

EDUARDO DA COSTA NUNES

**SISTEMAS DE CULTURA E CONSERVAÇÃO “IN VITRO” PARA  
*Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
visando a obtenção de grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Viana

FLORIANÓPOLIS  
2000

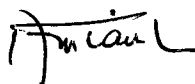
**"SISTEMAS DE CULTURA E CONSERVAÇÃO *IN VITRO*  
PARA *CEDRELA FISSILIS VELL.* (MELIACEAE)"**

**POR**

**EDUARDO DA COSTA NUNES**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



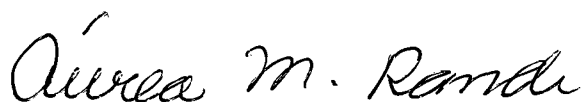
---

**Profa. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC**  
**Orientadora e Coordenadora do Programa de**  
**Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**



---

**Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva**  
**FIT/ECA/UFSC**



---

**Profa. Dra. Áurea Maria Randi**  
**BOT/CCB/UFSC**



---

**Prof. Dr. Énio Luiz Pedrotti**  
**FIT/CCA/UFSC**

**Florianópolis, agosto de 2000**

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão à professora Dra. Ana Maria Viana pela orientação, dedicação, paciência e ensinamentos, dispensados para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, principalmente à minha mãe Bia, minhas irmãs Ediléia e Heloisa e minha sobrinha Luísa, pelo incentivo, pela alegria e descontração que me passavam nos momentos de cansaço e desânimo.

À Mary Paula, pelos momentos em que, mesmo muitas vezes longe, soube demonstrar seu carinho, preocupação e compreensão, me estimulando sempre.

Ao Prof. Gilmar P. Plá, coordenador do Curso de Agronomia/UNISUL, pela amizade, incentivo e apoio institucional.

Aos demais amigos do curso de Agronomia da UNISUL, pelo apoio, confiança, compreensão e incentivo demonstrados em todo o período em que estive afastado.

Às professoras Dras. Aurea M. Randi e Terezinha Paulilo, pelas sugestões, apoio e principalmente pela amizade que construímos.

À Dra. Erica Benson da University of Albertay Dundee (Escócia), pelas sugestões nos experimentos de criopreservação.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Claudete, Juliana, Sônia, Alexandre, pela amizade, auxílio na realização dos experimentos e momentos de descontração.

Aos colegas da turma de mestrado, pela possibilidade de fazer novas e concretas amizades.

A todos os professores do curso, que tentaram da melhor forma possível, transmitir os seus conhecimentos.

Ao João Santana, pelo companheirismo e pela qualidade do atendimento prestado.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realização deste curso.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, expresso os meus agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	Vii
RESUMO	Viii
SUMMARY	Ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO	5
2.1. Biologia/Ecologia	5
2.2. Importância Econômica e Produção de Compostos Bioativos	6
2.3. Biotecnologia	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Micropropagação de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)	10
3.1.1. Germinação e estabelecimento “in vitro”	10
3.1.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	11
3.1.3. Enraizamento “in vitro” de segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	11
3.1.4. Aclimatação	12
3.2. Efeito de Reguladores de Crescimento e Tipos de Explantes na Produção de Calos de <i>Cedrela fissilis</i> Vell.	13
3.2.1. Obtenção de plântulas axênicas de <i>C. fissilis</i>	13
3.2.2. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes de plântulas de <i>C. fissilis</i> germinadas na presença e ausência de luz	14
3.2.3. Efeito da posição do explante, das formulações salinas e da concentração de sacarose na formação de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	14
3.3. Morfogênese “in vitro” em Cotilédones de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)	15
3.3.1. Morfogênese “in vitro” em cotilédones isolados de <i>C. fissilis</i>	15
3.3.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos medianos de cotilédones de <i>C. fissilis</i>	16
3.4. Conservação “In vitro” de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)	16
3.4.1. Conservação “in vitro” de ápices e segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	16

3.4.2. Criopreservação de sementes de <i>C. fissilis</i>	17
<b>3.5. Análise Estatística</b>	18
<b>4 RESULTADOS</b>	19
<b>4.1. Micropropagação de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)</b>	19
4.1.1. Germinação “in vitro” de <i>C. fissilis</i>	19
4.1.2. Crescimento inicial de plântulas de <i>C. fissilis</i> “in vitro”	21
4.1.3. Morfogênese “in vitro” em segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	23
4.1.4. Enraizamento “in vitro” de segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	27
4.1.5. Aclimatação	31
<b>4.2. Efeito de Reguladores de Crescimento e Tipos de Explantes na Produção de Calos de <i>Cedrela fissilis</i> Vell.</b>	36
4.2.1. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes de plântulas de <i>C. fissilis</i> germinadas na presença de luz	36
4.2.2. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de segmentos de raiz e hipocótilo de plântulas de <i>C. fissilis</i> germinadas na ausência de luz	42
4.2.3. Formação de calos em segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	46
4.2.3.1. Efeitos da posição do explante no meio de cultura	46
4.2.3.2. Efeito de meios de cultura	47
4.2.3.3. Efeito da concentração de sacarose	48
<b>4.3. Morfogênese “In vitro” em Cotilédones de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)</b>	50
4.3.1. Morfogênese “in vitro” em cotilédones isolados de <i>C. fissilis</i>	50
4.3.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos medianos de cotilédones de <i>C. fissilis</i>	53
<b>4.4. Conservação “In vitro” de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)</b>	55
4.4.1. Conservação “in vitro” de ápices e segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	55
4.4.1.1. Desenvolvimento dos explantes encapsulados em meio de recuperação padrão	55
4.4.1.2. Armazenamento de ápices e segmentos nodais cotiledonares encapsulados em substrato com diferentes concentrações de ágar	56
4.4.2. Criopreservação de sementes de <i>C. fissilis</i>	63
<b>5 DISCUSSÃO</b>	68
<b>5.1. Micropropagação de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)</b>	68
5.1.1. Germinação “in vitro” de <i>C. fissilis</i>	68
5.1.2. Crescimento inicial de plântulas de <i>C. fissilis</i> “in vitro”	70
5.1.3. Morfogênese “in vitro” em segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	71

5.1.4. Enraizamento “in vitro” de segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	76
5.1.5. Aclimatação	78
<b>5.2. Efeito de Reguladores de Crescimento e Tipos de Explantes na Produção de Calos de <i>Cedrela fissilis</i> Vell.</b>	80
5.2.1. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes de plântulas de <i>C. fissilis</i> germinadas na presença de luz	80
5.2.2. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de segmentos de raiz e hipocótilo de plântulas de <i>C. fissilis</i> germinadas na ausência de luz	81
5.2.3. Formação de calos em segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	83
5.2.3.1. Efeitos da posição do explante no meio de cultura	83
5.2.3.2. Efeito de meios de cultura	84
5.2.3.3. Efeito da concentração de sacarose	85
<b>5.3. Morfogênese “In vitro” em Cotilédones de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)</b>	86
5.3.1. Morfogênese “in vitro” em cotilédones isolados de <i>C. fissilis</i>	86
5.3.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos medianos de cotilédones de <i>C. fissilis</i>	88
<b>5.4. Conservação “In vitro” de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)</b>	90
5.4.1. Conservação “in vitro” de ápices e segmentos nodais cotiledonares de <i>C. fissilis</i>	90
5.4.2. Criopreservação de sementes de <i>C. fissilis</i>	92
<b>6 CONCLUSÕES</b>	95
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

MS	- Meio de Murashige & Skoog (MS, 1962)
M/2	- Metade da concentração salina do meio MS
BA	- 6-benzilaminopurina
NAA	- Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
2,4-D	- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
IBA	- Ácido indol-3-butírico
2iP	- 2-isopentiladenina
WPM	- Meio de LLoyd & McCown (1981), Wood Plant Medium
Kao	- Meio de Kao & Michayluk (1974)
SCHENK	- Meio de Schenk & Hildebrandt (1972)
WHITE	- Meio de White (1963)
B5	- Meio de Gamborg, Miller & Ojima (1968)
NaOH	- Hidróxido de sódio
HCl	- Ácido clorídrico
TDZ	- Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-feniluréia)

## RESUMO

*Cedrela fissilis* Velloso (Meliaceae) é uma espécie nativa da Floresta Atlântica (Sul do Brasil) em risco de extinção, que produz madeira de grande valor econômico. Como outros membros da família Meliaceae, devido ao seu grande valor, poderia ser explorada em programas de reflorestamento, mas danos causados pelo severo ataque de *Hypsipyla grandella* Zell. (Pyralidae) e *Oncideres* sp. (Cerambycidae) causando perfurações nos brotos, restringem a sua utilização em plantios em larga escala. Os objetivos deste estudo foram o desenvolvimento de sistemas de cultura e conservação "in vitro" para esta espécie. Um protocolo de micropropagação eficiente foi desenvolvido usando-se segmentos nodais cotiledonares de plântulas axênicas. A proliferação de ramos foi significativamente afetada por BA, sendo que valores máximos de multiplicação foram obtidos em meio MS suplementado com 0.25-0.5 mg/l. O enraizamento ocorreu com sucesso em meio MS/2 desprovido de reguladores de crescimento, obtendo-se de 87-100% de microestacas enraizadas, após 12 dias. As plantas micropropagadas foram aclimatadas com sucesso, obtendo-se após 21 dias, 100% de sobrevivência em areia esterilizada, mas para o desenvolvimento posterior a mistura areia/solo (1:1) foi o melhor substrato. Altas frequências de indução de calos foram obtidas a partir de segmentos nodais cotiledonares, de segmentos de epicótilo e hipocótilo e de segmentos cotiledonares. Efeitos sinérgicos e máximo crescimento de calos foram observados quando segmentos nodais cotiledonares foram cultivados em presença de luz, na posição vertical em meio MS suplementado com combinações de 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA ou 1.0 mg/l de BA e 0.25 mg/l de NAA. A melhor condição de cultura para iniciação e crescimento de calos a partir de segmentos de epicótilo e hipocótilo ocorreram em meio MS suplementado com 1.0 mg/l de 2,4-D ou 0.25 mg/l de NAA, no escuro enquanto que a partir de segmentos cotiledonares foi em meio MS suplementado com 3.0 mg/l BA combinado com 0.25 mg/l de NAA. Sementes foram criopreservadas com sucesso (91.6% de sobrevivência) após a imersão direta em nitrogênio líquido e descongelamento rápido a 45°C. As plântulas foram aclimatadas com sucesso, com crescimento normal, não apresentando anormalidades morfológicas. Ápices e segmentos nodais encapsulados sobreviveram ao armazenamento "in vitro" (43.7%), em substrato contendo somente água geleificada com 0.4% de ágar. O estabelecimento de protocolos de micropropagação, cultura de calos e de conservação "in vitro", possibilitam o uso das técnicas de cultura de órgãos/células para futuros estudos de propagação vegetativa, regeneração de ramos a partir de calos, transformação genética, produção de metabólitos secundários e conservação de germoplasma.



## SUMMARY

*Cedrela fissilis* Velloso (Meliaceae) is a valuable fast growing timber tree species from the endangered Atlantic rainforest (South of Brasil). Like several members of the Meliaceae it is a potentially very valuable plantation species but damage by shoot borers is the main restraint to its large scale utilization in reforestation programs. It is heavily attacked by *Hypsipyla grandella* Zell. (Pyralidae) and *Oncideres* sp (Cerambycidae). This study is focussed on the development of *in vitro* culture and *in vitro* conservation systems for this species. An efficient micropropagation protocol was developed using cotyledonary nodal segments from juvenile origin. Shoot proliferation rates were significantly affected by BA concentration and maximum multiplication rates were achieved on MS media supplemented with 0.25-0.5 mg/l. Rooting was successfully achieved with 87-100% of the microshoots on MS/2 deprived of growth regulators, after 12 days. Regenerated plants (100%) were successfully acclimatized after 21 days on sterilized sand but for further plant development the sand:soil (1:1) mixture was the best substrate. Callus induction at high frequencies were achieved from cotyledonary nodal segments, epycotil and hypocotil segments and from cotyledon segments. Synergistic effects and maximum callus growth were observed when cotyledonary nodal segment explants were cultured in the light and oriented in the vertical position on MS medium supplemented with combinations of either 0.5 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA or 1.0 mg/l BA and 0.25 mg/l NAA. The best culture conditions for callus initiation and growth from epycotil and hypocotil segments were achieved on MS supplemented with either 1.0 mg/l 2,4-D or 0.25 mg/l NAA, in the dark, and from cotyledon segments on MS supplemented with 3.0 mg/l BA combined with 0.25 mg/l NAA. Seeds were successfully cryopreserved (91.6% survival rate) after direct immersion in liquid nitrogen and rapid warming (45°C). The seedlings were successfully acclimatized and grew well without morphological abnormalities. Encapsulated shoot tips and nodal segments survived the *in vitro* storage (43.7%) on substrate containing only water solidified with 0.4% agar. The availability of micropropagation, callus culture and *in vitro* conservation protocols offer the possibilities to use the organ/cell culture techniques for subsequent studies on vegetative propagation, shoot regeneration from callus, genetic transformation, secondary metabolism and germplasm conservation.

