzido, não se tem idéia do nível de diferenciação celular, que deve estar ocorrendo em cada combinação de concentrações de reguladores de crescimento testadas, o que estimula novos estudos nestas linhas.

6.2. Efeito das diferentes fontes de carbono e de diferentes concentrações de sacarose, na presença ou ausência de glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados obtidos nos experimentos realizados com diferentes fontes de carbono indicaram que, apesar do melhor crescimento em massa seca dos calos ter sido verificado no meio de cultura com sacarose, após 4 e 8 semanas de cultivo, também houve crescimento na presença de glucose e frutose, o que indica que as células possuem certa capacidade de metabolizar estes açúcares, o que é relevante para futuros estudos sobre a dissimilação do carbono e sobre os metabólitos secundários. Um outro aspecto interessante observado, sobre o crescimento dos calos, foi que em sacarose, as taxas de crescimento em massa seca foram semelhantes, nos intervalos de cultivo analisados, o que indica que os calos permaneceram na fase exponencial de crescimento durante o período de cultivo, não sendo observada a fase estacionária, pelo menos até a oitava semanas, que foi o período máximo de cultivo analisado no presente trabalho. É importante ressaltar também que a máxima absorção de água pelos calos ocorreu logo nas primeiras quatro semanas de cultivo, independente da fonte de carbono. O fato dos calos crescidos em frutose acumularem mais água, em termos de porcentagem da massa fresca, do que os crescidos nas outras fontes de carbono, indica que com frutose as células parecem ter crescido mais pelo aumento do volume celular, do que por divisão celular e acúmulo de massa seca.

Diferentes fontes de carbono têm sido testadas na micropropagação e em outros processos de cultura *in vitro* de diferentes espécies de plantas. Entre as mais utilizadas estão a glucose, sacarose, maltose, frutose, lactose, manitol e sorbitol. No cultivo *in vitro* as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos. A melhor fonte e concentração de carboidrato (carbono reduzido)

dependem principalmente da espécie vegetal e, no caso da micropropagação, da fase do processo. O uso da sacarose como principal e mais usual fonte de carbono para o cultivo *in vitro*, visando aos mais variados propósitos, tem sido bastante observado para muitas espécies vegetais (Nicoloso et al., 2003).

Nicoloso *et al.* (2001) desenvolveram um protocolo de fácil reprodução para a micropropagação da *Pfaffia glomerata*, a partir de um único segmento nodal em meio Murashige & Skoog, suplementado com 30 g/L de sacarose, foi possível obter 15.000 plantas dentro de um período de 6 meses. Já Nicoloso *et al.* (2003) testaram a combinação de cinco fontes de carbono (sacarose, frutose, glucose, lactose e maltose) e quatro diferentes concentrações dessas fontes (15, 30, 45 e 60 g/L) em meio Murashige & Skoog. Utilizaram segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*, e após 41 dias de inoculação, os seguintes parâmetros foram avaliados: números de brotações, número total de segmentos nodais por plântulas, altura da maior brotação, altura média das brotações, massa fresca e seca da parte aérea e massa seca das raízes. A melhor fonte de carbono, dentre as utilizadas, foi a sacarose nas dosagens de 30, 45 e 60 g/L em todos os parâmetros analisados.

Ferreira *et al.* (2002) utilizaram diferentes concentrações (100 e 50%) do meio Murashige & Skoog e de sacarose (15 e 30 g/L), suplementados com BAP e ANA e renovação dos meios (sem renovação, renovação com 30 e 60 dias) em eixos embrionários de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Analisaram os seguintes parâmetros: massa fresca (g), massa seca (g), área foliar (cm²) e número de folhas por explantes. O meio Murashige & Skoog completo foi responsável pelo total desenvolvimento das plântulas, enquanto que a renovação do meio após 30 dias e a sacarose 30 g/L desempenharam papel importante no desenvolvimento da área foliar, matéria seca e número

de folhas por explante. A sacarose 30 g/L apresentou ótimos resultados em todos os parâmetros, exceto no de massa fresca.

Fuentes *et al.* (2000) testaram três diferentes genótipos de *Coffea canephora* em diferentes fontes de carboidratos (sacarose, frutose, maltose e glucose) na concentração de 87,6 mM. As quatro diferentes fontes de carboidratos produziram diferentes respostas, conforme o genótipo utilizado. A frutose aumentou a produção de embriões somáticos em dois genótipos (N₉₁ e N₁₂₈) e a maltose em um (N₇₅), enquanto que o uso da sacarose e da glucose resultou em menor produção. Nguyen *et al.* (1999) também estudaram o crescimento de plântulas de café da espécie *Coffea arabusta* *in vitro* e testaram o efeito da sacarose (20 g/L e 0 g/L) e das trocas gasosas. Na formação dos calos, a melhor resposta das culturas foi verificada na concentração de 20 g/L.

Sairam *et al.* (2003) utilizaram segmentos nodais cotiledonares para indução de calos e regeneração de plantas de soja. Foram testadas várias concentrações de ANA, 2,4-D, BAP e diferentes fontes de carbono (sacarose, glucose, maltose, manitol e sorbitol a 30 g/L). A melhor frequência de indução de calos ocorreu com a concentração de 2,4-D a 2,26 µM e BAP a 8,8 µM e a melhor fonte de carboidrato testada foi o sorbitol, devido, principalmente, ao efeito de acumulação de triglicerídeos por esta fonte de carbono. A melhor fonte para regeneração das plantas foi a maltose, devido à hidrólise desse açúcar, na autoclave, produzindo glucose, o que proporciona mais rápida metabolização.

Blanc *et al.* (1999) testaram diferentes fontes de carbono (sacarose, glucose, maltose e frutose) na embriogênese somática de *Hevea brasiliensis*. O meio utilizado foi o Murashige & Skoog, suplementado com 234 mM de diferentes fontes de carbono. As culturas cresceram após 28 dias, no escuro, com maior nível nas culturas com sacarose, tanto em massa seca quanto em teor de água. A maltose foi responsável por um maior crescimento no início da cultura de 0–14 dias e os calos apresentaram coloração alaranjada. O maior crescimento das culturas neste intervalo de tempo se deveu ao fato das células absorver mais rapidamente a maltose do meio extracelular, enquanto que a sacarose necessita ser hidrolisada para sua absorção, sendo que após a hidrólise, a frutose é logo utilizada, mas a glucose apenas foi disponibilizada após 28 dias.

Hagen & Muneta (1993) estudaram o efeito da temperatura (20 e 30°C) sobre o conteúdo de carboidrato e dos diferentes períodos de cultivo (4 e 8 semanas) sobre o crescimento de calos de *Solanum tuberosum* L. cv. Lemhi Russet e cv. Russet Burbank, em meio Murashige & Skoog, suplementado com 10 µM de picloram e 30 g/L de sacarose, cultivados no escuro. Verificaram que o melhor cultivar foi o Lemhi Russet e que houve formação de amido em 21% dos calos cultivados a 30°C por 4 semanas e que eram coloridos e compactos, enquanto que os cultivados a 20°C, por 8 semanas, não formaram amido e eram sem cor e friáveis. Desta forma, o efeito do período de cultura sobre o crescimento dos calos de *Cedrela fissilis* também é um aspecto relevante a ser considerado, para futuras pesquisas, pois é possível que estejam ocorrendo processos de diferenciação que tenham implicações sobre o perfil de metabólitos secundários, nos diferentes períodos de cultivo.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a adição de glutamina ao meio de cultura apenas causou aumento em massa seca dos calos quando a sacarose foi utilizada na concentração de 87,6 mM e que na presença de concentração de 116,8 mM de sacarose, a presença de glutamina diminuiu o crescimento das culturas em relação ao tratamento sem glutamina. A inibição do crescimento, nesta alta concentração de sacarose, na presença de glutamina, pode ter sido devida ao fato de que o aumento da concentração de sacarose poderia diminuir o potencial osmótico do meio de cultura e desta forma, talvez dificultar a absorção, pelas células, das moléculas de glutamina presentes no meio.

Um aspecto interessante foi que a concentração mais alta de sacarose, mesmo na ausência de glutamina, promoveu o crescimento dos calos em massa seca. É possível que a utilização de altas concentrações de sacarose no meio de cultura possa estar otimizando o processo de assimilação dos íons nitrato e amônio, já existentes no meio de cultura Murashige & Skoog, e desta forma otimizando o crescimento em massa seca dos calos, mesmo na ausência de glutamina. Em todos os tratamentos houve a formação de calos, em 100% das culturas, sendo que com sacarose 20 g/L, tanto na presença como na ausência de glutamina, todos os calos apresentaram o pigmento clorofila, enquanto que com sacarose 30 g/L, na presença de glutamina houve a formação de raiz em apenas um dos calos. E em sacarose 40g/L sem glutamina houve a formação, em um dos calos, de raízes e ramos. Portanto, nas maiores concentrações de sacarose com ou sem glutamina ocorreram os processos de morfogênese e rizogênese, mas em baixas porcentagens.