## 1-INTRODUÇÃO

As florestas são a fonte principal de produtos básicos necessários à sobrevivência dos seres humanos, tais como madeira, frutas, fibras, combustíveis, produtos medicinais, resinas, óleos essenciais, pigmentos, cosméticos, inseticidas e repelentes naturais. A biodiversidade das florestas tropical e subtropical possibilita que plantas sejam utilizadas como matéria-prima para a produção de analgésicos, diuréticos, antibióticos e tranquilizantes e os valores comercializados mundialmente alcançam ao redor de 20 bilhões de dólares anuais (MYERS 1983, 1988). TZFIRA et al. (1998), reforçam que as florestas são muito importantes para economia mundial e para manutenção e preservação de nossos ecossistemas. Segundo estes autores, as espécies arbóreas florestais possuem uma grande utilização comercial como na construção civil, matéria-prima para papel e produção de polpa e como fonte de energia. A demanda global por madeira, para estes usos, não terá decréscimo num futuro próximo, muito pelo contrário, tenderá a aumentar.

A Floresta Atlântica está localizada na costa Atlântica entre as latitudes 6°S e 30°S e longitudes 30°W para 50°W, com altitudes variando do nível do mar até 2700 metros. Se estende desde o Estado do Rio Grande do Norte, na região Nordeste do Brasil, até o Estado do Rio Grande do Sul, no extremo Sul do país, região ocupada por 70% do total da população brasileira. A floresta original foi devastada quase que completamente nos Estados de Sergipe, Pernambuco e Alagoas, restando 1-3% da floresta original e vegetação secundária. Nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná (Sudeste do Brasil) restam de 10-19% da floresta original e Santa Catarina (Sul do Brasil) é o Estado com a maior área de floresta remanescente, com 31% (CIMA, 1991). Apesar do nível drástico de desmatamento, a Floresta Atlântica apresenta o mais alto nível de diversidade de plantas, aproximadamente 10 mil espécies (MORI, BOOM & PRANCE, 1981; Fundação SOS Mata Atlântica, 1992; VIANA et al., 1997).

Vários fatores bióticos e abióticos contribuíram para que a Floresta Atlântica se tornasse um dos ecossistemas com maiores riscos de extinção do mundo (Fundação SOS Mata Atlântica, 1992). Estes fatores incluem: a contínua, intensiva e seletiva extração de madeira, a expansão da agricultura nas últimas décadas e o crescimento populacional na

costa Atlântica do Brasil. REITZ et al. (1979) cita a expansão drástica da agricultura durante as décadas de 50 e 70, associada com a extração intensiva de espécies de árvores, sem o devido replantio, como as principais causas da redução das florestas nativas do Sul do Brasil. Os principais fatores bióticos, que podem interferir na regeneração natural e disponibilidade de plântulas para programas de reflorestamento ou adensamento, são a floração esporádica, e as baixas qualidade e período de viabilidade das sementes. Além disto, fatores como o crescimento lento de várias espécies, a suscetibilidade das mesmas a doenças e ataques por insetos e o pouco conhecimento sobre a ecologia e reprodução vegetativa, são causadores das principais limitações à produção comercial e à regeneração artificial (CARVALHO, 1994; VIANA et al., 1999). Desta forma, programas de conservação tem sido estabelecidos para um número muito pequeno de espécies florestais nativas brasileiras. CARVALHO (1994) menciona que entre as 100 espécies nativas mais importantes do Brasil, existem programas de conservação, “in situ” e/ou “ex situ”, para aproximadamente 17 espécies. Esse autor indica a necessidade urgente de estabelecimento de programas de conservação para espécies da Floresta Atlântica como, *Cedrela fissilis*, *Ocotea odorifera*, *Ocotea porosa*, *Ocotea catharinensis*, e *Calophyllum brasiliense*. Entretanto, o estabelecimento de estratégias de conservação das espécies nativas brasileiras exige informações sobre a biologia reprodutiva e a ecologia destas espécies e, a integração das mesmas com informações oriundas de estudos sobre a variabilidade genética e marcadores moleculares (VIANA et al. 1999). Estes autores indicam que ausência de informações sobre a estrutura genética das populações de espécies florestais brasileiras, causam restrições ao desenvolvimento de estratégias de conservação e impede a utilização sustentável destes recursos genéticos. Ressaltam ainda que, a disponibilidade crescente de informações, para várias espécies florestais nativas, sobre sistemas de cultura de embriões zigóticos, embriogênese somática, micropropagação, cultura de calos, suspensões celulares e biotecnologia da conservação, integradas com a caracterização molecular, fornecerão as bases para a integração com as abordagens convencionais, possibilitando a conservação de germoplasma de espécies nativas brasileiras, a curto, médio e longo prazos.

A Biotecnologia Vegetal, portanto, através da aplicação de técnicas de cultura “in vitro” de plantas, possibilita que novas abordagens sejam utilizadas para o resgate e conservação genética de espécies florestais, além de permitir o desenvolvimento de

sistemas de regeneração, 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). Além disto, várias outras biotecnologias vegetais que incluem a hibridização somática através da fusão de protoplastos, métodos para fertilização e desenvolvimento de embriões “in vitro”, a produção de plantas haplóides “in vitro” e a produção de sementes sintéticas usando embriões somáticos, são também essenciais para a conservação e utilização em programas de melhoramento genético de espécies florestais.

Uma aplicação importante da Biotecnologia Vegetal no melhoramento genético de espécies florestais, é possibilitar o desenvolvimento de métodos de transformação genética, capazes de tornar as plantas resistentes aos ataques por insetos, vírus, fungos, nematóides, bactérias, ou ainda tolerantes a herbicidas e ao frio. Através do estabelecimento de sistemas de regeneração direta e/ou indireta e de sistemas de transformação eficientes é possível a produção e multiplicação, em larga escala, de clones selecionados, geneticamente transformados (MERTENS et al., 1996; WRIGHT, 1997; TZFIRA et al., 1998). A engenharia genética possibilita a transferência de resistência ao ataque de insetos através de duas estratégias principais: inserção de genes, que expressam as toxinas de *Bacillus thuringiensis* ou de genes inibidores de proteinases (VAECK et al., 1989; GATEHOUSE et al., 1991; HAINES, 1994; TZFIRA et al., 1998). Por exemplo, LEPLÉ et al. apud HAINES (1994) obtiveram plantas transgênicas de álamo capazes de expressar, em altos níveis, os genes inibidores de proteinases de soja e arroz, tornando-as tolerantes ao ataque por duas espécies de coleópteros e HAINES (1994) sugere a utilização desta tecnologia como alternativa, para o desenvolvimento de resistência ao ataque por insetos em Meliáceas.

A técnica de micropropagação pode ser empregada para a propagação de árvores especialmente selecionadas (elites) e/ou das progênes dos melhores indivíduos (EL-LAKANY, 1992). A propagação clonal, por cultura de gemas ou por embriogênese somática, possibilita a produção de grande número de propágulos de plantas selecionadas e/ou transformadas geneticamente, em curto espaço de tempo, com controle fitossanitário, para programas extensivos de reflorestamento (HULSE, 1992; HARTNEY & SVENSSON, 1992; ASHMORE, 1997; TZFIRA, 1998). A aplicação de técnicas de cultura “in vitro” de embriões zigóticos, micropropagação e embriogênese somática, associadas às técnicas de conservação “in vitro”, tais como técnicas de limitação do crescimento e criopreservação,

formam a base para o estabelecimento de estratégias de conservação e manejo de recursos genéticos e utilização sustentável de espécies de árvores economicamente importantes, mas que são raras e/ou apresentam sementes recalcitrantes (FAY, 1994; ASHMORE, 1997; HARDING et al., 1997; VIANA et al., 1999).

A aplicação de técnicas de cultura “in vitro” para o desenvolvimento de cultura de células e órgãos de espécies de árvores raras, que possuem grande valor econômico e que produzem compostos biologicamente ativos, representa um enorme potencial a ser explorado. Estes sistemas podem ser utilizados para os estudos sobre as vias de biossíntese dos compostos de interesse e para manipulações que viabilizem a produção de metabólitos secundários “in vitro”. Compostos de importância produzidos naturalmente por plantas lenhosas de crescimento lento, como o taxol, são os que apresentam maior potencial para a produção através de sistemas de cultura “in vitro”. A aplicação desta tecnologia torna possível a produção de metabólitos secundários “in vitro” e o desenvolvimento de sistemas que possibilitem a conservação de linhagens celulares altamente produtoras, assegurando assim formas alternativas para exploração racional e sustentável das espécies de árvores nativas, presentes em ecossistemas ameaçados (VIANA et al. 1999).

Um fato a ressaltar é que as possibilidades biotecnológicas mencionadas acima tem sido aplicadas a um número muito pequeno de espécies florestais nativas do Brasil (VIANA et al. 1999). Os objetivos deste estudo, portanto, foram desenvolver sistemas de cultura “in vitro” para *Cedrela fissilis* Vellozo (Cedro), espécie de árvore nativa da Floresta Atlântica brasileira, através do estabelecimento de sistemas de micropropagação, de cultura de calos e de conservação “in vitro” que possibilitem futuras pesquisas visando a transformação genética, o resgate e conservação de germoplasma, a produção em larga escala de genótipos selecionados e a produção e análise de metabólitos secundários.

## 2- REVISÃO

### O GÊNERO *Cedrela*: UMA REVISÃO DA BIOLOGIA/ECOLOGIA, IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E BIOTECNOLOGIA

#### 2.1. Biologia/Ecologia

O gênero *Cedrela* pertence à família Meliaceae que apresenta gêneros de grande importância, tais como *Cedrela* (cedros) e *Swietenia* (mogno) entre outros, *Cabralea*, *Carapa*, *Guarea* e *Trichilia* (KLEIN, 1984; LORENZI, 1992). 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.

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 (PAULA et al., 1997). Este insucesso se dá em função principalmente do ataque da broca perfuradora de brotos, *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) (AGOSTINHO et al., 1994) e em menor escala, os cedros podem ser atacados pelo coleóptero serra-serra ou serrador (*Oncideres* sp.) da família Cerambycidae, que corta os ramos novos das plantas de cedro em crescimento (REITZ et al., 1979). Em função disto LORENZI (1992) recomenda que *C. fissilis* nunca seja plantada em agrupamentos homogêneos e sim em reflorestamentos heterogêneos.

O gênero *Cedrela* compreende cerca de oito espécies de ocorrência nos trópicos americanos, sendo que três delas são encontradas no Sul do Brasil (*Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata* e *Cedrela lilloi*), em regiões de Floresta Estacional Decidual ou Semidecidual (KLEIN, 1984). A espécie de cedro mais comum no Sul do Brasil é a *C. fissilis* Vellozo, com ampla dispersão por praticamente todas as florestas dos Estados do Paraná, Santa

Catarina e Rio Grande do Sul, ocorrendo porém em menor frequência em todo país. É uma espécie heliófita ou de luz difusa e seletiva higrófito, desenvolvendo-se no interior das florestas primárias, podendo também ser encontrada como espécie pioneira na vegetação secundária. Ocorre preferencialmente em solos úmidos e profundos como os encontrados nos vales e planícies aluviais. As árvores atingem de 20-35 metros de altura na maturidade. Floresce durante os meses de agosto a setembro, sendo que os frutos amadurecem durante os meses de junho a agosto, produzindo grande quantidade de sementes com alta viabilidade e que se mantêm viáveis por tempo superior a 4 meses. A germinação é abundante e ocorre em 12-18 dias. O desenvolvimento das plantas no campo é rápido, podendo atingir 3-4 metros de altura aos 2 anos (LORENZI, 1992).

*C. mexicana* M.J. Roem., que muitos autores inclusive KLEIN (1984), consideram como sendo sinônimo de *C. odorata*, ocorre desde o México até o norte da Argentina. Esta espécie apresenta dispersão restrita, descontínua e inexpressiva no sul do Brasil. É também uma espécie heliófita ou de luz difusa e seletiva higrófito, possivelmente muito rara no interior das florestas do sul do Brasil (KLEIN, 1984). É mais comum no norte do Brasil, sendo uma das madeiras mais exploradas nas florestas de terra firme da Amazônia (LISBOA et al., 1991).

## **2.2. Importância Econômica e Produção de Compostos Bioativos**

Muitos gêneros da família Meliaceae, entre eles *Cedrela* e *Swietenia*, apresentam grande valor e potencial de exploração econômica em função da excelente qualidade da madeira que produzem para diversos fins, e pela produção de compostos com ação medicinal e inseticida. Apresentam importante potencial de utilização em programas de reflorestamento de áreas degradadas, de áreas de preservação permanente e também pela possibilidade de exploração do potencial ornamental em projetos paisagísticos de parques e grandes jardins (KLEIN, 1984; LORENZI, 1992).

Várias espécies desta família possuem destacado uso na medicina natural, sendo reconhecidas por suas propriedades terapêuticas, tais como ação anti-viral, anti-helmíntica, anti-reumática e anti-inflamatória. BENENCIA et al. (1995) constataram a existência de ação no sistema imunológico, em processos relacionados às respostas inflamatórias em

vários representantes desta família, como em *Cedrela tubiflora*. Também é relatada a atividade antitumoral em extratos de *Trichilia clausenii* por PUPO et al. (1994) e tratamento de paralisia infantil com o óleo obtido de *C. fissilis*, utilizado na forma de pílulas e massagem (SOUZA & SILVA, 1994). Produzem ainda comumente, compostos químicos da classe dos triterpenos, denominados limonóides, muitos dos quais têm demonstrado bioatividade contra insetos (ISMAN et al.; CHAMPAGNE et al. apud PUPO et al., 1997). BOHNENSTENGEL et al. (1999), que pesquisam novos inseticidas de plantas da família Meliaceae, isolaram três novos derivados meliacarpim diacilados (C-seco limonóides), a partir de folhas de *Melia azaderach*, sendo que estes novos compostos mostraram forte atividade inseticida contra larvas de *Spodoptera littoralis* (Noctuidae), um inseto polífago. VALLADARES et al. (1997) avaliaram o efeito de extrato etanólico, obtido de frutos de *Melia azaderach*, como inseticida biológico em folhas de Elmo, planta ornamental na Argentina. Observaram que esses extratos exibiam atividade inseticida contra larvas e adultos de um besouro (*Xanthogalleruca luteola* Coleoptero: Chrysomelidae), constatando o controle eficiente de larvas e adultos, quando o extrato era pulverizado sobre as folhas de Elmo. Quando o extrato era aplicado diretamente sobre larvas e adultos, verificaram que somente havia controle sobre as larvas. BRAVERMAN et al. (1998) utilizaram um bioinseticida, derivado de extrato de Meliaceae, o Ag1000, para controle de vespas (*Vespula germanica*). Estas vespas são vetores de inflamações na pele e de problemas de mastite em fêmeas bovinas. Nos experimentos conduzidos os autores compararam a atividade deste bioinseticida com outros inseticidas químicos, obtendo como resultado, a repulsa total das vespas quando o Ag1000 era utilizado na isca repelente.

Foram também isolados de extrato metanólico de *Trichilia clausenii* três novos esteróides, o androsteno, pregnano e hemicetal (PUPO et al., 1997) e também um triterpenóide do tipo cicloartano (PUPO et al. apud PUPO et al. 1997). Outros triterpenóides do tipo cicloartano foram isolados de *Aglaia harmsiana*, outra Meliaceae (INADA et al., 1997).

*C. fissilis* é utilizada na medicina popular como adstringente, tônico e anti-inflamatório. Além disso, por processos de destilação da madeira obtêm-se um óleo com propriedades inseticidas (KLEIN, 1984). Fornece madeira de cor variável, de uso generalizado. Em virtude de suas ótimas e múltiplas propriedades é empregada em



compensados, contraplacados, esculturas e obras de talha, móveis em geral, construção civil, naval e aeronáutica, instrumentos musicais entre outras (LORENZI, 1992). Para PIO CORRÊA apud KLEIN (1984) *C. fissilis* é uma de nossas principais árvores e relata que, em função do seu rápido crescimento, mesmo por estacas, e pela sua utilidade, alguns cientistas franceses aconselharam seu plantio nas colônias francesas da África Ocidental. LISBOA (1994) relata que o cedro, muito provavelmente *C. fissilis*, foi extensivamente utilizado durante os séculos XVII e XVIII na manufatura de esculturas religiosas no Brasil. A espécie *Cedrela mexicana* fornece o famoso cedro espanhol, madeira que é altamente utilizada para carpintaria, outrora muito procurada para confecção de caixas de charutos (KLEIN, 1984).

### 2.3. Biotecnologia

O número de artigos científicos publicados em periódicos sobre abordagens biotecnológicas referentes às árvores nativas brasileiras é muito insignificante. Obviamente o gênero *Cedrela* não se exclui desta constatação. 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. Mesmo assim, os estudos sobre abordagens biotecnológicas em meliáceas tem se restringido a *Swietenia macrophylla* e *C. odorata*. Para *Swietenia macrophylla* são registrados, na literatura, estudos sobre produção de microplantas por processos de micropropagação, por cultura de ramos apicais e por embriogênese somática (MARUYAMA & ISHII, 1999). *C. odorata* tem sido estudada quanto à micropropagação por cultura de ramos, quanto à tecnologias de conservação “in vitro”, através do encapsulamento em alginato e criopreservação e quanto à organogênese de gemas adventícias a partir de segmentos de hipocótilo (MARUYAMA et al. 1989; MARUYAMA et al. 1997a; CERDAS et al. 1998). Em termos ainda de biotecnologia aplicada à conservação, estudos adicionais sobre criopreservação de sementes, tem sido conduzidos apenas para *Melia azadirach* e *Swietenia macrophylla* (MARZALINA & KRISHNAPILLAY, 1999) e sobre criopreservação de embriões zigóticos, apenas para *Trichilia dregeana* (BERJAK et al., 1996). Para LISBOA (1994), *C. fissilis* pode ser

considerada uma espécie em risco de extinção, em função do severo extrativismo que está sofrendo desde o período colonial do Brasil. Com relação ao potencial de uso biotecnológico de espécies de *Cedrela* há muito que ser feito e algumas possibilidades podem ser vislumbradas através dos poucos estudos conduzidos com as espécies *Swietenia macrophylla* e *Cedrela odorata*. Estudos realizados por NEWTON et al. (1995), com *C. odorata*, demonstraram que existem genótipos mais tolerantes ao ataque de mariposas, fato este relacionado a uma alta dominância apical dos ramos. Estes autores discutem que se esta capacidade de recuperação frente ao ataque, a partir de um rápido crescimento apical, puder ser identificada, processos de melhoramento genético e transformação genética de espécies deste gênero poderão ser desenvolvidos. PAULA et al. (1997) afirmam que em plantas de *C. odorata* enxertadas em *Toona ciliata*, espécie que introduzida no Brasil mostrou excelente crescimento e ausência de ataque por *H. grandella*, ocorreu translocação de sesquiterpenos, triterpenóides, limonóides e flavonóides que podem induzir resistência, em *Cedrela*, contra o ataque desta praga. Dentro deste contexto surge a necessidade de se estudar estas espécies quanto à conservação de germoplasma, uso de técnicas de marcadores moleculares e estabelecimento de sistemas consistentes para a obtenção de plantas transformadas, através de técnicas da engenharia genética e da multiplicação “in vitro”. Portanto, o desenvolvimento de metodologias básicas de cultura de tecidos para estas espécies, torna-se premente para viabilizar tais abordagens.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MICROPROPAGAÇÃO de *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

##### 3.1.1. Germinação e estabelecimento “in vitro”

Foram utilizadas sementes de *C. fissilis*, fornecidas pelo Instituto Florestal de São Paulo, coletadas em Araraquara SP em julho de 1998, pertencentes ao lote nº 135. As sementes foram lavadas, abundantemente, com detergente neutro e água corrente, e desinfetadas, em câmara de fluxo laminar, com solução comercial de hipoclorito de sódio (Clorisol) com 2.5% de cloro ativo, acrescida de 3 gotas de detergente neutro, por 75 minutos. Em seguida foram lavadas 5 vezes com água destilada esterilizada e inoculadas em tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo 5 ml de meio MS (Sigma Co., USA) (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0.2% (w/v) de fitagel (Phytigel™, Sigma Co., USA). Os tubos foram autoclavados por 18 minutos a 1.1 Kgf/cm<sup>2</sup>, em temperatura de 120°C. O pH do meio foi ajustado para 5.8, antes da autoclavagem, pela adição de NaOH 0.1M ou HCl 0.1N.

As culturas foram mantidas a temperatura de 25°C ± 2, sob fotoperíodo de 16 horas, com fluxo de ftons de 22.3 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, providos por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL, e umidade relativa em torno de 70%. Essas condições foram utilizadas nos demais experimentos, exceto quando especificado.

As taxas de germinação “in vitro”, foram acompanhadas diariamente em 7 lotes de sementes, com 10 repetições cada. O crescimento das plântulas foi avaliado após 30 dias, segundo os seguintes parâmetros: peso da matéria fresca, comprimento total das plântulas, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número de folhas, número de gemas e número de nós.

### **3.1.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis***

Segmentos nodais cotiledonares medindo 0.8 a 1.0 cm de comprimento, foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis*, germinadas na presença de luz (Figura-3A), com 30-35 dias de idade. Os cotilédones foram reduzidos pela metade e os explantes inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 5 ml de meio MS, suplementado com 2% (w/v) de sacarose, 0.2% (w/v) de fitagel e dos reguladores de crescimento BA (6-benzilaminopurina) e/ou NAA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético), isoladamente ou em diferentes combinações nas concentrações de 0.0, 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l.

Após 45 dias as culturas foram avaliadas com relação às frequências das respostas morfogênicas, tais como, frequências de formação de ramos, raízes e/ou calos e quanto aos seguintes parâmetros: peso da matéria fresca das culturas, número e comprimento de ramos, número de nós, número de gemas, número de folhas e número e comprimento de raízes produzidas por explante. Foram utilizadas no mínimo 10 explantes por tratamento.

### **3.1.3. Enraizamento “in vitro” de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis***

Segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* excisados de plântulas de 30-35 dias foram inoculados em frascos contendo 15 ml de meios MS, concentração salina total, ou MS/2, metade da concentração salina total, suplementados com sacarose (2% w/v), fitagel (0.2% w/v) e IBA (ácido indolil-3-butírico) nas concentrações de 0.0, 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l. As culturas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e umidade relativa descritas no item 3.1.1. Foram utilizadas 3 repetições com 5 microestacas cada, por tratamento. As taxas de enraizamento foram avaliadas a cada dois dias. Aos 35 dias as culturas foram avaliadas quanto à frequência de formação de ramos, de raízes, de calos e quanto ao peso da matéria fresca total, número e comprimento de ramos, número de nós, número de gemas, número de folhas e número e comprimento de raízes produzidos por explante. Foram utilizados no mínimo 12 explantes por tratamento para as avaliações.

#### 3.1.4. Aclimação

As microplantas de *C. fissilis* foram obtidas a partir de nós cotiledonares (0.8-1.0 cm) cultivados em meio MS, suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0.2% (w/v) de fitagel, desprovido de reguladores de crescimento. Após 35 dias as microplantas foram testadas quanto à capacidade de sobrevivência e crescimento “ex vitro” em duas etapas de aclimação.

Na primeira etapa, foram retiradas dos frascos, lavadas em água destilada para remoção do meio de cultura e transferidas para bandejas de plástico (150x250x50 mm), fechadas com tampas plásticas transparentes com pequenos orifícios, contendo  $\pm 3$  cm de areia lavada esterilizada, por um período de 3 semanas. O regime de regas ocorreu a cada dois dias, na primeira semana, e duas vezes por semana, nas duas semanas restantes, sendo que nas duas primeiras semanas as bandejas ficaram fechadas, sendo a ventilação possibilitada pelos orifícios das tampas. Na terceira semana as bandejas permaneceram totalmente abertas. Foram utilizadas 3 repetições de 15 microplantas cada mantidas nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e umidade relativa descritas no item 3.1.1. As taxas de sobrevivência das microplantas foram avaliadas semanalmente. Após 35 dias de aclimação em areia as microplantas foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros: peso da matéria fresca total das plantas, peso da matéria seca, comprimento do ramo principal, número de nós, número de folhas, número de gemas, número e comprimento de raízes. Foram avaliadas 15 microplantas aleatoriamente selecionadas.

A seguir foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 180 ml, contendo três diferentes substratos esterilizados: areia lavada, areia lavada : solo (1:1) e solo. Os copos com as plantas transplantadas permaneceram dentro de bandejas plásticas opacas de 340x340x150 mm e fechadas com filme de PVC. Durante as duas primeiras semanas, as plantas foram nebulizadas a cada dois dias com borrifador manual. Ao final da segunda semana, foram expostas à 70% de umidade relativa, pela retirada total do filme de PVC, mas continuaram sendo regadas e nebulizadas manualmente, duas vezes por semana, até o final da quarta semana, a partir da qual as plantas continuaram sendo regadas duas vezes por semana, mas não nebulizadas. Para acompanhar o crescimento inicial das plantas aclimatadas nos diferentes substratos, procedeu-se à avaliação, a cada duas semanas,

durante 8 semanas, dos seguintes parâmetros: altura da parte aérea, número de nós e número de folhas, sendo que a sobrevivência foi avaliada semanalmente. Nesta avaliação foram utilizadas 12 plantas para cada tratamento, aleatoriamente. Em outro experimento as plantas foram avaliadas a cada 30 dias até o 90º dia quanto aos seguintes parâmetros de crescimento: peso da matéria fresca total, peso da matéria seca, comprimento da parte aérea, número de nós, número de folhas, número de gemas, número e comprimento de raízes. Para cada período de avaliação (30, 60 e 90 dias) foram utilizadas no mínimo 12 plantas de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente. Durante esta etapa de aclimação os experimentos permaneceram sob as mesmas condições ambientais descritas no item 3.1.1.

### **3.2. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E TIPOS DE EXPLANTES NA PRODUÇÃO DE CALOS DE *Cedrela fissilis* Vell.**

#### **3.2.1. Obtenção de plântulas axênicas de *C. fissilis***

Sementes de *C. fissilis* foram desinfetadas com hipoclorito de sódio (2.5% de cloro ativo), durante 75 minutos, lavadas 5 vezes com água destilada esterilizada e inoculadas em tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo 5 ml de meio MS (1962), suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0.2% (w/v) de fitagel (Phytigel, Sigma Co. USA). O meio de cultura foi autoclavado por 18 minutos a 1.1 Kg/cm<sup>2</sup>, em temperatura de 120°C. O pH do meio foi ajustado para 5.8, antes da autoclavagem, pela adição de NaOH 0.1M ou HCl 0.1N.