Sabe-se que as fontes de nitrogênio são de grande importância, tanto no crescimento quanto na diferenciação de células e tecidos cultivados *in vitro* (Marques *et al.*, 1998). Contudo, as plântulas cultivadas *in vitro* requerem também uma fonte de energia exógena,

pois não dispõem de condições adequadas para a realização da fotossíntese (Grattapaglia & Machado, 1990). A sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada, devido à rapidez de sua absorção, sendo utilizada em meios de cultura em concentrações que variam de 20 a 40 g/L (Ferreira *et al.*, 2002).

Marques *et al.* (1998) por exemplo, testaram várias fontes de nitrogênio no crescimento e desenvolvimento de explantes caulinares de crisântemo. A glutamina fazia parte de dois dos oito tratamentos testados, sendo que em um deles era utilizada isoladamente e no outro, com uréia. O tratamento com glutamina e o tratamento com glutamina e uréia resultaram em baixas médias de altura dos eixos caulinares. Os baixos valores obtidos em todos os parâmetros analisados evidenciaram que, com glutamina, as plantas apresentaram pouco desenvolvimento, tanto da parte aérea como das raízes. Também foi observada uma coloração avermelhada nos explantes nos meios com glutamina, que nesta espécie, reflete uma evidência quimiotoxonômica, relacionada à presença de flavonóides.

Em outro estudo Garin *et al.* (2000), utilizaram cinco linhagens embriogênicas diferentes de *Pinus strobus* L., em meio Murashige & Skoog, com várias fontes de carbono e de nitrogênio e duas diferentes concentrações de Phytigel (0,6 e 1,0%). O maior crescimento das culturas ocorreu na combinação de sacarose (88 mM) e sorbitol (175 mM) em phytigel à 10% e com glutamina (7,3 g/L), o que neste caso mostra o efeito promotor da glutamina. Da mesma maneira, Petersen *et al.* (1999) testaram sete diferentes fontes de carbono (sacarose, glucose, frutose, maltose, uma combinação de glucose e frutose, sorbitol e manitol), na concentração de 87,6 mM em meio Murashige e Skoog suplementado com 13,6 µM de 2,4-D e 300 mg/L de glutamina, em folhas jovens e ramos apicais de

Miscanthus x ogiformis Honda “Giganteus”. Foi observada maior produção de calos embriogênicos em folhas jovens. Os diferentes tipos de açúcares tiveram pequeno efeito na formação de calos embriogênicos, crescimento de calos e regeneração de plântula a partir de diferentes tipos de explantes. A glucose, neste caso, na presença da glutamina foi a fonte de carbono que formou mais calos, induziu a formação de calos embriogênicos e produziu maior número de folhas por explantes.

Já Trejo-Tapia *et al.* (2002), testaram quatro híbridos de arroz, com relação à indução de calos, a partir de anteras. Estudaram os efeitos do pré-tratamento com o frio, diferentes concentrações de auxinas (IBA, ANA e 2,4-D, de 0 a 13,43 μM) e fontes de carbono (maltose e sacarose a 30 g/L), na presença de glutamina 500 mg/L. Observaram relação entre as concentrações de auxinas e as fontes de carbono. A maior indução de calos foi observada com 10,74 μM de ANA e 30 g/L de maltose, na presença de 500 mg/L de glutamina. Concluíram que a melhor fonte de carbono para a produção de calos de arroz híbrido foi a maltose, mas na presença de glutamina.

Scott & Lyne (1994) utilizaram culturas de microsporos isolados de *Hordeum vulgare* L. cv. Igri, para a indução de embriões somáticos em meio Murashige e Skoog, suplementados com 5 mM de glutamina e 4,4 μM de BAP e testaram diferentes fontes de carboidratos (maltose, glucose, frutose, sacarose e manitol), em diferentes concentrações (0, 2, 5, 10, 20, 40, 100 e 175 μM). Verificaram que os melhores resultados foram obtidos com a maltose, na concentração de 175 μM e que nas outras fontes de carbono testadas as culturas celulares morreram. Atribuíram o melhor crescimento com a maltose, pois ocorre o aumento da osmolaridade celular, e que nas outras fontes de carbono houve formação de produtos metabólicos com efeito tóxico para as células. Tang *et al.* (2004) estudaram o

efeito de diferentes reguladores de crescimento, na formação de calos, a partir de embriões zigóticos de *Pinus virginiana*. O meio utilizado foi o Murashige e Skoog com 30 g/L de sacarose e 500 mg/L de glutamina, suplementado com 2,2 μ M de BAP e AIA em diferentes concentrações. O melhor tratamento ocorreu em meio contendo BAP 2,2 μ M combinado com AIA 11,4 μ M, com formação de 45% de calos nas culturas, estando também presente a glutamina..

Outras fontes de nitrogênio podem ser usadas para o crescimento de culturas, entre elas, podemos citar: o nitrato, amônia, prolina e asparagina (Elkonin & Pakhomova, 2000) a prolina e a glicina (Hansson & Poljakoff-Mayber, 1995) entre outras. Elkanin & Pakhomova (2000), testaram a influência das fontes de nitrogênio na indução de calos embriogênicos de sorgo. Nove tipos diferentes combinados de íons nitrato (39,9 ; 72,4 e 131,6 mM) e (20,6 ; 62,5 e 125 mM), com ou sem asparagina e/ou prolina. A elevação das concentrações de íons nitrato e amônio no meio de cultura com aminoácidos aumentaram significativamente a indução e o crescimento de calos embriogênicos e sua habilidade de regeneração. O meio de cultura contendo 62,5 mM de íons amônio e 72,4 mM de íons nitrato produziu uma excelente quantidade de calos embriogênicos. Verificaram também que os calos diferiram no aspecto, sendo compactos ou friáveis, quando se aumentavam respectivamente a concentração do íon amônio e o nitrato e somente friáveis, quando se aumentava a concentração do íon amônio. Já, Hansson & Poljakoff-Mayber (1995), estudaram a indução e crescimento de calos de *Kosteletzkya virginiana* (L.) Persl., iniciados a partir de hipocótilos de diferentes idades, cultivados em meio B5, suplementado com 0,4 μ M BAP e 0,1 μ M ANA e prolina ou glicina em diferentes concentrações (0,5 ; 1,0 ; 5,0 e

10 mM). Observaram que nenhuma fonte de nitrogênio testada afetou o crescimento de calos desta espécie.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam, no caso dos calos de *Cedrela fissilis*, a viabilidade de se testar, em estudos futuros, a combinação das diferentes fontes de carbono com diferentes concentrações de glutamina, como forma de otimizar o crescimento dos calos nas fontes de carbono que não propiciaram crescimento acentuado. O fato de a glutamina promover o crescimento apenas em certas concentrações de sacarose, pode indicar que talvez nestas concentrações esteja sendo fornecido o aporte ideal de átomos de carbono, para a construção dos esqueletos de carbono necessários para receber o nitrogênio armazenado nas moléculas de glutamina e formar as diferentes moléculas necessárias ao perfeito funcionamento do metabolismo e da fisiologia celular, como ácidos nucleicos, fitohormônios e aminoácidos, que são formados a partir da glutamina.

6.3. Efeito da presença e ausência de luz e da idade dos explantes sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

Vários aspectos são interessantes quando se analisam os resultados obtidos neste trabalho, com relação ao efeito da luz sobre o crescimento dos calos de *Cedrela fissilis*, sendo, por exemplo, a promoção do crescimento em massa seca em relação ao escuro, e na oitava semana de cultivo, o maior acúmulo de água em porcentagem da massa fresca, no escuro, os mais relevantes. Estes resultados poderiam ser explicados pelo fato de que, a condição de escuro poderia estar induzindo o maior crescimento das células em volume celular do que a condição de luz. Como não foram realizadas as dosagens de clorofila nos calos, não é possível afirmar se existe algum nível de atividade fotossintética, que esteja, de

alguma forma contribuindo para o incremento em massa seca dos calos, mesmo no nível de intensidade luminosa das câmaras de crescimento, onde as culturas foram mantidas.

Vários exemplos da literatura podem ser mencionados sobre o efeito da luz e escuro em culturas *in vitro*. Makunga *et al.* (1997), estudaram culturas de segmentos inter-nodais de *Oxalis reclinata*, em meio Murashige & Skoog, suplementados com sacarose 30 g/L e 2,5 μ M de BAP e de 2,5 μ M ANA, para a formação de calos para a produção dos pigmentos antocianinas. Utilizaram calos com pigmentos vermelhos e sem pigmentos, testando diferentes reguladores de crescimento, luz e escuro na produção de antocianinas. Os calos brancos apresentaram maior crescimento no escuro, enquanto que as culturas de calos vermelhos, em luz, produziram maior quantidade de antocianina. A maior biomassa foi encontrada com 2,4-D, em calos brancos, e a maior produção de antocianinas em calos vermelhos utilizando ANA.