As culturas foram mantidas nas mesmas condições de cultura descritas no item 3.1.1. Nos experimentos em que foram utilizadas plântulas germinadas na ausência de luz, as culturas foram embrulhadas em papel alumínio e mantidas nas mesmas condições acima.

### **3.2.2. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes de plântulas de *C. fissilis* germinadas na presença e ausência de luz**

Segmentos de raízes de 1.0 a 1.2 cm, epicótilo (1.0-1.2 cm) e segmentos proximais e medianos de cotilédones (0.8-1.0 cm<sup>2</sup>) foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis*, com 30 dias de idade, germinadas na presença de luz. Estes explantes foram inoculados na posição horizontal em frascos de vidro contendo 15 ml de meio MS suplementado com 2% (w/v) de sacarose, 0.2% de fitagel (w/v) e com auxinas NAA e 2,4-D nas concentrações de 0.0, 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l.

Os mesmos tratamentos foram realizados utilizando-se como explantes segmentos de raízes (1.0-1.2 cm) e de hipocótilo (1.0-1.2 cm) obtidos de plantas axênicas com 20 dias germinadas na ausência de luz.

Foram utilizadas 12 repetições por tratamento e após 45 dias as culturas foram avaliadas com relação às frequências das respostas morfogênicas, tais como, formação de ramos, raízes e calos e quanto ao peso da matéria fresca total das culturas.

### **3.2.3. Efeito da posição do explante, das formulações salinas e da concentração de sacarose na formação de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis***

Segmentos nodais cotiledonares (0.8-1.2 cm) contendo a parte proximal dos dois cotilédones e portanto, duas gemas axilares, foram excisados de plantas axênicas germinadas na presença de luz e com 30 dias de idade. Para testar o efeito da posição dos explantes no meio de cultura os mesmos foram inoculados na posição vertical e horizontal, em frascos com 15 ml de meio MS, suplementado com 2% (w/v) de sacarose, 0.2% (w/v) de fitagel, 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA.

Nos experimentos para testar o efeito de diferentes formulações salinas os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), WPM (LLOYD & McCOWN, 1981), WHITE (WHITE, 1963), SCHENK (SCHENK & HILDEBRANDT, 1972), B5 (GAMBORG, MILLER & OJIMA, 1968) e Kao (KAO & MICHAYLUK, 1974) foram suplementados

com 2% de sacarose, 0.2% de fitagel, 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA. Nesses casos os explantes foram inoculados na posição vertical.

Para avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sacarose na formação de calos, os explantes foram inoculados, na posição vertical, em meio MS suplementado com 0.2% (w/v) de fitagel, 0.5 mg/l de BA, 1.0 mg/l de NAA e concentrações de sacarose de 4%, 6% e 8% (w/v).

Foram utilizadas 12 repetições por tratamento e as culturas foram avaliadas após 45 dias quanto à frequência de formação de ramos, raízes e de calos e quanto ao peso da matéria fresca total.

### **3.3. MORFOGÊNESE “IN VITRO” EM COTILÉDONES DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

#### **3.3.1. Morfogênese “in vitro” em cotilédones isolados de *C. fissilis***

Cotilédones de plântulas axênicas, com 30 dias de idade, germinadas na presença de luz e com 20 dias de idade, germinadas na ausência de luz, em meio MS suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0.2% (w/v) de fitagel, foram excisados na porção distal do pecíolo e cultivados em meio MS suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0.2% (w/v) de fitagel, e de BA, nas concentrações de 0.0, 0.06, 0.12 e 0.25 mg/l. O pH do meio foi ajustado para 5.8, pela adição de NaOH 0.1M ou HCl 0.1N, antes da distribuição nos frascos e posteriormente autoclavados por 18 minutos a 1.1 Kg/cm<sup>2</sup>, em temperatura de 120°C. As culturas foram mantidas a 25°C ± 2, na presença e ausência de luz. O fotoperíodo foi de 16 horas, com fluxo de ftons de 22.3 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, providos por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL, e umidade relativa em torno de 70%. Os cotilédones foram inoculados nos tubos de ensaio (25 X 150 mm) contendo 8 ml de meio. Foram utilizadas 24 repetições por tratamento. Nos experimentos para avaliar o efeito da luz na organogênese, 12 repetições/tratamento foram mantidas na presença de luz e 12 foram mantidas na ausência de luz. As culturas foram avaliadas aos 45 dias de cultivo, com relação às frequências de senescência, de formação de ramos, formação de raízes e de calos.



### **3.3.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos medianos de cotilédones de *C. fissilis***

Segmentos medianos de cotilédones, com cerca de 0.7-1.0 cm<sup>2</sup>, e contendo a nervura central, foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis*, com 30-35 dias de idade, germinadas na presença de luz, em meio MS suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0.2% (w/v) de fitagel. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 25 X 150 mm contendo meio MS, suplementado com 2% (w/v) de sacarose, 0.2% (w/v) de fitagel, e de diferentes concentrações de BA e NAA, isolados ou em diferentes combinações das concentrações de 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 e 3.0 mg/l. As culturas foram avaliadas semanalmente quanto à frequência de formação de calos, brotos, raízes e senescência e aos 45 dias foi determinado o peso de matéria fresca das culturas. Foram utilizadas 12 repetições para cada tratamento e as culturas foram mantidas na presença de luz.

## **3.4. CONSERVAÇÃO “IN VITRO” DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

### **3.4.1. Conservação “in vitro” de ápices e segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis***

Ápices e segmentos nodais cotiledonares com aproximadamente 4-5 mm de comprimento, foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 30 dias de idade, e foram encapsulados em cápsulas de alginato de cálcio. As cápsulas de alginato de cálcio foram produzidas de acordo com o método descrito por KINOSHITA & SAITO (1990). Os explantes foram imersos em meio de cultura MS autoclavado suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 4% (w/v) de alginato de sódio. Em seguida foram coletados individualmente em alíquotas de 0.2 ml de meio de cultura com alginato, com o auxílio de uma pipeta, e posteriormente as gotas com os explantes foram mergulhadas numa solução estéril de 1.4% (w/v) de cloreto de cálcio onde permaneceram por 30 minutos para polimerizarem. As cápsulas contendo um único explante cada foram armazenadas em meios de cultura cuja composição era água destilada e ágar nas concentrações de 0.4, 0.7 e 1.0% (w/v). Os meios

foram distribuídos em frascos tipo “baby food” e autoclavados por 18 minutos a 1.1 Kgf/cm<sup>2</sup>, a 120°C. As culturas de ápices e segmentos nodais cotiledonares encapsulados foram mantidas armazenadas nestes meios por 3, 6 e 9 meses nas mesmas condições descritas no item 3.1.1. Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições com 12 cápsulas cada.

Após cada período de armazenamento, foram transferidos para o meio de recuperação MS suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0.2% (w/v) de fitagel e com 0.5 mg/l de BA. As porcentagens de rebrotamento dos explantes encapsulados foram avaliadas diariamente, após a transferência das cápsulas para o meio de recuperação.

#### **3.4.2. Criopreservação de sementes de *C. fissilis***

Para determinação do teor de água das sementes utilizadas nos experimentos, 3 lotes de 10 sementes foram colocadas em placas de Petri e determinado, inicialmente, o peso da matéria fresca das mesmas. Em seguida os lotes foram mantidos em estufa a 75°C. A determinação dos pesos de matéria seca foi avaliada após 24, 48 e 72 horas, até atingir um peso de matéria seca constante.

Lotes de 12 sementes, foram colocados em “criotubos” e imersos diretamente em nitrogênio líquido. Posteriormente as sementes foram descongeladas por 3 minutos, em banho-maria à temperatura de 45°C, e submetidas à desinfecção por 75 minutos em solução de hipoclorito de sódio (2.5% de cloro ativo). A seguir foram lavadas por 3 vezes com água destilada autoclavada e distribuídas em placas de Petri autoclavadas forradas com papel filtro, umedecido com água destilada autoclavada. O controle foi realizado com sementes não expostas ao nitrogênio líquido. Foram realizadas 5 repetições com 12 sementes cada, por tratamento. As placas de Petri foram mantidas nas mesmas condições de cultura do item 3.1.1. As porcentagens de germinação foram avaliadas diariamente.

Para o teste de tetrazólio foram utilizadas 5 repetições de 12 sementes criopreservadas em nitrogênio líquido e 5 repetições de 12 sementes não criopreservadas. Após o descongelamento ou não as sementes foram embebidas em água destilada por um período mínimo de duas horas. Em seguida foram seccionadas longitudinalmente e imersas por 3 horas numa solução de tetrazólio 0.5% a 25°C±2. As sementes foram então abertas

totalmente, de modo a permitir a visualização do embrião, procedendo-se à avaliação da viabilidade.

As plântulas obtidas a partir da germinação das sementes criopreservadas e não criopreservadas foram transplantadas para substrato composto por areia e solo (1:1) e mantidas em condições ambientais normais, sendo regadas periodicamente e tendo o seu crescimento em altura avaliados.

### **3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos foram avaliados utilizando-se a Análise de Variância em uma direção (ANOVA), com separação de médias pelo DMS ao nível de significância de 5% ( $P < 0.05$ ) (GOMEZ & GOMEZ, 1984). Os cálculos foram realizados com auxílio do software estatístico STATIGRAPHICS Plus for Windows versão 3.0.

## 4- RESULTADOS

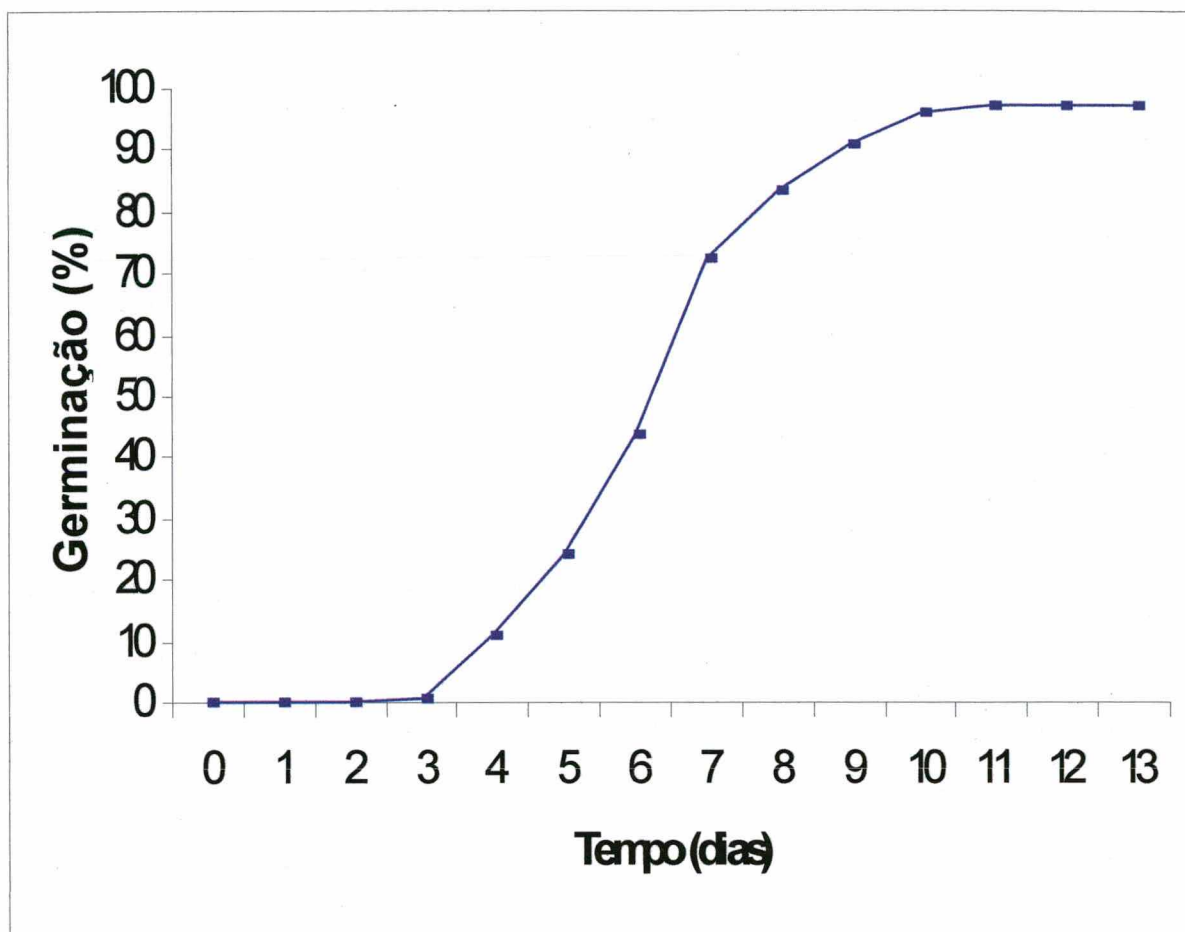
### 4.1. MICROPROPAGAÇÃO de *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

#### 4.1.1. Germinação “in vitro” de *C. fissilis*

A germinação “in vitro” de sementes de *C. fissilis* iniciou-se de forma bastante rápida, a partir do 4º dia de cultivo e estabilizando-se em torno do 12º dia (**Figura 1 e Tabela 1**). Ao final de 12 dias, obteve-se uma taxa de germinação média de 97.14%, sendo que as sementes que não germinaram até este período, não o fizeram posteriormente.