Cui *et al.* (2000), cultivaram plântulas de *Rehmannia glutinosa* oriundas de brotos axilares, durante 4 semanas. Testaram diferentes fatores sobre o crescimento: número de trocas gasosas, concentração de sacarose, fluxo de fótons e o crescimento na luz e escuro das culturas. As concentrações de sacarose foram 0; 15 e 30 g/L. O maior crescimento das plântulas, raízes e ramos, tanto em massa fresca como em massa seca foi com sacarose, na concentração de 30 g/L. As culturas cresceram tanto no escuro quanto na luz, sendo que a maior taxa de crescimento foi na luz. Em outro estudo, Creche *et al.* (1994) testaram o crescimento de calos da espécie *Choisya ternata*, cultivados em meio Murashige & Skoog, suplementado com 42 mM de sacarose, na presença e na ausência de luz. Foi observado que as células destes calos tinham atividade fotossintética, e que cresceram em taxas iguais tanto na luz como no escuro.

Yuan *et al.* (1994) testaram o efeito de várias combinações de ANA e BAP e da intensidade luminosa sobre o crescimento da espécie *Catharantus roseus*. Verificaram que a melhor resposta ao crescimento dos ramos desta espécie se deu na concentração BAP 35 μM e ANA 5 μM . A faixa de luminosidade utilizada variou do escuro a 1600 lux., sendo que o melhor crescimento das culturas se deu com 500-700 lux., com BAP 10 μM e ANA entre 0 e 5 μM , aqui alguns ramos não sofreram indução, e no seu lugar foram formados calos, devido principalmente à combinação de ANA com BAP.

A luz, por outro lado, através do sistema de fitocromo, poderia desencadear várias respostas fisiológicas benéficas ao crescimento, como a síntese de várias proteínas, ativação de enzimas, transcrição de mRNA e até mesmo afetar o potencial transmembranar, através da possível ativação da ATPase que, por sua vez, poderia despolarizar a membrana, provocando a abertura de canais de íons potássio e, especialmente, do cálcio que está envolvido, como mensageiro secundário, no próprio mecanismo de ação hormonal (Krikorian *et al.*, 1990). Desta forma, talvez o próprio mecanismo de ação dos reguladores fornecidos exogenamente, poderia estar sendo influenciado pela presença ou ausência da luz. Deve-se ressaltar, contudo, que não foram realizadas as análises dos espectros das lâmpadas utilizadas nas salas de crescimento, para verificar se há a emissão de luz, na faixa do vermelho (660 nm), necessária para a ativação do fitocromo. De qualquer maneira, os resultados obtidos propiciam a abertura de novas linhas de investigação, para explicar os efeitos da presença e da ausência de luz sobre o crescimento e acúmulo de água pelos calos.

A utilização de plântulas de diferentes idades, como doadoras de segmentos nodais cotiledonares, não influenciou o crescimento em massa seca dos calos, mas sim o teor de água, em porcentagem da massa fresca dos mesmos, que foi maior nos calos produzidos a

partir de plântulas de 5 semanas de idade. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que plântulas de diferentes idades devem apresentar diferentes níveis de diferenciação e de balanço de fitormônios endógenos, que poderiam influir nas respostas de crescimento.

Vários são os exemplos existentes na literatura sobre a influência da idade dos explantes na iniciação e no crescimento de sistemas de cultura *in vitro*. Hoque *et al.* (2004) estudaram quatro genótipos diferentes da espécie *Indica rice* na indução de calos. Segmentos de raízes de diferentes idades foram inoculados para a indução dos calos. As culturas foram suplementadas com sacarose a 3 g/L e cultivadas no escuro. Observaram que os diferentes genótipos tiveram influência na indução de calos, enquanto que a idade dos explantes não influenciou o crescimento dos calos. Mesmo assim, os segmentos jovens produziram a maior biomassa das culturas.

Já Monteuis & Bon (2000), utilizaram micro-ramos juvenis e maduros de *Acacia mangium* para a formação de raízes e de ramos. Verificaram a influência da luminosidade (escuro e fotoperíodo 16-8 horas) e de diferentes concentrações de auxinas. Os clones maduros se desenvolveram melhor com 4 e 6 μM de ANA e com IBA, nas mesmas concentrações, quando expostos somente ao escuro. A produção de raízes adventícias foi maior no escuro do que no fotoperíodo de 16-8 horas, assim como o tamanho dos ramos. Já os clones juvenis se desenvolveram melhor com ANA 4 μM e no escuro.

Hansson & Poljakoff-Mayber (1995) estudaram a indução e crescimento de calos de *Kosteletzkya virginiana* (L.) Persl., iniciados a partir de hipocótilos de diferentes idades (7 e 9 dias), cultivados em meio B₅, suplementado com 0,4 μM de BAP e 0,1 μM de ANA. Verificaram que os explantes de plântulas com 7 dias de idade originaram o maior

crescimento dos calos. Em outro estudo, Burnett *et al.* (1994) utilizaram explantes cotiledonares com diferentes idades (3 a 7 dias), excisados de plântulas da espécie *Brassica rapa*, inoculados em meio Murashige & Skoog, suplementados com BAP e ANA, em diferentes concentrações e sacarose 30 g/l. Observaram que com 4,4 μM de BAP e 5,4 μM de ANA, os explantes mais jovens (3 ou 4 dias), produziram as maiores quantidades de ramos e que os mais velhos (7 dias) a maior quantidade de calos e nenhum ramo.

Dobos *et al.* (1994) estudaram a indução e crescimento de calos de *Sempervivum tectorum*, iniciados a partir de folhas e ramos, cultivados nos meios de cultura Murashige & Skoog e White, suplementados com diferentes reguladores de crescimento (BAP; ANA; IBA; AIA), em diferentes concentrações, na presença de luz. Os explantes utilizados foram de plântulas com idade de 14 e 30 dias, e as mais jovens apresentaram o maior crescimento, com 85% de desenvolvimento. Os explantes com 14 dias de idade não formaram calos, enquanto que naqueles com 30 dias de idade houve a formação de calos com 4,4 μM de BAP e 0,57 μM de AIA, com as maiores massas frescas para calos originados a partir de folhas.

O fato de, no presente trabalho, os calos oriundos de plântulas de *Cedrela fissilis* de 5 semanas de idade apresentarem maior teor de água, em porcentagem, mostra que, de alguma forma, as células estariam crescendo mais em volume celular do que nos calos originados de plântulas de 18 semanas de idade. Normalmente, as auxinas são responsáveis pelo aumento do volume celular, e é possível que, nas plântulas de 5 semanas, o ponto de inserção dos cotilédones, estando mais próximo ao ápice da plântula, que é fonte de auxina, poderia receber uma quantidade maior destes fitohormônios, já que os mesmos são translocados do ápice para a base, nas plântulas (Krikorian *et al.*, 1990). As plântulas de 18

semanas são maiores em comprimento e apresentam pelos menos dois nós foliares entre o ponto de inserção dos cotilédones e o ápice, o que talvez provocasse um acúmulo menor de auxinas nos segmentos nodais cotiledonares, utilizados como explantes. Desta forma o nível de auxinas endógenas dos explantes poderia ser diferente e desencadear as diferenças observadas nos calos, em termos de acúmulo de água, mas não no crescimento em massa seca.

6. 4. Análise do teor de óleos essenciais e dos constituintes voláteis de calos de *Cedrela fissilis* produzidos na luz e no escuro

Os resultados obtidos neste trabalho, com relação à presença de óleos essenciais em calos de *Cedrela fissilis* são relevantes, pois, de acordo com Lago *et al.* (2004) vários estudos químicos existem sobre o gênero *Cedrela*, mas a maioria deles sobre a presença de limonóides, sendo que apenas dois trabalhos existem na literatura sobre análises de compostos voláteis das folhas e da casca das árvores. Estes autores demonstraram que em óleos essenciais de folhas os componentes voláteis principais detectados foram o biciclogermacreno (26,6%) e o β -longipineno (18,5%), enquanto que em óleos essenciais da casca predominaram o espatulenol (8,6%), o viridiflorol (8,8%), o globulol (10,9%) e o β -bisabolenol (10,9%).

As análises conduzidas neste trabalho com os calos, indicaram a predominância do linalol (na proporção de 54,4% tanto nas culturas cultivadas na luz quanto no escuro), entre os compostos voláteis. Este composto não foi detectado em óleos essenciais de folhas ou de casca de *Cedrela fissilis*, de acordo com o trabalho conduzido por Lago *et al.* (2004), o que indica, que através da cultura *in vitro* pode ser induzida a biossíntese de compostos, que não são detectados nas plantas crescidas no ambiente natural. Da mesma forma, a cânfora,

encontrada nos calos produzidos no presente estudo, também não aparece como componente dos óleos essenciais de folhas e de casca, o mesmo ocorrendo com outros compostos detectados nos calos, como o 1,8-cineol e o 3-careno. Já o sesquiterpeno germacreno é constituinte dos óleos essenciais de folhas e casca e também apareceu nos calos crescidos na luz, em proporção de 12,3%. Um outro aspecto importante é que houve diferença, não apenas no número de compostos que apareceram na luz e no escuro, mas também nas proporções dos mesmos, o que é indicativo da importância da manipulação deste fator em futuros estudos.

Estes resultados, apesar de preliminares, estimulam a realização de novos estudos no sentido de verificar o efeito dos diferentes fatores, testados neste trabalho sobre o crescimento dos calos, sobre o perfil de composição dos componentes voláteis dos óleos essenciais, assim como testar a atividade antibacteriana do mesmo, já que Lago *et al.* (2004), demonstraram que o óleo de folhas, que contém alta concentração de germacreno, apresentou maior atividade antibacteriana.

6.5. Criopreservação de sementes e conservação *in vitro* de propágulos vegetativos de *Cedrela fissilis*

No presente estudo, foi constatado que as sementes de *Cedrela fissilis* apresentam uma taxa de teor de umidade em torno de 10% e sobreviveram ao armazenamento em nitrogênio líquido pelo período de quinze meses, sem que houvesse decréscimo significativo na viabilidade, em relação às sementes armazenadas na geladeira. O teor de água encontrado nas sementes foi maior do que o observado por Nunes (2000), de 6-7% em sementes da mesma espécie, mas mesmo assim, ainda está no nível, que permite a tolerância à imersão ao nitrogênio líquido, conforme mencionado na literatura, sem que

haja a necessidade de submeter as sementes aos tratamentos crioprotetores, como a desidratação ou exposição aos agentes crioprotetores.

Vários estudos existem sobre a tolerância de sementes de diferentes espécies ao nitrogênio líquido, que confirmam os resultados obtidos neste trabalho, e sobre as vantagens do armazenamento de sementes através da criopreservação. Poucos, porém testaram o armazenamento em nitrogênio líquido por longos períodos de tempo, sendo a maioria dos trabalhos conduzidos por curtos períodos. Stanwood (1980) utilizou sementes de 29 espécies diferentes de plantas, que foram criopreservadas em nitrogênio líquido por diferentes períodos de tempo. Os tempos testados variaram de 7 a 18 dias e houve manutenção da viabilidade das sementes em 22 das espécies estudadas. Espécies como *Allium cepa* L. e *Cucumis sativus* L., criopreservadas, respectivamente, por 4 e 2 anos, mantiveram-se viáveis. Portanto, a imersão em nitrogênio líquido não causou lesões celulares na maioria das espécies estudadas, sendo indicada para a conservação de germoplasma e sementes por longos períodos de tempo.

Outras espécies de plantas com importância econômica, com sementes com umidade em torno de 5-10%, têm possibilitado a conservação e o armazenamento em nitrogênio líquido (Walters *et al*, 2002; Gonzalez-Benito *et al*, 1998; Decruse *et al*, 1999; Stanwood, 1985 e Touchell *et al.*, 2002). Diversas espécies endêmicas têm sido retiradas do seu habitat natural. Em razão disso, bancos de sementes de espécies de interesse agrônômico, botânico, econômico e medicinal vêm sendo utilizados para a conservação de germoplasma (Gonzalez-Benito *et al*, 1999).

A criopreservação em nitrogênio líquido em temperatura de -196°C tem viabilizado a preservação de células, tecidos e órgãos de várias espécies de plantas, sendo que o sucesso dessa técnica depende da espécie a ser criopreservada e do protocolo a ser adotado para a estocagem destes germoplasmas (Benson, 1999). Também, segundo Gonzalez-Benito *et al.* (1998), as técnicas de criopreservação são muito utilizadas em sementes de inúmeras espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas, sendo que para espécies da região tropical é necessário o estabelecimento de protocolos específicos. O estabelecimento de um protocolo de criopreservação para sementes está condicionado ao conhecimento prévio de suas propriedades físicas e químicas e da determinação do teor de umidade, bem como as taxas ideais de congelamento e descongelamento (Engelman & Dussert, 2000).

A temperatura de estocagem e o teor de umidade das sementes são fatores muito importantes, para a longevidade de sementes criopreservadas. Sementes ortodoxas ou semi-recalcitrantes (tolerantes ao dessecamento), devem ter um teor de até 10% de umidade (Stanwood, 1985). Para Engelman & Dussert, (2000), este teor de umidade deve estar entre 10 a 20%, já para Marzalina & Krishnapillay (1999), o teor de umidade tem que ser abaixo de 20%. Segundo Benson (1999), é importante determinar o teor de umidade das sementes a serem criopreservadas e o protocolo de criopreservação mais específico a ser utilizado para a espécie, pois ao se saber o teor de umidade da semente a ser estudada, pode-se evitar a formação de cristais de gelo no meio intracelular e com isso o rompimento da parede celular e posterior morte da célula. O teor máximo e mínimo de umidade para que as sementes tolerem a criopreservação depende da espécie a ser estudada (Stanwood, 1980).

Gonzalez-Benito *et al.* (1998) armazenaram em nitrogênio líquido, sementes de diferentes famílias endêmicas da Espanha: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae,

Cistaceae, Leguminosae e Scrophulariadeae. Todas apresentaram taxa de umidade em torno de 3,9 a 10,8%. Não foi observada diferença estatística significativa na germinação das sementes das famílias testadas. A melhor taxa de germinação foi de 100%, na espécie *Vella pseudocytisus*, após 30 dias em nitrogênio líquido. Nunes (2003) utilizando sementes de *Cedrela fissilis* criopreservadas por uma hora e, após descongelamento rápido em banho-maria a 45°C, depois de 10 dias de cultivo observou uma taxa de germinação de 91,6%. Reed *et al.* (2001) utilizaram sementes de *Pyrus communis* cv. Bosc., com teor de umidade de 7,86% e após a criopreservação foram encontradas altas taxas de germinação entre 83 a 100%, confirmando que as sementes ortodoxas de pêra são tolerantes ao armazenamento em nitrogênio líquido.

Diferentes espécies de plantas medicinais da Índia, entre elas: *Abrus precatorius*, *Andrographis paniculada*, *Coleus forskohlii*, *Dipteracanthus patulus*, *Hemidesmus indicus*, *Ocimum gratissimum*, *Tylophora indica*, *Rauvolfia micrantha* e *Embelia ribes*, foram criopreservadas em nitrogênio líquido por uma semana. As sete primeiras espécies tiveram seu teor de umidade de 7-15% inicialmente reduzido para 4-7%, após processo de dessecação. As duas últimas espécies, que apresentaram sementes com teor de umidade de 40%, foram reduzidas até 4% para melhor tolerarem a criopreservação. As taxas de germinação variaram de 80-95% e de 78-88%, respectivamente, para as espécies dos dois diferentes grupos (Decruse *et al.*, 1999).

Sementes de *Sesamum indicum* L., com teor de umidade de 2 a 14,5%, foram criopreservadas em nitrogênio líquido por 7 dias. A melhor taxa de germinação foi obtida com o teor de umidade em torno de 6%, indicando que esse fator é determinante para a taxa de sobrevivência após a criopreservação de sementes dessa espécie (Stanwood, 1987).

Marzalina & Krishnapillay (1999) criopreservaram as espécies de Meliáceas *Swietenia macrophylla* e *Melia azaderach*, com teor de umidade de, respectivamente, 5-6% e de 12,4% e obtiveram as taxas de germinação de 63 e 43%, respectivamente. Dussert *et al.* (1998) criopreservaram sementes de quatro espécies de café: *Coffea arabica*, *Coffea costatifructa*, *Coffea racemosa* e *Coffea sessiliflora*, com teor de umidade de 11-14% após 16 horas de dessecação. Obtiveram uma taxa de germinação de *Coffea arabica* em torno de 84% enquanto que nas demais espécies, a taxa de germinação foi de 19-30%.

Pita *et al* (1998) criopreservaram sementes de sete espécies diferentes de *Pinus* da Espanha: *P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. sylvestris* e *P. uncinata*, com teores de umidade que variam de 7,27 a 9,82%. Após 4 dias de conservação em nitrogênio líquido, a melhor taxa de germinação foi a da espécie *P. sylvestris*, em torno de 97%, enquanto as demais ficaram entre 61-96%. Kim *et al.* (2002) criopreservaram sementes de chá (*Camellia sinensis*), com teor de umidade de 19,5% e não foi observada germinação destas sementes, fazendo com que elas sejam consideradas recalcitrantes, por não sobrevirem à criopreservação em nitrogênio líquido. Além de sementes, outros tipos de explantes como: eixos embrionários e eixos embrionários cotiledonares (Kim *et al.*, 2002), ramos (Wang *et al.*, 2000), PLBs (Bian *et al.*, 2002) e embriões zigóticos (Touchell *et al.*, 2002) entre outros, já foram criopreservados em nitrogênio líquido.