**Tabela 1.** Germinação “in vitro” de sementes de *Cedrela fissilis* em meio MS. Média de sete repetições com vinte sementes. (Média±Desvio Padrão).

Repetições	Tempo (dias)									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	10	20	45	80	90	100	100	100
2	0	5	15	25	45	70	80	85	100	100
3	0	0	15	25	50	70	90	100	100	100
4	0	0	10	30	40	70	90	95	100	100
5	0	0	10	25	45	65	75	90	90	95
6	0	0	5	20	35	80	90	90	90	90
7	0	0	10	25	45	70	70	75	90	95
Média±DP	0	0.7±1.8	10.7±3.4	24.2±3.4	43.6±4.7	72.1±5.6	83.6±8.5	90.7±8.8	95.7±5.3	97.1±3.9



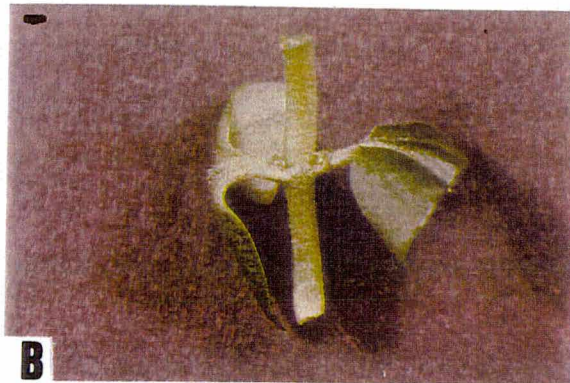
**Figura 1-** Germinação “in vitro” de *Cedrela fissilis* em meio MS. Valores são as médias obtidas de 7 repetições com vinte sementes cada.

#### 4.1.2. Crescimento inicial de plântulas de *C. fissilis* “in vitro”

Os dados sobre o crescimento inicial de plântulas de *C. fissilis* “in vitro” são apresentados na **Tabela 2**. Após 30 dias de cultivo (**Figura-2A**), as plântulas apresentaram em média  $3.06 \pm 0.593$  nós, sendo um nó cotiledonar, um nó foliar e um nó apical, e uma média de  $6.06 \pm 0.593$  gemas, considerando-se todas as gemas axilares presentes nas axilas dos cotilédones e das folhas e também a gema apical. O comprimento total das plântulas foi em média de  $16.86 \pm 1.056$  cm, sendo que a parte aérea atingiu  $8.24 \pm 1.050$  cm, apresentando em média  $3.06 \pm 0.593$  folhas. A raiz principal atingiu comprimento médio de  $8.62 \pm 1.271$  cm e as plântulas apresentaram uma média de  $0.505 \pm 0.09$  g de peso da matéria fresca.

**Tabela 2.** Crescimento inicial “in vitro” de plântulas de *Cedrela fissilis*, com 30 dias, em meio MS. Médias de 15 repetições. (Média $\pm$ Desvio Padrão).

Repetições (plântulas)	Peso da matéria fresca (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento caule (cm)	Comprimento raiz (cm)	Número de folhas	Número de gemas	Número de nós
1	0.428	15.5	7.8	7.7	3	6	3
2	0.369	16.5	7.5	9.0	3	6	3
3	0.396	15.9	7.1	8.8	3	6	3
4	0.555	15.8	9.1	6.7	2	5	2
5	0.512	18.3	10.8	7.5	3	6	3
6	0.495	17.1	8.0	9.1	4	7	4
7	0.449	15.6	7.8	7.8	2	5	2
8	0.476	17.9	8.5	9.4	3	6	3
9	0.556	17.0	8.3	8.7	3	6	3
10	0.572	16.1	7.2	8.9	3	6	3
11	0.452	17.1	10.1	7.0	3	6	3
12	0.750	18.1	7.4	10.7	4	7	4
13	0.522	17.4	7.8	9.6	3	6	3
14	0.490	15.9	8.5	7.4	3	6	3
15	0.553	18.7	7.7	11.0	4	7	4
<b>Média<math>\pm</math>DP</b>	<b>0.505<math>\pm</math>0.09</b>	<b>16.86<math>\pm</math>1.05</b>	<b>8.24<math>\pm</math>1.05</b>	<b>8.62<math>\pm</math>1.27</b>	<b>3.06<math>\pm</math>10.59</b>	<b>6.06<math>\pm</math>0.59</b>	<b>3.06<math>\pm</math>0.59</b>



**Figura 2-** Plântulas axênicas de *C. fissilis*, germinadas em meio MS, após 4 semanas de cultivo. As setas indicam a posição do nó cotiledonar (a direita) e do nó apical (a esquerda) (A). Barras = 1 cm. Segmentos nodais cotiledonares obtidos de plântulas axênicas de *C. fissilis*, com 30 dias, utilizados nos experimentos de micropropagação e indução de calos (B). Barra = 1 mm.

#### 4.1.3. Morfogênese “in vitro” em segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*

Os efeitos da citocinina BA e da auxina NAA, isoladas e/ou em diferentes combinações de concentrações, sobre a frequência de formação de ramos, raízes, calos e de plantas normais em segmentos nodais cotiledonares (**Figura-2B**) de *C. fissilis*, cultivados em meio MS, são apresentados na **Tabela 3** e **Figuras-3A,B**). Em todos os tratamentos com BA nas diferentes concentrações de 0.0, 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l houve a formação de ramos em 100% das culturas, enquanto que nas mesmas concentrações de BA combinado com concentrações de NAA de 0.5 e 1.0 mg/l ocorreu redução na frequência de culturas com ramos (42-75%). A formação de raízes ocorreu em maior frequência (92%) nos tratamentos sem BA ou NAA. Não ocorreu formação de raízes nos tratamentos com BA nas concentrações de 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l.

**Tabela 3.** Frequência (%) de respostas morfogênicas produzidas a partir da cultura de explantes de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* após 45 dias em meio contendo BA e/ou NAA.

Reguladores de crescimento (mg/l)		Ramos (%)	Raízes (%)	Calos (%)
BA	NAA			
0.00	0.00	<sup>z</sup> 100	92	0
0.00	0.25	100	40	70
0.00	0.50	73	36	82
0.00	1.00	73	42	82
0.25	0.00	100	0	100
0.25	0.25	100	66	100
0.25	0.50	75	50	100
0.25	1.00	58	58	100
0.50	0.00	100	0	100
0.50	0.25	100	42	100
0.50	0.50	66	25	100
0.50	1.00	42	17	100
1.00	0.00	100	0	100
1.00	0.25	75	50	100
1.00	0.50	100	33	100
1.00	1.00	75	17	100

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas.





Figura 3- Efeitos de concentrações crescentes (da esquerda para a direita: 0, 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l), de BA (A) e NAA (B) isoladamente, na morfogênese de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* cultivados em meio MS. Barras = 1 cm.

A **Tabela 4** mostra os resultados da avaliação das culturas de acordo com vários parâmetros de crescimento. Concentrações de BA de 0.25 e 0.5 mg/l na ausência de NAA, possibilitaram a formação de maior número de ramos (2.63 a 2.66 ramos/explante) de forma significativa, quando comparados com os demais tratamentos. Os tratamentos com 1.0 mg/l de NAA, 0.25 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA e 0.5 mg/l de BA e 0.5 mg/l de NAA inibiram significativamente a formação de ramos. Com relação ao comprimento do ramos, o valor máximo obtido ( $3.00 \pm 2.35$  cm), significativamente diferente dos demais, foi alcançado em meio contendo 1.0 e 0.5 mg/l de BA e NAA respectivamente. Enquanto que o NAA a 1.0 mg/l, usado isoladamente ou em combinação com diferentes concentrações de BA, mostrou-se inibitório ao crescimento dos ramos. Os números de nós produzidos por explante, nos tratamentos sem reguladores de crescimento ou com BA nas concentrações de 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l, foram superiores aos demais tratamentos. Os tratamentos com níveis crescentes de NAA, inibiram o número de nós. No tratamento que combinou 1.0 mg/l de BA com 0.5 mg/l de NAA, o número de nós formados foi estatisticamente semelhante aos tratamentos sem reguladores e/ou somente com BA. Os valores máximos de nós formados foram de 3.77-3.91 nós por explante. O tratamento que possibilitou o maior número de gemas formadas por explante foi o que continha 0.5 mg/l de BA (5.50 gemas/explante). Observou-se que quando os níveis de NAA foram crescentes, isoladamente ou em combinação com BA, houve uma redução significativa no número de gemas formadas, reflexo do menor número de nós formados. No tratamento com BA a 0.5 mg/l obteve-se a formação de maior quantidade de folhas por explante (4.85 folhas/explante), sendo significativamente superior aos demais tratamentos. Combinando-se BA a 0.5 mg/l com NAA a 1.0 mg/l promoveu-se significativamente o peso da matéria fresca das culturas, em cerca de 921.33 mg. Como nesse tratamento o número de ramos e raízes produzidos, assim como o crescimento dos mesmos foi muito pequeno, a maior parte da matéria fresca produzida, correspondem à matéria fresca dos calos. Os valores de peso da matéria fresca obtidos quando o BA foi utilizado isoladamente (333.36 a 392.75 mg) ou quando o NAA foi utilizado isoladamente (411.81 a 529.60 mg) foram significativamente menores em relação ao tratamento mencionado acima.

**Tabela 4.** Efeito de BA e NAA na micropropagação de *Cedrela fissilis* a partir de segmentos nodais cotiledonares, após 45 dias de cultura *in vitro*.

Reguladores de crescimento (mg/l)		Peso da matéria fresca das culturas (mg)	Nº de ramos/explante	Comprimento dos ramos (cm)	Nº de nós/explante	Nº de gemas/explante	Nº de folhas/explante	Nº de raízes/explante	Comprimento das raízes (cm)
BA	NAA								
0.0	0.0	339.45 ef	2.00 b	2.25 ab	3.81 a	5.04 ab	4.04 abc	2.27 a	5.75 a
0.0	0.25	434.00 cdef	1.80 b	2.27 ab	3.20 abc	4.40 abc	3.40 bcd	1.10 abcd	2.37 bcd
0.0	0.5	529.60 bcde	1.10 cde	1.68 bcd	2.30 cde	3.25 cdef	2.55 def	0.90 abcd	1.61 bcde
0.0	1.0	411.81 def	0.90 de	0.76 cd	1.50 ef	2.50 efg	1.81 fgh	1.09 abcd	2.09 bcde
0.25	0.0	333.36 ef	2.63 a	1.75 bc	3.63 ab	5.22 ab	4.45 ab	*	*
0.25	0.25	533.90 bcde	2.00 b	1.61 bcd	2.59 bcde	3.45 cde	2.77 def	1.90 abc	2.91 bc
0.25	0.5	606.27 bcd	1.45 bcd	1.32 bcd	1.95 def	2.59 efg	1.95 fgh	1.18 abcd	1.13 cde
0.25	1.0	606.00 bcd	0.90 de	0.54 d	1.00 f	1.86 fg	1.31 gh	2.18 ab	3.63 ab
0.5	0.0	392.75 def	2.66 a	1.51 bcd	3.91 a	5.50 a	4.85 a	*	*
0.5	0.25	527.33 bcde	2.00 b	1.56 bcd	3.12 abc	4.25 abc	3.20 cd	1.83 abc	2.12 bcde
0.5	0.5	654.16 bc	0.83 e	0.58 d	2.12 cde	2.79 def	2.12 efg	0.91 abcd	0.79 de
0.5	1.0	921.33 a	1.00 de	0.59 d	0.91 f	1.33 g	1.04 h	0.58 cd	0.99 cde
1.0	0.0	289.18 f	2.00 b	1.42 bcd	3.77 a	5.40 ab	4.45 ab	*	*
1.0	0.25	705.54 ab	1.63 bc	2.22 ab	2.63 bcd	4.09 bcd	3.13 cde	1.45 abcd	2.62 bcd
1.0	0.5	614.36 bcd	2.00 b	3.00 a	3.77 a	5.00 ab	4.18 abc	0.81 bcd	1.44 cde
1.0	1.0	650.54 bc	1.81 b	0.65 cd	1.54 def	3.04 cdef	2.31 defg	0.36 d	0.13 e

<sup>z</sup>Valores (N=10-12) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

\*Tratamentos que não formaram raízes.

#### 4.1.4. Enraizamento “in vitro” de segmentos nodais cotiledonares *C. fissilis*

Os efeitos dos meios MS e MS/2, suplementados com diferentes concentrações da auxina IBA na frequência de respostas morfogênicas em microestacas de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*, após 35 dias de cultura, estão apresentados na **Tabela 5**. Observa-se que as porcentagens de culturas com ramos variaram de 93 a 100% e que as de culturas com raízes, de 86-100%, não tendo sido verificada a formação de calos.

Os resultados da **Tabela 6** mostram que não houve diferenças significativas no uso de MS e MS/2 acrescidos de diferentes concentrações de IBA, com relação ao número de ramos produzidos (mínimo  $1.66 \pm 0.49$  e máximo  $1.91 \pm 0.28$ ), número de nós (mínimo  $3.25 \pm 1.05$  e máximo  $4.00 \pm 0.85$ ) e número de gemas (mínimo  $4.50 \pm 0.90$  e máximo  $5.25 \pm 1.05$ ).