Sementes de trinta espécies endêmicas da Espanha foram criopreservadas durante um a trinta dias em nitrogênio líquido e descongeladas lentamente em temperatura ambiente por 20°C, não havendo decréscimo nas taxas de germinação. Nas espécies *Cistus osbeckiifolius* e *Helianthimum polygonoides*, observou-se interação entre o período de criopreservação e a quebra da dormência. As maiores taxas de germinação foram

encontradas em sementes que tiveram quebra de dormência (Gonzalez–Benito *et al.*, 1998). Bian *et al.* (2002) utilizaram PLBs para criopreservação em nitrogênio líquido e constataram que o descongelamento rápido não altera as taxas de germinação e sobrevivência e germinação da espécie *Dendrobium candidum*.

Além do teor de umidade das sementes, outro fator importante para se desenvolver um protocolo de criopreservação é o tipo de descongelamento a ser realizado após a criopreservação. Um aspecto relevante dos resultados obtidos no presente trabalho, com sementes de *Cedrela fissilis* é que não houve diferença entre os tipos de descongelamento testados, o que torna mais prático o procedimento após a retirada das sementes do nitrogênio líquido, pois podem ser descongeladas em temperatura ambiente, antes de serem colocadas para germinar. Estudando espécies endêmicas da Espanha, Gonzalez-Benito *et al.* (1999), testaram o tipo de descongelamento lento (temperatura ambiente) e rápido (banho-maria a 40°C) e verificaram que não houve efeito da diminuição germinativa destas espécies. Sementes de chá (*Camellia sinensis*) após a criopreservação em nitrogênio líquido foram descongeladas rapidamente (em banho-maria a 37°C por dois minutos), e nenhuma delas germinou. Foi observado que estas sementes são recalcitrantes, porque não sobreviveram à dessecação e nem à criopreservação (Kim *et al.*, 2002). Moratelli & Viana (2003) testaram sementes de *Tabebuia avellanae* criopreservadas em nitrogênio líquido por uma hora, em seguida descongeladas rapidamente (em banho-maria a 45°C por três minutos) e lentamente (em temperatura ambiente a 25°C). Observaram que não houve diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tratamentos e os diferentes tipos de descongelamento.

No presente trabalho, também foi testado o método de armazenamento das sementes após a criopreservação e os resultados indicaram que as sementes, após criopreservadas podem ficar expostas à temperatura ambiente, por uma ou duas semanas, sem que a viabilidade seja alterada. Este resultado apresenta uma aplicação prática, que pode facilitar a troca de germoplasma, pois no caso de se considerar um banco de sementes, em que fossem mantidas criopreservadas, poderiam ser enviadas pelo correio, para outras localidades, em temperatura ambiente, não havendo a necessidade de serem mantidas em nitrogênio líquido o tempo todo, o que tornaria o processo mais caro. Um outro resultado importante foi que os lotes de sementes criopreservados por onze e quinze meses foram descongelados, durante 48 horas e em seguida criopreservados novamente, sem que este procedimento reduzisse as taxas de germinação, o que indica que as sementes toleraram a segunda criopreservação, o que sugere que, após o transporte hipotético das sementes, de um banco de germoplasma, para uma outra localidade, poderiam ser criopreservadas novamente e mantidas nestas condições por longos períodos.

Apesar de no presente trabalho não terem sido detectadas quedas significativas na viabilidade das sementes mantidas em geladeira, durante o período em que foram conduzidos os estudos, é possível, que as vantagens do armazenamento em nitrogênio líquido fiquem mais nítidas em períodos de armazenamento maiores que o de quinze meses testado. Um outro aspecto importante é que não foram verificadas diferenças entre as porcentagens de germinação de sementes mantidas em geladeira, por diferentes períodos, e as criopreservadas, mas não foram conduzidas as análises de crescimento das plantas produzidas a partir destas sementes, para verificar se houve influência dos tratamentos sobre o crescimento das mesmas. A vantagem da criopreservação é que a viabilidade das

sementes pode ser mantida por longos períodos de tempo, assim como a estabilidade genética, reduzindo os riscos de perda da diversidade genética (Gonzalez-Benito *et al.*,1999). Stanwood (1980, 1985 e 1987) concluiu que com o desenvolvimento das técnicas de criopreservação para sementes ortodoxas ou semi-recalcitrantes, tem-se viabilizado a conservação e reduzido a deterioração dessas sementes e que elas sobrevivem por longos períodos de tempo. A partir da análise dos resultados, conclui-se que a utilização da técnica de criopreservação em nitrogênio líquido é indicada para a conservação de germoplasma e da variabilidade remanescente de *Cedrela fissilis*, bem como para o transporte de suas sementes. Para esta espécie, a técnica de criopreservação mostrou que permite bons resultados de germinação das sementes, além de ser uma técnica de fácil execução.

No presente estudo também foram conduzidos experimentos sobre a conservação *in vitro* de propágulos vegetativos de *Cedrela fissilis* e os resultados indicaram que segmentos nodais foliares e apicais puderam ser conservados por períodos de até 6 semanas, não havendo diferença entre as massas secas dos calos produzidos, tanto quando os propágulos foram armazenados na condição de 5°C, no escuro quanto a 25°C, na luz. Ambos os tipos de explantes toleraram ambas as condições de armazenamento, pois não foi verificada diminuição na capacidade de crescimento em massa seca dos mesmos. Os valores de massa fresca (1188,3 mg) e de massa seca (55,6 mg) dos calos produzidos a partir dos explantes de segmentos nodais foliares, armazenados a 5°C, no escuro, foram semelhantes aos obtidos no experimento em que foram comparados o crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares e foliares, após 8 semanas de cultivo (1287,2 mg e 59,2 mg). Da mesma forma, o valor de massa fresca obtida para os calos produzidos a partir

de segmentos apicais, armazenados a 25°C, na luz (643,7 mg) aproximou-se do obtido no experimento em que foram comparados o crescimento, em massa fresca, de calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares e apicais (864,6 mg).

O armazenamento *in vitro* de propágulos vegetativos, em geladeira ou em temperatura ambiente, em substratos que restringem o crescimento, surge como uma alternativa mais barata de armazenamento de germoplasma, em curto prazo. Bonga (1997) estudou o efeito da estocagem a -5°C e -10°C por 3 meses de embriões de duas árvores européias, *Larix decidua* e *Larix eurolepis*. Todos os explantes utilizados foram excisados na mesma época do ano (inverno) e colocados em meio de cultura Litvay, livre de reguladores de crescimento. Observou-se que os embriões estocados a -5°C formaram ramos em 37% das culturas enquanto que, os estocados a -10°C, somente em 8%. Os estocados a -5°C apresentaram maior incremento em massa fresca em relação aos armazenados na outra temperatura.

Bonnier & Van Tuyl (1997) estudaram a preservação por longo período de tempo de germoplasmas de lírios. Utilizaram o bulbo de 10 genótipos diferentes que foram armazenados por 28 meses a -2°C e 25°C em quatro diferentes meios de cultura suplementados com sacarose em duas concentrações (6 e 9 %). Foi verificado o crescimento da planta, do bulbo e determinada a viabilidade. Observaram que o maior crescimento da planta e do bulbo aconteceu com o meio de cultura Murashige & Skoog com 25% da sua concentração salina, suplementado com 9% de sacarose e que a viabilidade foi bastante alta após os 28 meses, com altas taxas de rebrotamento das plantas. Na conservação dos explantes por 28 meses a 25°C, todos os genótipos sobreviveram, enquanto que, a -2°C, somente dois genótipos permaneceram viáveis e os demais

sobreviveram somente por 6 meses. Já Han *et al.* (2000) estudaram o efeito do armazenamento de uma linhagem haploíde de calos originados a partir de anteras da espécie *Lilium* L. var. “Connecticut King”. Foi utilizado o meio de cultura Murashige & Skoog e diferentes reguladores de crescimento em diferentes temperaturas de estocagem (7, 15 e 25°C). Para a manutenção dos calos haplóides o melhor regulador de crescimento foi o Picloram, visto que o ANA e 2,4-D conduziam somente à formação de raízes. A melhor temperatura para a manutenção foi a de 25°C. Aproximadamente 90% dos calos foram mantidas no nível haploíde durante 60 semanas, e cerca de 80% dessas células permaneceram assim por 2 anos no meio Murashige & Skoog, suplementado com 4 µm Picloram no escuro a 25°C.

Maruyama *et al.* (1997) demonstraram para *Cedrela odorata*, que propágulos vegetativos encapsulados em alginato de cálcio puderam ser armazenados, em substrato constituído de agar e água, em temperatura de 12°C por períodos de doze meses, mantendo 80% de viabilidade. Nunes (2000), também demonstrou que segmentos nodais cotiledonares e apicais de *Cedrela fissilis* apresentaram 95,8% de viabilidade quando mantidos encapsulados em alginato de cálcio, em substrato contendo ágar e água, por três meses de armazenamento a 25°C. No presente trabalho, houve redução da porcentagem de propágulos que formaram calos apenas para os segmentos apicais, quando os mesmos foram armazenados em geladeira, mas quando armazenados em temperatura de 25°C, o potencial de formação de calos, mesmo tendo declinado, ainda permaneceu em 83%, para ambos os explantes, com a vantagem de não ter sido necessário o encapsulamento em alginato de cálcio.

7 CONCLUSÕES

1. Para ambos os explantes utilizados as maiores porcentagens de formação de calos nas culturas ocorreram quando 2,5 μM ou 5 μM de ANA é combinado com 2,5 μM de BAP. A maior porcentagem de formação de ramos ocorre, para ambos os explantes, na ausência de ANA, ou na combinação de 1,25 μM de ANA com 2,5 μM de BAP. A maior porcentagem de culturas com raízes ocorre, para ambos os explantes, em 2,5 μM de ANA combinado com 2,5 μM de BAP, ou para segmentos nodais cotiledonares, em 5 μM de ANA combinado com 2,5 μM de BAP.
2. Os maiores valores de massa fresca dos calos de *Cedrela fissilis*, assim como das proporções de massa fresca dos calos em relação à massa fresca total das culturas são obtidos nas concentrações de 2,5 μM de BAP e de 5,0 μM de ANA, não havendo diferença entre os dois tipos de explantes.
3. Os calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares e foliares de plântulas de *Cedrela fissilis* cultivados em meio de cultura suplementado com 2,5 μM de BAP e de 5,0 μM apresentam os maiores valores de massa seca com oito semanas de cultivo, não havendo diferença entre os dois tipos de explantes.
4. O ANA, utilizado isoladamente, propicia o crescimento de calos mas estes apresentam massa seca inferior aos tratamentos em que o ANA, nas concentrações de 2,5 e 5 μM é combinado com o BAP. As melhores combinações de ANA e BAP para propiciar maiores valores de massa seca dos calos são: 2,5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP, 5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA e 5 μM de BAP. As combinações de 5 μM de ANA e 2,5 μM de BAP promovem o maior teor de

água nos calos por unidade de massa seca e em termos de porcentagem da massa fresca.

5. O maior crescimento em massa seca dos calos, se deu na sacarose com oito semanas de cultivo. A fonte de carbono que propicia o maior teor de água dos calos em porcentagem da massa fresca é a frutose.
6. As maiores taxas de crescimento em massa seca por intervalos de quatro semanas são obtidas com a sacarose. O maior acúmulo de água nos calos ocorre no intervalo de 0-4 semanas de cultivo, sendo maior com frutose.
7. A adição de 2,73 mM de glutamina ao meio de cultura estimula o crescimento em massa seca dos calos apenas na presença de 87,6 mM de sacarose. Na presença de 58,4 mM e de 116,8 mM de sacarose, a concentração de 2,73 mM de glutamina reduz o crescimento dos calos em massa seca, em relação aos tratamentos com apenas sacarose, nas respectivas concentrações. Os menores teores de água dos calos ocorre com 87,6 mM de sacarose, na ausência de glutamina e com 116,8 mM de sacarose, na presença ou ausência de glutamina.
8. Os maiores valores de massa seca dos calos são obtidos na presença da luz, tanto após quatro quanto após oito semanas de cultivo, mas os maiores valores de teor de água ocorrem no escuro com oito semanas de cultivo ou na luz, com quatro semanas de cultivo.
9. As idades das plântulas de *Cedrela fissilis* de onde são removidos os segmentos nodais cotiledonares não influenciam o crescimento dos calos em massa seca, mas calos produzidos a partir de plântulas de cinco semanas de idade apresentam maior

teor de água, tanto em porcentagem da massa fresca como por unidade de massa seca.

10. Quando se utilizam segmentos nodais cotiledonares de plântulas de *Cedrela fissilis* com 18-21 semanas de idade, os maiores valores em massa seca dos calos são obtidos após 9-10 semanas de cultivo, não havendo alteração no teor de água.
11. O rendimento de óleos essenciais produzidos por calos de *Cedrela fissilis* cultivados na luz, durante 9 semanas em meio de cultura contendo 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA é de 1,17% da massa seca.
12. Os calos produzidos, durante nove semanas, na presença de 2,5 μM de BAP e 5 μM de ANA, no escuro, apresentam 7 compostos voláteis enquanto que os produzidos na luz apresentam 12 compostos voláteis identificados. O linalol é o composto majoritário, tanto na luz como no escuro. Em ambas as condições são produzidos o 1,8-cineol, cânfora e 3-careno. Apenas na luz são produzidos o tetradecano e o tetradecanol. O germacreno e fenol 2,6-bis (1,1-dimetil etil-4-metil) aparecem em maiores proporções na luz.
13. Os segmentos nodais foliares e apicais de plântulas de *Cedrela fissilis* toleram o armazenamento, por 6 semanas, em meio de cultura MS, com metade da concentração salina tanto a 5°C no escuro como em 25°C na luz. A massa seca e o teor de água dos calos produzidos a partir dos segmentos nodais foliares armazenados a 5°C no escuro é maior do que a produzida pelos calos de segmentos apicais armazenados na mesma condição, enquanto que a 25°C as massas secas são

iguais. Não há diferença entre as massas secas dos calos produzidos após as diferentes condições de armazenamento dos explantes.

14. As sementes de *Cedrela fissilis* toleram o armazenamento em nitrogênio líquido por quinze meses, assim como o descongelamento lento. Após a criopreservação as sementes podem ser mantidas por até duas semanas em temperatura ambiente ou geladeira, sem redução da porcentagem de germinação.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem informações preliminares sobre o crescimento dos calos de *Cedrela fissilis*, assim como o potencial dos mesmos para futuros estudos sobre os óleos essenciais e demais constituintes. O fato dos calos crescerem na presença de diferentes combinações de reguladores de crescimento, em diferentes fontes de carbono, na presença ou ausência da luz e de diferentes concentrações de glutamina é relevante, pois permitirá que futuras pesquisas sejam conduzidas sobre o efeito da manipulação destes parâmetros sobre os constituintes voláteis dos mesmos.

O fato de as sementes tolerarem a criopreservação e poderem ser conservadas por até quinze meses estimulam o desenvolvimento de pesquisas por períodos maiores de tempo. Da mesma forma, o fato dos propágulos vegetativos armazenados por seis semanas, através de métodos de restrição do crescimento, terem mantido a habilidade de formar calos, aponta para a necessidade de desenvolvimento de novos experimentos, por períodos mais longos de tempo. A utilização de técnicas de encapsulamento em alginato e de criopreservação poderá otimizar a conservação *in vitro* de propágulos vegetativos a serem utilizados, tanto para a iniciação de sistemas de cultura de calos como de sistemas de micropropagação.

Os resultados promissores obtidos neste trabalho reforçam, portanto, a necessidade da continuidade dos estudos sobre a utilização da abordagem biotecnológica para investigar mais profundamente o potencial da utilização de sistemas de cultura *in vitro* de *Cedrela fissilis*, para a produção dos metabólitos secundários, assim como sobre o desenvolvimento de sistemas de conservação de germoplasma a longo prazo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S.M.M.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PINHEIRO, A.L.; VILELA, E.F. Limonoids from *Toona ciliata* and speculations on their chemosystematic and ecological significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 3, p. 323-328, 1994.

AHN, J.; CHOI, S.; LEE, C. Cytotoxic limonoids from *Melia azedarach* Vat. Japonica. **Phytochemistry**. v.36. n. 6, p. 1493-1496, 1994..

ALIERO, B.L. Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n.9, p. 325-327, 2003.

AMUTHA, S.; GANAPATHI, A.; MURUGANANTHAM, M. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 203-207, 2003.

ANZIDEI, M.; BENNICI, A.; TANI, S.S.C.; MORI, B. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* histological observations of developing embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 69-79, 2000.

ARGÜELLES, T.; FERNÁNDEZ, G. **Potencial Citostático de um exudado de semillas de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) em germinación**, 2000. Disponível: <http://www.dominguezia.org.ar/volumen/articulos/17-1.pdf>

BENSON, E. E. Cryopreservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) – **Plant Conservation Biotechnology**, London, Taylor and Francis Ltd, p. 83-95, 1999.

BHAU, B.S; WAKHLU, A.K. Effect of genotypes, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 25-29, 2001.

BIAN, H.W.; WANG, J.H.; LIN, W.Q.; HAN, N.; ZHU, M. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-likebodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. **Journal of Plant Physiology**, n. 159, p. 1139-1145, 2002.

BICKNELL, R.A. Micropropagation of *Hieracium aurantiacum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 197-199, 1994.

BLANC, G.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; TEISSON, C.; LARDET, L.; CARRON, M. P. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p.103-112, 1999.

BOHNENSTENGEL, F. I.; WRAY, V.; WITTE, L.; SRIVASTAVA, T. P.; PROKSCH, P. Insecticidal meliacarpins (C-*seco* limonoids) from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, n. 50, p. 977-982, 1999.