No meio MS/2 com 1.0 mg/l de IBA houve promoção significativa do comprimento dos ramos formados ( $1.57 \pm 0.97$  cm), em relação aos demais tratamentos. Com relação ao número de folhas produzidas, o meio MS com IBA na concentração de 1.0 mg/l promoveu de forma significativa, a formação de  $4.33 \pm 1.07$  folhas por explante. Quanto ao número de raízes formadas não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. O número médio de raízes variou entre  $2.16 \pm 0.93$ , no meio MS com 0.25 e 0.5 mg/l de IBA e  $2.91 \pm 1.08$ , no meio MS/2 desprovido de IBA. Por outro lado, o comprimento das raízes foi significativamente promovido no meio MS suplementado com 0.25 mg/l de IBA, obtendo-se para este tratamento um comprimento médio de  $10.1 \pm 6.02$  cm.

Apesar de ter sido observado enraizamento das microestacas também em meio desprovido de IBA (**Figura-5A**), verifica-se pela **Tabela 7** e **Figura 4** que esta auxina acelerou a velocidade de enraizamento. Assim, a visualização dos primórdios radiculares foi possível a partir do 6º dia para os tratamentos MS acrescidos de 0.25 a 1.0 mg/l de IBA, apresentando porcentagens de enraizamento, que variaram de 6.6 a 13.3%, e nos tratamentos com MS/2, acrescidos de 0.25 e 0.5 mg/l de IBA, em que estas porcentagens variaram de 6.6 a 20.0%. Desta forma por volta do 8º dia, o tratamento com MS/2 e 0.5 mg/l de IBA apresentou porcentagem de enraizamento significativamente superior (86%) aos tratamentos MS e MS/2 desprovidos de IBA ou MS suplementados com 0.25 mg/l de

IBA (26.6-40.0%). Ao redor do 10º dia, a porcentagem de enraizamento no meio MS/2 com 0.5 mg/l de IBA atingiu 100% e mantiveram-se as diferenças significativas, principalmente em relação aos meios sem reguladores de crescimento. Na maioria dos demais tratamentos as taxas máximas de enraizamento estabilizaram-se apenas após o 16º-18º dia do início do experimento. A partir do 12º dia não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

**Tabela 5.** Efeito dos meios MS e MS/2 suplementados com IBA na frequência (%) de respostas morfogênicas em segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis*, após 35 dias de cultura *in vitro*.

Meio	IBA (mg/l)	Ramos (%)	Raízes (%)	Calos (%)
MS	0.00	<sup>z</sup> 100	93	0
	0.25	93	93	0
	0.50	100	93	0
	1.00	100	91	0
MS/2	0.00	100	86	0
	0.25	100	93	0
	0.50	100	100	0
	1.00	93	93	0

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 15 culturas

**Tabela 6.** Efeito dos meios MS e MS/2 suplementados com IBA na micropropagação de *Cedrela fissilis* a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados *in vitro*, após 35 dias.

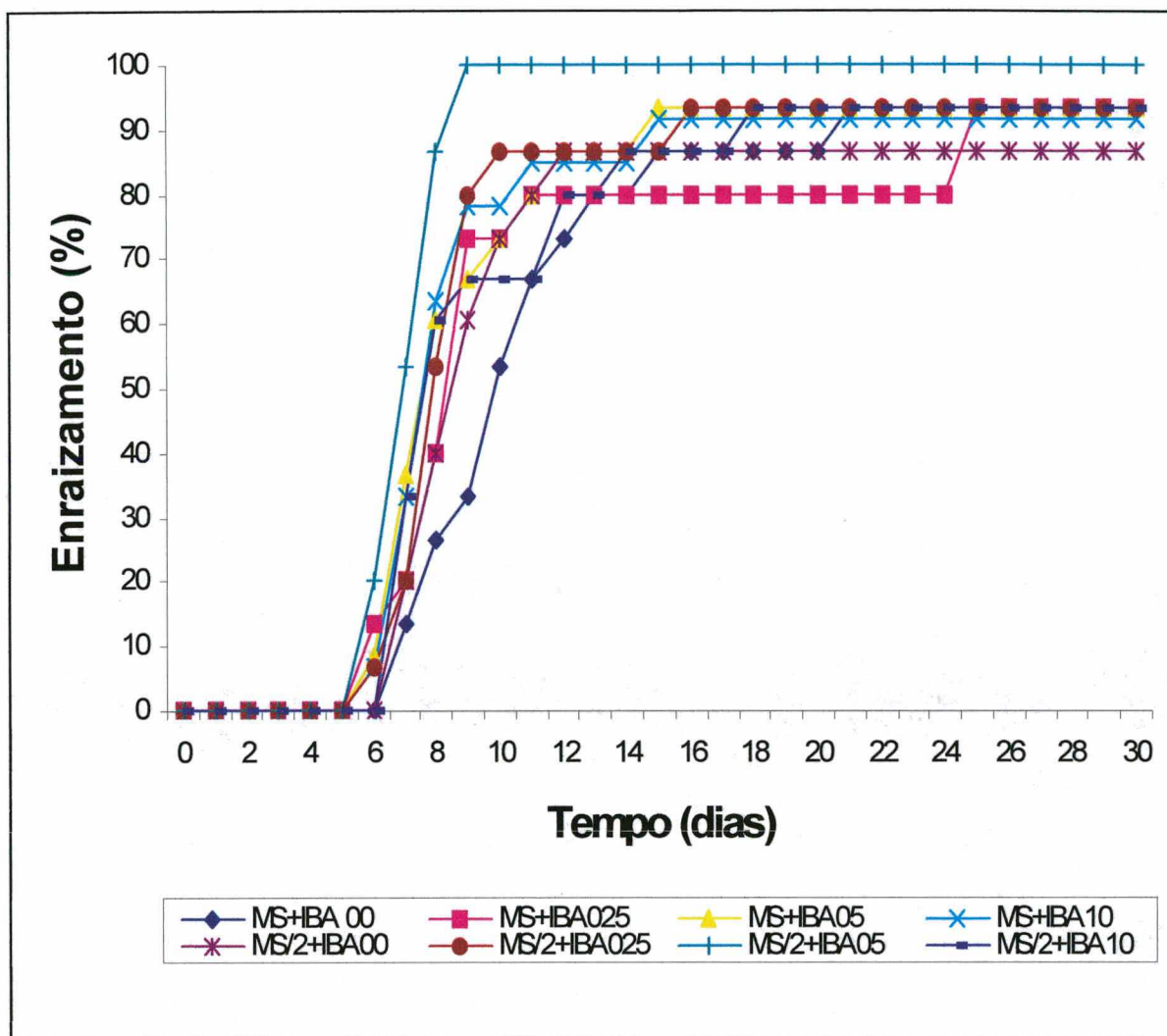
Meio	IBA (mg/l)	Número de Ramos	Comprimento ramos (cm)	Número de nós	Número de gemas	Número de folhas	Número de Raízes	Comprimento das raízes (cm)
MS	0.00	<sup>z</sup> 1.75±0.45 a	0.94±0.35 b	3.50±0.90 a	4.83±0.93 a	3.91±0.90 ab	2.41±1.44 a	5.25±2.97 c
	0.25	1.91±0.28 a	1.24±0.38 ab	3.83±0.93 a	5.16±0.93 a	4.25±0.96 ab	2.16±0.93 a	10.09±6.02 a
	0.50	1.91±0.28 a	1.02±0.32 b	3.25±1.05 a	4.50±0.90 a	3.50±0.90 b	2.16±0.93 a	8.53±4.91 ab
	1.00	1.83±0.38 a	1.25±0.51 ab	3.91±1.24 a	5.25±1.05 a	4.33±1.07 a	2.75±1.13 a	6.85±3.61 bc
MS/2	0.00	1.91±0.28 a	1.11±0.95 ab	3.33±0.98 a	5.00±0.85 a	4.00±0.85 ab	2.91±1.08 a	6.53±2.69 bc
	0.25	1.91±0.28 a	1.20±0.49 ab	4.00±0.85 a	5.16±0.93 a	4.16±0.93 ab	2.25±0.75 a	6.60±2.64 bc
	0.50	1.83±0.38 a	1.00±0.46 b	3.41±1.08 a	4.58±0.90 a	3.58±0.90 ab	2.83±1.11 a	6.87±3.18 bc
	1.00	1.66±0.49 a	1.57±0.97 a	3.83±1.40 a	5.25±1.13 a	4.16±1.11 ab	2.66±1.87 a	5.86±2.96 bc

<sup>z</sup>Valores (N=12) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 7.** Frequência (%) de enraizamento *in vitro* de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* em meio MS e MS/2 suplementados com IBA, durante 18 dias.

Meio	IBA (mg/l)	Tempo (dias)						
		6	8	10	12	14	16	18
MS	0.00	<sup>z</sup> 0.0 b	26.6 b	53.3 c	73.3 a	80.0 a	86.6 a	86.6 a
	0.25	13.3 ab	40.0 b	73.3 abc	80.0 a	80.0 a	80.0 a	80.0 a
	0.50	8.3 ab	60.0 ab	73.3 abc	86.6 a	86.6 a	93.3 a	93.3 a
	1.00	6.6 ab	63.3 ab	78.3 abc	85.0 a	85.0 a	91.6 a	91.6 a
MS/2	0.00	0.0 b	40.0 b	73.3 abc	86.6 a	86.6 a	86.6 a	86.6 a
	0.25	6.6 ab	53.8 ab	86.6 ab	86.6 a	86.6 a	93.3 a	93.3 a
	0.50	20.0 a	86.6 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
	1.00	0.0 b	60.0 ab	66.6 b	80.0 a	86.6 a	86.6 a	93.3 a

<sup>z</sup>Valores (N=15) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. Os valores são as médias das proporções de 3 experimentos com 15 explantes cada.



**Figura 4-** Enraizamento “in vitro” de microestacas obtidas de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* em meio MS e MS/2 suplementados com diferentes concentrações de IBA. As curvas referem-se às médias das porcentagens diárias obtidas da avaliação de 15 microestacas, durante 30 dias.

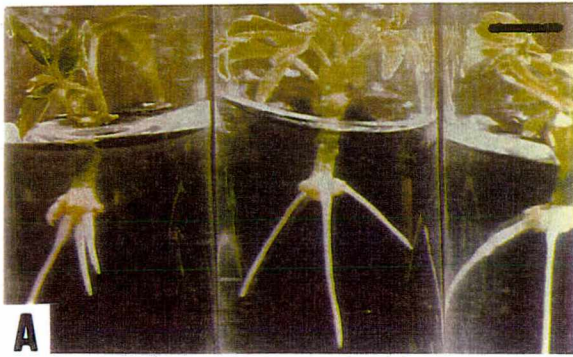
#### 4.1.5. Aclimação

A porcentagem de sobrevivência “ex vitro” das microplantas de *C. fissilis* enraizadas em meio desprovido de reguladores de crescimento foi de 100%, após três semanas de aclimação inicial em areia esterilizada (dados não apresentados) (**Figura-5B,C**). As microplantas no final das três primeiras semanas apresentaram em média  $0.29 \pm 0.69$  g de peso de matéria fresca,  $0.071 \pm 0.26$  g de peso de matéria seca,  $2.08 \pm 0.67$  cm de altura,  $5.06 \pm 0.70$  folhas,  $6.06 \pm 0.70$  gemas,  $3.33 \pm 1.54$  raízes por microplanta e  $4.10 \pm 2.01$  cm de comprimento das raízes, no momento da transferência para os diferentes substratos testados (dados não apresentados) (**Figura-5C**). Os resultados de crescimento das microplantas em areia, areia e solo (1:1) e solo durante 60 dias são apresentados nas **Tabelas 8, 9 e 10**. Observa-se que o crescimento das microplantas em areia lavada esterilizada foi muito reduzido, pois após 60 dias apresentaram incrementos de apenas 69.32% em altura, 64% em número de nós e de 59.8% em número de folhas. Nos substratos compostos de areia e solo e apenas solo os incrementos em altura (176.20% e 181.25% respectivamente), número de nós (92% e 97% respectivamente) e em número de folhas (85% e 91% respectivamente) foram muito maiores. Com relação à altura, os substratos compostos pela mistura de areia e solo ou apenas solo, possibilitaram incrementos significativamente diferentes, aos 15, 30, 45 e 60 dias, quando comparados aos obtidos em areia. O substrato composto por areia e solo foi significativamente superior em termos de incremento em altura, quando comparado com o substrato solo, aos 30 e 45 dias, porém não foram detectadas diferenças significativas entre ambos aos 15 e 60 dias de aclimação. Com relação ao incremento em número de nós e número de folhas (**Tabelas 9 e 10**), os substratos areia e solo e apenas solo não se mostraram significativamente diferentes entre si aos 15, 30 e 45 dias, porém aos 60 dias, o substrato solo foi superior, sendo significativamente diferente. É importante ressaltar que em todas as etapas de avaliação, o substrato areia mostrou-se significativamente inferior aos demais.