BONGA, J.M. The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating shoots from explants from mature *Larix decidua* and *Larix xeurolepis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 195-200, 1997.

BONNIER, F.J. M. & VAN TUYL, J.M. Long term *in vitro* storage of lily: Effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 81-87, 1997.

BORGES, L.M.F.; FERRI, P. H.; SILVA, W. J.; SILVA, W. C.; SILVA, J. G. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, n.17, p. 228-231, 2003.

BURNETT, L.; ARNOLDO, M.; YARROW, S.; HUANG, B. Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa ssp. oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p.253-256, 1994.

CAMPOS, A. M.; OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, M. I.; BRAZ, R. F.; MATOS, F. J. A. Triterpenes from *Cedrela odorata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1225-1229, 1991.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras** – Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo, PR. EMBRAPA-CNPQ/SPI. 1994. 639p.

CHANG, H.C.; HUNG, W.; HUANG, M.; HSU, H. Extract from the leaves of *Toona sinensis* Roemor exerts potent antiproliferative effect on human lung cancer cells. **American Journal of Chinese Medicine**, n. 30, p. 307-314, 2002.

CHATTOPADHYAY, R.R.; CHATTOPADHYAY, R.N e MAITRA, S.K. Possible mechanism of antiinflammatory activity of *Azadirachta indica* leaf extract. **Indian Journal of Pharmacology**, n.25, p. 99-100, 1993.

CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Guaiane sesquiterpenes from *Amoora rohituka*. **Phytochemistry**, v. 62, n.8, p.1213-1216, 2003.

CRECHE, J.; RIDEAU, M.; LECLERC, J.C. Photosynthesis in callus cultures of *Choisya ternata* (Rutaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.37, p. 9-14, 1994.

CUI, Y.; HAHN, E.; KOZAI, T.; PAEK, K. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p.219-226, 2000.

DECRUSE, S.W.; SEENI, S.; PUSHANGADAN, P. Effects of cryopreservation on seed germination of selected rare medicinal plants of India. **Seed Science and Technology**, v. 27, n.2, p. 501-505, 1999.

DOBOS, E.; DÁNOS, B.; LÁSZLÓ-BENCSIK, A. Callus induction and shoot regeneration in *Sempervivum tectorum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p. 141-143, 1994.

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F., ANTHONY, F.; LOUARN, J.; HAMON, S. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructs*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, v. 8, n.1, p. 9-15, 1998.

ELKONIN, L. A.; PAKHOMOVA, N. V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.173-177, 2000.

EL-LAKANY, M. H. Rapid propagation of fast-growing tree species in developing countries; its potentials, constraints and future developments. In: BAKER, F. W. G. (org.) **Rapid propagation of fast-growing tree species**, Melkshan: Redwood Press, CASAFA report series n. 3, p. 102-108, 1992.

ENGELMANN, F., DUSSERT, S. Current development of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. **Cahiers Agricultures**, n. 9, p. 237-245, 2000.

FENG, R.; CHEN, W.; ISMAN, M.B. Synergism of malathion and inhibition of midgut esterase activities by an extract from *Melia toosendan* (Meliaceae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 53, p. 34-41, 1995.

FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO, C. F. F. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p. 246-248, 2002.

FORD-LLOYD, B.V.; JACKSON, M.T. Biotechnology and methods of conservation of plant genetic resources. **Journal of Biotechnology**, n. 17, p. 247-256, 1991.

FUENTES, S.R.L.; CALHEIROS, M.B.P.; MANETTI-FILHO, J; VIEIRA, L.G.E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.5-13, 2000.

GARIN, E.; BERNIER-CARDOU, M.; ISABEL, N.; KLIMASZEWSKA, K.; PLOURDE, A. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, v. 62, p.27-37, 2000.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. **Statistical Procedures for Agricultural Research**. 2^a ed., Singapore: John Wiley & Sons, 1984. 660 p.

GONZALEZ-BENITO, M. E., IRIONDO, J. M., PÉREZ-GARCÍA, F. Seed cryopreservation: an alternative method for conservation of Spanish endemics. **Seed Science Technology**, n. 26, p. 257-262, 1998.

GONZALEZ-BENITO, M. E.; MARTÍN, C.; IRIONDO, J. M. Conservation of the rare and endangered plants endemic to Spain. In BENSON, E. E. (Ed.) – **Plant Conservation Biotechnology**, London, Taylor and Francis Ltd., p. 251-264, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**: Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas (A.C Torres; L.S. Caldas, eds.), Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1990. p.99-169.

GREGER, H.; PACHER, T.; BREM, B.; BACHER, M.; HOFER, O. Insecticidal flavaglines and other compounds from fijian *Aglaia* species. **Phytochemistry**, v.57, n.1, p.57-64, 2001.

HAGEN, S.R.; MUNETA, P. Effect of temperature on carbohydrate content, ADP glucose pyrophosphorylase, and ATP and Ppi-dependent phosphofructokinase activity of potato tuber callus tissue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p. 115-121, 1993.

HAINES, R. **Biotechnology in Forest tree improvement with special reference to developing countries**. Rome: FAO/IBPGR Forest Paper n° 118. 1994. 230 p.

HAMMAD, E. M. A.; NEMER, N. M.; KAWAR, N. S. Efficacy of Chinaberry tree (Meliaceae) aqueous extracts and certain insecticides against the pea leafminer (Diptera: *Agromyzidae*). **Journal of Agricultural Science**, n.134, p. 413-420, 2000.

HAMMAD, E.M. A.; ZOURNAJIAN, H. e TALHOUK, S. Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Hom., *Aleyrodidae*). **Journal Applied Entomology**, n. 125, p. 483-488, 2001.

HAN, D.; NIIMI, Y.; NAKANO, M. Long term maintenance of an anther-derived haploid callus line of the asiatic hybrid lily “connecticut king”. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 215-219, 2000.

HASSON, E. & POLJAKOFF-MAYBER, A. Callus culture from hypocotyls of *Kosteletzkya virginica* (L.) seedlings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 279-285, 1995.

HISHAM, A.; AJITHA BAI, M.D.; JAYAKUMAR, G.; NAIR, M.S.; FUJIMOTO, Y. Triterpenoids from *Dysoxylum malabaricum*. **Phytochemistry**, v.56, n.4, p.331-334, 2001.

HOFFMANN, K. H.; LORENZ, M. W. Recent advances in hormones in insect pest control. **Phytoparasitica**, v.26, n.4, p.1-8, 1998.

HOQUE, E.M.; MANSFIELD, J. W. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of *Indica Rice* genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 217-223, 2004.

HOUGHTON, P.H.; RAMAN, A. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts**. New York: Chapman e Hall, 1988.

JOLY, A. B. **Botânica** – Introdução à taxonomia vegetal. Editora Nacional. 7ª ed. São Paulo, SP. 1985. 776 p.

KANNAN, V.R.; JASRAI, Y. T. Micropropagation of *Gmelina arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 269-271, 1996.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.28, p.1-3, 2003.

KIM, H.H.; CHA, Y.S.; BAEK, H.J.; CHO, E.G.; CHAE, Y.A., ENGELMANN, F. Cryopreservation of tea (*Camellia sinensis* L.) seeds and embryonic axes. **Cryoletters**, v.23, n.4, p. 209-216, 2002.

KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catatinense – Meliáceas**. Itajaí, SC. 1984. 140 p.

KRIKORIAN, A. D.; KELLY, K.; SMITH, D.L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies, P.J. (ed.) - **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 778-784.

KUMAR, S. S. R.; SEINIVAS, M.; YAKKUNDI, S. Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v. 43, n.2, p. 451-45, 1996.

LAGO, J. H. G.; ÀVILA, P.; AQUINO, E. M.; MORENO, P. R. H.; OHARA, M. T.; NIMBERGER, R. T.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Volatile oils from leaves and stem barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): chemical composition and antibacterial activities. **Flavour and Fragrance Journal**, n. 19. p. 1-4, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3ª ed. volume I e II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1998.

LUO, XIAO-DONG; WU, SHAO-HUA; MA, YUN-BAO; WU, DA-GANG. Components of *Cipadessa baccifera*. **Phytochemistry**, v.55, n.8, p.867-872, 2000.

MAIA, B.H.L.N.S.; PAULA, J.R.; SANT'ANA, J. *et al.* Essential oils of *Toona* and *Cedrela* species (Meliaceae): Taxonomic and Ecological implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.11, n.6, p. 629-639, 2000.

MAKUNGA, N.P.; VAN STADEN, J.; CRESS, W.A. The effect of light and 2,4-d on anthocyanin production in *Oxalis reclinata* callus. **Plant Growth Regulation**, v.23, n.4, p.153-158, 1997.

MARQUES, D. A.; SHEPHERD, S. L. K.; CROCOMO, O. J. Influência de fontes de nitrogênio sobre o desenvolvimento das gemas axilares de explantes caulinares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.2, 1998.

MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K.; SAITO, A. Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D.Don, by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C. **Plant Cell Reports**, n. 16, p.393-396, 1997.

MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B. Recalcitrant seed Biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) – **Plant Conservation Biotechnology**, London: Taylor and Francis Ltd., 1999. p. 265-276.

MEDEIROS, J. D. A biotecnologia e a extinção de espécies. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p.109-113, 2003.

MONTEUUIS, O.; BON, M. C. Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p.173-177, 2000.

MORATELLI, E.; VIANA, A.M. **Efeito da criopreservação na germinação e crescimento inicial de plântulas de *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae)**. 2003. TCC. UFSC. Florianópolis, SC.

MORELLATO, L. P. C. **Estudo na Fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no sudoeste do Brasil**. 1991. Tese de Doutorado. UNICAMP. São Paulo. SP.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. "A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissuecultures". **Physiology Plantarum**, n.15, p. 473-497, 1962.

NDUNG'U, M.; HASSANALI, A.; HOOPER, A. M.; CHHABRA, S.; MILLER, T. A.; PAUL, R. L.; TORTO, B. Ring A-*seco* mosquito larvicidal limonoids from *Turraea wakefieldii*. **Phytochemistry**, n.64, p.817-823, 2003.

NGUYEN, Q.; KOZAI, T.; NGUYEN, U. V. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 58, p.51-57, 1999.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n. 2, p. 11-18, 2001.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciências Agrotécnicas**, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

NOBRE, J.; SANTOS, C.; ROMANO, A. Micropropagation of the Mediterranean species *Viburnum tinus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p. 75-78, 2000.

NUNES, E. C., CASTILHO, C. V., MORENO, F. N., VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, n.1, p.259-268, 2002.

NUNES, E. C.; BENSON, E. E.; OLTRAMARI, A. C.; ARAUJO, P. S.; MOSER, J. R. and VIANA, A.M. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 12. p. 837-848, 2003.

NUNES, E.C. Sistemas de Cultura e Conservação *in vitro* para *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae).2000. Dissertação. UFSC. Florianópolis, SC.

OELRICHS, P. B.; HILL, M. W.; VALLEY, P. J.; MACLEOD, J. K.; MOLINSKI, T. F. Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 22, n.2, p.531-534, 1983.

OKEMO, P. O.; MWATHA, W. E.; CHHABRA, S. C.; FABRY, W. The kill kinetics of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **African Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 2001.

ORTEGO, F.; LOPEZ-OLGUIN, J.; RUIZ, M.; CASTANERA, P. Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato beetle larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 63, p. 76-84, 1999.

PATINÑO, F. 1997. Recursos Genéticos de Swietenia y Cedrela en los Neotrópicos. Propuestas para Acciones Coordinadas. **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación**, p 58.

PETERSEN, K. K.; HANSEN, J.; KROGSTRUP, P. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of Miscanthus x ogiformis Honda "giganteus". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 58, p.189-197, 1999.

PITA, J. M.; SANZ, V.; ESCUDERO, A. Seed cryopreservation of seven Spanish native pine species. **Silvae Genetica**, v. 47, n.4, p. 220-223, 1998.

PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; JÚNIOR, A. S.; SMÂNIA, E. F. A.; BRAZ, R. F. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Z. Naturforsch**, n.57, p. 483-488, 2002.

RAMAROSANDRATANA, A.V.; STANDEN, J. V. Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.249-255, 2003.

REED, B. M.; SCHWANKE, S.; SHALA, R. Pear Seed Retain viability after Liquid Nitrogen Immersion. **Hortscience**, v. 36, n. 6, p. 1121-1122, 2001.

REITZ, R.; KLEIN, RM; REIS, A. **Madeiras do Brasil**. Florianópolis: Ed. Lunardelli. 1979.

REY, H. Y.; MROGINSKI, L .A. Regeneration of plants from callus tissue of *Aeschynomone sp.* (Leguminosae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p.185-190, 1996.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeira úteis do Brasil** – Manual de Dendrologia Brasileira. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. 1978. 296p.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: Ed. EPU. 1976. 207 p.

SAIRAM, R.V.; FRANKLIN, R. H.; SMITH, B.; MEECKER, K.; KASHIKAR, N.; PARANI, M.; ABED, D. A.; ISMATL, S.; BERRY, K.; GOLDMAN, S. L. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 79-85, 2003.

SCHESTIBRATOV, K. A.; MIKHAILOV, V.; DOLGOV, S. V. Plantlet regeneration from subculture nodular callus of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 139-146, 2003.

SCHNEIDER, C.; BOHNENSTENGEL, F. I.; NUGROHO, B. W.; WRAY, V.; WITTE, L.; HUNG, P. D.; KIET, L. C.; PROKSCH, P. Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia spectabilis* (Meliaceae). **Phytochemistry**, v.54, n.8, p.731-736, 2000.

SCOTT, P.; LYNE, R. L. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, p. 129-133, 1994.

SHIMURA, H.; KODA, Y. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *Rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 273-276, 2004.

SHU-TONG, W.; XIAO-YAN, W.; JUN-LING, L. e KE-QUIANG, C. Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity against *Phytophthora infestans*. **Journal Agricultural University of Hebei**. 2001.

SILVA, M. F. G. F.; AGOSTINHO, S. M. M.; PAULA, J. R., OIANO, J. N.; CASTRO-GAMBOA, I.; RODRIGUES, E. F. FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Chemistry of *Toona ciliata* and *Cedrela odorata* graft (Meliaceae): chemosystematic and ecological significance. **Pure Applied Chemistry**, v.71, n.6, p.1083-1087, 1999.

SOARES, M. G.; PERREIRA, L. G. B.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, E. F.; OHASHI, O. S. Electrophysiological responses of female and male *Hypsipyla grandella* (Zeller) to *Swietenia macrophylla* essential oils. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, n.9, p. 2143-2151, 2003.

STANWOOD, P. C. **Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation**. In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*: Ed. K. Kartha. 1985. p.199-225.

STANWOOD, P. C. Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of Seed Technology**, v. 5, p.26-31, 1980.

STANWOOD, P.C. Survival of Sesame Seeds at the Temperature (-196°C) of Liquid Nitrogen. **Crop Science**, v. 27, p.327-331, 1987.

TANG,W.; HARRIS, L. C.; OUTHAVONG, V.; NEWTON, R. J. The effect of different plant growth regulators on adventitious shoot formation from *Virginia Pine (Pinus virginiana)* zygotic embryo explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 237-240, 2004.

THAO, N. T. P.; OZAKI, Y e OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 285-289, 2003.

THENGANE, S.R.; KULKARNI, V.A; SHRIKHANDE, V. A.; JOSHI, S. P.; SONAWANE, K. B.; KRISHNAMURTHY, K. V. Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 247-251, 2003.

TOUCHELL, D. H.; CHIANG, V. L.; TSAI, C. J. Cryopreservation embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. **Plant Cell Reports**, v.21, n. 2, p. 118-124, 2002.

TREJO-TAPIA, G.; AMAYA, U. M.; MORALES, G. S.; SÁNCHEZ A. J.; BONFIL, B. M.; RODÍGUEZ-MONTOY, M.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.41-46, 2002.

TUESTA, S. Y. M. **Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de cotiledones**. 2003. TCC. Faculdade de Ciências. Universidade Nacional Agrária La Molina. Lima. Peru. 2003.

TYANKOVA, N.D.; ZAGORSKA, N.A.; DIMITROV, B. Callus induction and organogenesis in wheat/ *Aegilops longissima* chromosome addition lines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72. p.193-197, 2003.

VAN DER VALK, P; RUIS, F.; TETTELAAR, A. M.; VAN DE VELDE, C. M. Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. The effect of benzyladenine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p.101-103, 1995.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; ANAND, R. P.; ANBAZHAGAN, R. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 23-28, 2000.

VIANA, A. M.; MAZZA, M. C.; MANTEL, S. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploration of plants from Brazilian Rain Forests. In: BENSON, E. E. (Ed.). – **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor and Francis Ltd, 1999. p. 277-295.

WALTERS; C.; TOUCHELL, D. H.; POWER, P.; WESLEY-EMITH, J.; ANTOLIN, M. F. A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. **Cryoletters**, n.23, p. 209-216, 2002.

WANG, H. C.; CHEN, J. T.; WU, S.; LIN, M.; CHANG, W. Plant regeneration through shoot formation from callus of *Areca catechu*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 95-98, 2003.

WANG, Q.; TANNE, E.; ARAV, A.; GAFNY, R. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 41-46, 2000.

WEWETZER, A. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potencial for production of Azadirachtin. **Phytoparasitica**, v.26, n.1, p. 47-52, 1998.

WU, F.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of auxins and cytokinins on embryon formation from root-derived callus of *Oncidium* "Gower Ramsey". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p. 107-109, 2004.

YUAN, Y.; HU, T.; YANG, Y. Effects of auxins and cytokinins on formation of *Cataranthus roseus* G. Don multiple shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p.193-196, 1994.