Em um segundo experimento complementar, em que outros parâmetros de crescimento, tais como, pesos das matérias fresca e seca, número e comprimento das raízes, foram analisados (**Tabela 11**) e indicaram que o crescimento “ex vitro” das microplantas, aos 30 dias, em substrato composto por solo (**Figura-5E**), foi significativamente superior



aos demais em relação ao peso da matéria fresca e seca obtidos,  $1.85 \pm 0.90$  e  $0.41 \pm 0.19$  g, respectivamente e também com relação à altura, alcançando  $8.16 \pm 2.42$  cm. Com relação ao número de folhas e número de gemas os substratos compostos pela mistura de areia e solo e solo foram estatisticamente iguais entre si e significativamente superiores ao substrato composto somente por areia, confirmando os resultados do experimento anterior. Os substratos se mostraram estatisticamente iguais em relação ao número e comprimento das raízes formadas. Aos 60 dias de aclimação o substrato composto pela mistura de areia e solo mostrou-se superior aos demais em relação a todos os parâmetros avaliados (**Tabela 12**), exceto em peso da matéria seca e altura das microplantas, novamente confirmando os resultados obtidos no primeiro experimento. Nesse caso os resultados obtidos nos substratos compostos pela mistura de areia e solo e solo foram estatisticamente semelhantes. Quando as plantas atingiram 90 dias de aclimação (**Figura-5F**) o substrato que possibilitou melhores resultados, para a maioria dos parâmetros avaliados, foi o composto pela mistura de areia e solo, sendo significativamente maior em relação aos demais substratos quanto ao peso da matéria fresca ( $11.40 \pm 2.32$  g), peso da matéria seca ( $2.64 \pm 0.64$  g), número de folhas ( $12.66 \pm 1.58$ ) e número de gemas ( $13.66 \pm 1.58$ ). Em relação à altura, os substratos compostos por areia/solo e solo foram estatisticamente semelhantes, e as plantas atingiram  $19.78 \pm 3.25$  cm e  $19.06 \pm 2.95$  cm, respectivamente (**Tabela 13**). Desta forma a altura das microplantas foi significativamente afetada pelo tipo de substrato (areia/solo e solo) apenas entre 15–30 dias de aclimação. Outros parâmetros, tais como, número de nós e número de folhas não diferiram estatisticamente até os 45 dias mas foram detectados aos 60 e 90 dias. Com relação ao crescimento do sistema radicular, observa-se pela **Tabela 11**, que aos 30 dias de aclimação, o número de raízes por microplanta e os comprimentos médios das mesmas não variaram significativamente entre os tratamentos, indicando que estes parâmetros não foram influenciados pelos substratos até aquele momento.



**Figura 5-** Segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* enraizados em meio MS, após 35 dias de cultura *in vitro* (A). Plântulas com duas semanas de aclimação em areia (B). Plântulas com 3 semanas de aclimação em areia, no momento da transferência para outros substratos (C). Plântulas em aclimação em substrato solo, areia/solo e areia (da esquerda para a direita) (D). Plântulas aos 30 dias de aclimação em areia, areia/solo, e solo (da esquerda para a direita) (E). Aspecto de plântulas aclimatadas aos 90 dias em solo, areia/solo e areia (da esquerda para a direita) (F). Barras = 1 cm.

**Tabela 8.** Crescimento *ex vitro* em altura (cm) de plantas micropropagadas de *Cedrela fissilis* durante dois meses de aclimação em diferentes substratos. (Média±Desvio Padrão).

Substrato	Tempo (dias)			
	15	30	45	60
Areia	<sup>z</sup> 2.12±0.63 b	2.54±0.68 c	2.78±0.66 c	2.94±0.71 b
Areia/solo	4.98±1.25 a	10.06±2.31a	15.60±2.55 a	17.55±2.70 a
Solo	4.64±1.12 a	9.11±2.01b	13.38±2.72 b	16.82±3.50 a

<sup>z</sup>Valores (N=36) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 9.** Crescimento *ex vitro* em número de nós de plantas micropropagadas de *Cedrela fissilis* durante dois meses de aclimação em diferentes substratos. (Média±Desvio Padrão).

Substrato	Tempo (dias)			
	15	30	45	60
Areia	<sup>z</sup> 4.93±0.82 b	5.96±0.98 b	6.12±0.96 b	6.33±1.13 c
Areia/solo	6.25±1.29 a	8.80±1.32 a	10.52±1.29 a	11.52±1.34 b
Solo	6.36±0.96 a	8.91±1.36 a	10.38±1.24 a	12.38±1.17 a

<sup>z</sup>Valores (N=36) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 10.** Crescimento *ex vitro* em número de folhas de plantas micropropagadas de *Cedrela fissilis* durante dois meses de aclimação em diferentes substratos. (Média±Desvio Padrão).

Substrato	Tempo (dias)			
	15	30	45	60
Areia	<sup>z</sup> 4.63±0.96 b	5.33±0.98 b	5.39±1.02 b	5.54±1.12 c
Areia/solo	6.16±1.53 a	8.11±1.38 a	9.52±1.29 a	10.52±1.34 b
Solo	6.19±1.00 a	7.97±1.36 a	9.36±1.26 a	11.38±1.17 a

<sup>z</sup>Valores (N=36) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 11.** Crescimento *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 30 dias de aclimação em diferentes substratos.

Substrato	Peso da matéria fresca (g)	Peso da matéria Seca (g)	Altura (cm)	Número de folhas	Número de gemas	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)
Areia	<sup>z</sup> 0.32±0.08 b	0.09±0.03 b	1.80±0.71 c	4.91±0.79 b	6.91±0.79 b	3.16±1.26 a	5.45±1.63 a
Areia/solo	0.71±0.18 b	0.15±0.04 b	6.20±1.25 b	7.00±0.85 a	9.00±0.85 a	3.00±0.85 a	4.58±1.31 a
Solo	1.85±0.90 a	0.41±0.19 a	8.16±2.42 a	7.08±1.16 a	9.08±1.16 a	3.50±1.00 a	6.05±2.36 a

<sup>z</sup>Valores (N=12) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 12.** Crescimento *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de aclimação em diferentes substratos.

Substrato	Peso da matéria fresca (g)	Peso da matéria Seca (g)	Altura (cm)	Número de folhas	Número de gemas
Areia	<sup>z</sup> 0.82±0.26 c	0.28±0.13 b	2.94±0.48 b	5.40±0.98 c	6.26±0.79 c
Areia/solo	9.69±2.74 a	1.74±0.64 a	16.66±4.06 a	11.46±1.12 a	12.46±1.12 a
Solo	7.67±1.87 b	1.66±0.52 a	17.82±3.07 a	10.33±1.23 b	11.33±1.23 b

<sup>z</sup>Valores (N=12) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 13.** Crescimento *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 90 dias de aclimação em diferentes substratos.

Substrato	Peso da matéria fresca (g)	Peso da matéria Seca (g)	Altura (cm)	Número de folhas	Número de gemas
Areia	<sup>z</sup> 0.53±0.22 c	0.14±0.06 c	3.15±1.07 b	5.40±1.18 c	6.40±1.18 c
Areia/solo	11.40±2.32 a	2.64±0.64 a	19.78±3.25 a	12.66±1.58 a	13.66±1.58 a
Solo	8.23±1.76 b	1.86±0.56 b	19.06±2.95 a	10.53±1.18 b	11.53±1.18 b

<sup>z</sup>Valores (N=12) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

## **4.2. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E TIPOS DE EXPLANTES NA PRODUÇÃO DE CALOS DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

### **4.2.1. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes de plântulas de *C. fissilis* germinadas em presença de luz**

Os efeitos de NAA, 2,4-D, da presença e ausência de luz na formação de raízes e de calos em segmentos de raízes, segmentos de epicótilo, segmentos basais e medianos de cotilédones estão apresentados respectivamente nas Tabelas 14 e 15. Em todos os tratamentos houve inibição com relação à formação de ramos.

Os resultados da Tabela 14 indicam que as porcentagens de explantes que formaram raízes, variaram de acordo com a origem do explante e dos tratamentos. Assim, quando os explantes utilizados foram segmentos de raiz apenas o NAA pareceu ser efetivo a 0.5 mg/l, na luz e a 0.25 e 0.5 mg/l, no escuro. Segmentos de epicótilo formaram raízes também com NAA, em todas as concentrações, exceto no controle, tanto na presença quanto na ausência de luz. O 2,4-D a 0.25 mg/l, na luz, e a 0.50 mg/l, na ausência de luz, também foi efetivo para este tipo de explante. Nos casos de segmentos basais de cotilédones, tanto o NAA como o 2,4-D, em todas as concentrações testadas, na presença de luz, apresentaram rizogênese ao passo que na ausência de luz, apenas as concentrações de 0.25–0.5 mg/l de NAA e 0.25 mg/l de 2,4-D foram efetivas. Já os segmentos medianos de cotilédones formaram raízes em todas as concentrações de NAA testadas, tanto na presença quanto na ausência de luz, ao passo que com o 2,4-D formaram-se raízes em todas as concentrações, na ausência de luz, mas apenas nas concentrações de 0.25 – 0.5 mg/l, na presença de luz. Segmentos de epicótilo e segmentos basais e medianos de cotilédones foram os que possibilitaram maiores freqüências de formação de raízes nos diferentes tratamentos, com freqüências variando de 8.3 a 66.6%.

Os resultados sobre indução de calos (Tabela 15) indicam que a indução de calos em segmentos de raízes e epicótilos ocorreu em todos os tratamentos, com exceção dos controles de NAA e 2,4-D na presença de luz e NAA na ausência de luz, com freqüências variando entre 50 e 100% . Em segmentos basais de cotilédones apenas não ocorreu a formação de calos nos tratamentos com NAA na presença de luz, enquanto que em segmentos medianos de cotilédones não ocorreu formação de calos nos tratamentos com

NAA na ausência de luz e no tratamento com 0.25 mg/l de NAA na presença de luz. Para segmentos basais de cotilédones as máximas porcentagens de formação de calos, acima de 60%, foram obtidas com 0.5 mg/l de 2,4-D na presença de luz, 0.25 mg/l de NAA, na ausência de luz, e com 0.25–1.0 mg/l de 2,4-D na ausência de luz. Para segmentos medianos de cotilédones a máxima porcentagem de 83% foi obtida com 2,4-D a 1.0 mg/l na ausência de luz. Em todos os demais tratamentos as porcentagens de indução de calos obtidas foram inferiores a 50%.

**Tabela 14.** Efeitos de NAA, 2.4 D, presença e ausência de luz, na freqüência (%) de formação de raízes a partir de segmentos de raiz, epicótilo e de segmento basais e medianos de cotilédones de plântulas de *Cedrela fissilis*, com 30 dias germinadas na presença de luz.

Condição de cultura	Auxina	Concentração (mg/l)	Explante			
			Raiz	Epicótilo	Cot. Basal	Cot. mediano
Presença de luz	NAA	0.00	0	0	0	0
		0.25	0	16.6	16.6	25.0
		0.50	16.6	66.6	33.3	16.6
		1.00	0	33.3	33.3	66.6
	2.4-D	0.00	0	0	0	0
		0.25	0	8.33	33.3	16.6
		0.50	0	0	33.3	8.33
		1.00	0	0	8.33	0
Ausência de luz	NAA	0.00	0	0	0	0
		0.25	58.3	8.33	33.3	16.6
		0.50	8.33	8.33	25.0	25.0
		1.00	0	8.33	0	16.6
	2.4-D	0.00	0	0	0	0
		0.25	0	0	16.6	16.6
		0.50	0	8.33	0	8.33
		1.00	0	0	0	8.33

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas, após 45 dias de cultura *in vitro*.

**Tabela 15.** Efeitos de NAA, 2.4 D, presença e ausência de luz, na frequência (%) de formação de calos a partir de segmentos de raiz, epicótilo e de segmento basais e medianos de cotilédones de plântulas de *Cedrela fissilis*, com 30 dias germinadas na presença de luz.

Condição de cultura	Auxina	Concentração (mg/l)	Explante			
			Raiz	Epicótilo	Cot. Basal	Cot. Mediano
Presença de luz	NAA	0.00	<sup>z</sup> 0	0	0	0
		0.25	66.6	50.0	0	0
		0.50	83.3	83.3	0	16.6
		1.00	100	33.3	0	25.0
	2.4-D	0.00	0	0	0	0
		0.25	50.0	91.6	41.6	16.6
		0.50	58.3	66.6	83.3	41.6
		1.00	50.0	91.6	50.0	41.6
Ausência de luz	NAA	0.00	0	0	0	0
		0.25	91.6	66.6	75.0	0
		0.50	91.6	75.0	25.0	0
		1.00	100	58.3	16.6	0
	2.4-D	0.00	0	8.33	0	0
		0.25	66.6	58.3	66.6	33.3
		0.50	100	83.3	66.6	25.0
		1.00	91.6	100	66.6	83.3

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas, após 45 dias de cultura *in vitro*.

Na **Tabela 16** estão apresentados os efeitos das auxinas NAA e 2,4-D no crescimento de calos obtidos a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na presença de luz. Verifica-se que tanto o NAA quanto o 2,4-D promoveram significativamente o peso da matéria fresca das culturas, dependendo da origem dos explantes. Nos tratamentos com 2,4-D, segmentos de epicótilo foram os que apresentaram calos com os maiores valores de peso da matéria fresca, obtendo-se valores que variaram de 152.83 mg a 204.92 mg, de acordo com as concentrações de 2,4-D utilizadas, de 0.25–1.0 mg/l. Esses valores não diferiram significativamente dos obtidos para segmentos basais de cotilédones cultivados com 0.50 mg/l de 2,4-D (155.08 mg), porém foram significativamente superiores aos demais explantes. Em todos os demais tratamentos os pesos de matéria fresca dos calos formados foram inferiores a 92.6 mg. Nos tratamentos com NAA, os explantes que possibilitaram maiores valores de peso de matéria fresca das culturas também foram os segmentos de epicótilo, sendo que o tratamento com 0.50 mg/l de NAA promoveu significativamente o crescimento, obtendo-se um valor médio de 557.67 mg de peso da matéria fresca. Contrastando com o 2,4-D, os valores dos pesos frescos dos calos produzidos a partir de segmentos basais de cotilédones, foram inferiores a 50 mg.

Nos tratamentos em que as culturas foram mantidas no escuro (**Tabela 17**) o 2,4-D, na concentração de 1.0 mg/l, promoveu de forma significativa, o peso da matéria fresca a partir de segmentos de epicótilo, cerca de 231.41 mg, enquanto que o NAA, na concentração de 0.5 mg/l, promoveu significativamente o crescimento dos calos obtidos a partir do mesmo tipo de explante, obtendo-se em média 233.66 mg de peso da matéria fresca. Todos os demais tipos de explantes testados, tanto com 2,4-D ou NAA apresentaram valores de pesos da matéria fresca significativamente menores.



**Tabela 16.** Efeitos de 2,4-D, NAA em presença de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes de plântulas de *Cedrela fissilis* com 30 dias, germinadas na presença de luz.

Explante	Concentração (mg/l)	Peso da matéria fresca (mg)	
		2,4-D	NAA
Raízes	0.00	<sup>z</sup> 9.75 d	23.0 c
	0.25	26.00 cd	56.33 c
	0.50	58.91 bcd	72.75 c
	1.00	35.75 cd	82.08 c
Epicótilo	0.00	36.66 bcd	42.91 c
	0.25	152.83 a	209.75 b
	0.50	164.92 a	557.67 a
	1.00	204.92 a	113.75 bc
Segmento Basal do cotilédone	0.00	33.58 cd	40.83 c
	0.25	92.66 b	49.00 c
	0.50	155.08 a	46.91 c
	1.00	70.91 bc	41.91 c
Segmento Mediano do Cotilédone	0.00	37.25 bcd	38.50 c
	0.25	41.83 bcd	39.25 c
	0.50	67.50 bc	78.50 c
	1.00	49.66 bcd	74.58 c

<sup>z</sup>Valores (N=12) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 17.** Efeitos de 2.4-D, NAA e ausência de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes obtidos de plântulas de *Cedrela fissilis* com 30 dias, germinadas na presença de luz.

Explante	Concentração da auxina (mg/l)	Peso da matéria fresca (mg)	
		2.4-D	NAA
Raízes	0.00	<sup>z</sup> 7.08 i	12.83 g
	0.25	40.75 ghi	100.41 cd
	0.50	160.75 bcd	113.33 bcd
	1.00	116.08 cdef	76.41 cdef
Epicótilo	0.00	25.75 hi	33.16 fg
	0.25	83.25 efgh	122.00 bc
	0.50	183.33 ab	233.66 a
	1.00	231.41 a	156.33 b
Segmento Basal do cotilédone	0.00	41.08 ghi	42.41 efg
	0.25	98.66 defg	91.33 cde
	0.50	137.75 bcde	65.66 defg
	1.00	175.16 abc	84.75 cdef
Segmento Mediano do Cotilédone	0.00	35.16 hi	36.41 fg
	0.25	50.41 ghi	40.91 efg
	0.50	65.75 fgghi	41.75 efg
	1.00	84.83 efgh	44.83 efg

<sup>z</sup>Valores (N=12) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

#### **4.2.2. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de segmentos de raiz e de hipocótilo de plântulas de *C. fissilis* germinadas na ausência de luz**

Os efeitos de NAA e 2,4-D na formação de raízes e calos a partir de segmentos de raízes e hipocótilo estão apresentados nas **Tabelas 18 e 19**. Em nenhum dos tratamentos houve a formação de ramos. Os resultados da **Tabela 18** indicam que em segmentos de raízes ocorreu rizogênese em apenas 50% dos explantes, no tratamento com 0.5 mg/l de NAA, na ausência de luz, enquanto que em segmentos de hipocótilo ocorreu formação de raízes em todos os tratamentos com NAA, tanto na presença quanto ausência de luz, com frequências variando entre 8.33 e 50%. Os tratamentos com 2,4-D inibiram totalmente a formação de raízes. Com relação a formação de calos (**Tabela 19**), verifica-se que em segmentos de raízes houve formação de calos na presença de luz, nas concentrações de 0.50–1.0 mg/l de NAA ou 2,4-D, ao passo que na ausência de luz, apenas na concentração de 1.0 mg/l de NAA e em todas as concentrações de 2,4-D, sendo que as taxas máximas observadas (75–100%) ocorreram nas últimas condições mencionadas. Nos tratamentos controles não houve formação de calos. Com relação aos segmentos de hipocótilo, verifica-se que o 2,4-D e o NAA induziram a formação dos mesmos, em todas as concentrações, tanto na presença quanto na ausência de luz, em taxas variando de 75-100%.

**Tabela 18.** Efeitos de NAA, 2.4 D, presença e ausência de luz, na frequência (%) de rizogênese a partir de segmentos de raiz e hipocótilo de plântulas de *Cedrela fissilis* com 20 dias, germinadas na ausência de luz.

Condição de cultura	Auxina	Concentração (mg/l)	Explante	
			Raízes	Hipocótilo
Presença de luz	NAA	0.00	<sup>z</sup> 0	0
		0.25	0	50.0
		0.50	0	16.6
		1.00	0	8.33
	2.4-D	0.00	0	0
		0.25	0	0
		0.50	0	0
		1.00	0	0
Ausência de luz	NAA	0.00	0	0
		0.25	0	33.3
		0.50	50.0	16.6
		1.00	0	8.33
	2.4-D	0.00	0	0
		0.25	0	0
		0.50	0	0
		1.00	0	0

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas, após 45 dias de cultura *in vitro*.

**Tabela 19.** Efeitos de NAA, 2.4 D, presença e ausência de luz, na frequência (%) de formação de calos a partir de segmentos de raiz e hipocótilo de plântulas de *Cedrela fissilis* com 20 dias, germinadas na ausência de luz.

Condição de cultura	Auxina	Concentração (mg/l)	Explante	
			Raízes	Hipocótilo
Presença de luz	NAA	0.00	<sup>z</sup> 0	16.6
		0.25	0	83.3
		0.50	16.6	91.6
		1.00	16.6	100
	2.4-D	0.00	0	0
		0.25	0	100
		0.50	66.6	100
		1.00	16.6	100
Ausência de luz	NAA	0.00	0	0
		0.25	0	91.6
		0.50	0	83.3
		1.00	8.33	91.6
	2.4-D	0.00	0	58.3
		0.25	75.0	100
		0.50	100	100
		1.00	75	75.0

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas, após 45 dias de cultura *in vitro*.

Na **Tabela 20** estão apresentados os valores de peso da matéria fresca das culturas obtidas a partir de segmentos de raízes e hipocótilo cultivados em meios com NAA e 2,4-D, na presença e ausência de luz. Verifica-se que o tratamento com 1.0 mg/l de 2,4-D, em segmentos de hipocótilo na ausência de luz possibilitou a obtenção de valor de peso da matéria fresca cerca de 254.08 mg, significativamente superior aos demais tratamentos com este regulador. Nos tratamentos com NAA, segmentos de raízes cultivados na ausência de luz, com 1.0 mg/l e segmentos de hipocótilo, cultivados na ausência de luz, com 0.25 mg/l apresentaram respectivamente, 204.25 mg e 189.58 mg de peso da matéria fresca das culturas, valores estes estatisticamente iguais e significativamente superiores aos demais tratamentos.

**Tabela 20.** Efeitos de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz, na formação de calos a partir de segmentos de raízes e de hipocótilo de plântulas de *Cedrela fissilis* com 20 dias, germinadas na ausência de luz.

Condição de cultura	Explante	Concentração (mg/l)	Peso da matéria fresca (mg)	
			2,4-D	NAA
Presença de luz	Raízes	0.00	<sup>z</sup> 15.91 f	17.66 d
		0.25	10.91 f	13.00 d
		0.50	46.91 ef	19.75 d
		1.00	27.83 ef	18.91 d
	Hipocótilo	0.00	50.00 ef	14.50 d
		0.25	144.66 c	18.25 d
		0.50	168.50 bc	41.66 d
		1.00	176.08 bc	23.08 d
Ausência de luz	Raízes	0.00	17.08 f	51.33 d
		0.25	56.66 de	180.41 ab
		0.50	95.00 d	136.41 bc
		1.00	94.41 d	204.25 a
	Hipocótilo	0.00	40.50 ef	30.75 d
		0.25	197.91 b	189.58 a
		0.50	191.75 b	123.91 c
		1.00	254.08 a	131.41 bc

<sup>z</sup>Valores (N=12) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

### 4.2.3. Formação de calos em segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*

#### 4.2.3.1- Efeitos da posição do explante no meio de cultura

Os efeitos da posição do explante na morfogênese em segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio MS, suplementado com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA, na presença e ausência de luz, estão apresentados na **Tabela 21**. Na ausência de luz ocorreu inibição da formação de ramos, tanto nos explantes em posição horizontal quanto vertical. Porém na presença de luz as culturas na posição vertical apresentaram 50% de formação de ramos e na posição horizontal 25%. Com relação à formação de raízes somente os explantes na posição horizontal, tanto na presença quanto na ausência de luz, formaram raízes, cerca de 25.0 e 8.33%, respectivamente. Ocorreu formação de calos em 91.6% dos explantes cultivados na presença de luz na posição horizontal, enquanto que nos demais tratamentos ocorreu formação de calos em 100% dos explantes. O peso da matéria fresca de calos produzidos por segmentos nodais cotiledonares cultivados na posição vertical, na presença de luz, 493.17 mg foi significativamente superior ao tratamento posição horizontal na ausência de luz. Na presença de luz, a posição do explante parece não afetar tanto o peso da matéria fresca do calo produzido, enquanto que, na ausência de luz, os calos formados a partir do explante colocado na posição vertical parecem apresentar melhor crescimento.

**Tabela 21.** Efeitos da posição do explante, presença e ausência de luz, nas respostas morfológicas e no crescimento de calos em segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* cultivados em meio MS suplementado com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA.

Condição de Cultura	Posição do explante	Ramos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Peso da matéria fresca dos calos (mg)
Presença de luz	Horizontal	<sup>z</sup> 25.0	25.0	91.6	<sup>y</sup> 467.25 ab
	Vertical	50.0	0	100	493.17 a
Ausência de luz	Horizontal	0	8.33	100	263.50 b
	Vertical	0	0	100	431.67 ab

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas aos 45 dias.

<sup>y</sup>Valores (N=12) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

#### 4.2.3.2- Efeito de meios de cultura

Os efeitos de diferentes formulações salinas, suplementadas com, 0.5 mg/l de BA, 1.0 mg/l de NAA e 2% de sacarose, na morfogênese em segmentos nodais cotiledonares, inoculados na posição vertical, na presença de luz, estão apresentados na **Tabela 22**. Os meios MS, WPM, B5 e Kao foram os únicos onde ocorreu a indução de ramos, apresentando percentuais de 50.0, 41.6, 25.0 e 41.6% respectivamente. A formação de raízes ocorreu nos meios WPM, B5 e Kao nas porcentagens respectivas de 25.0%, 8.33% e 8.33%. Com relação a formação de calos, todas as formulações salinas promoveram a indução de calos, sendo que nos meios MS, WHITE e WPM o percentual foi de 100%, no meio SCHENK, de 91.6%, no B5 de 83.3% e no meio Kao, de 83.3%. O peso da matéria fresca dos calos obtidos no meio MS, cerca de 493.16 mg, foi significativamente superior aos demais meios de cultura, sendo que o meio WHITE foi o que produziu calos com o menor valor de peso de matéria fresca, com apenas 84.08 mg.

**Tabela 22.** Efeitos de diferentes formulações salinas de meios de cultura suplementados com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA, nas respostas morfogênicas e crescimento de calos, na presença de luz, a partir de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis*, inoculados na posição vertical.

Formulação salina	Ramos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Peso da matéria fresca dos calos (mg)
MS	<sup>z</sup> 50.0	0	100	<sup>y</sup> 493.16 a
WHITE	0	0	100	84.08 c
WPM	41.6	25.0	100	242.25 b
SCHENK	0	0	91.6	151.25 bc
B5	25.0	8.33	83.3	174.91 bc
KAO	41.6	8.33	83.3	237.66 b

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas.

<sup>y</sup>Valores (N=12) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa



#### 4.2.3.3- Efeito da concentração de sacarose

A **Tabela 23** apresenta os efeitos de diferentes concentrações de sacarose, na formação e crescimento de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio MS, suplementado com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA, na posição vertical e na presença de luz. Aumentos na concentração de sacarose interferiram nas diferentes respostas morfogênicas obtidas. Com relação à formação de ramos, concentrações de sacarose de 4, 6 e 8% diminuíram as taxas de formação de ramos para 33.3, 16.0 e 0 respectivamente, quando comparados com a concentração de 2%, onde obteve-se 50% de explantes com formação de ramos. Na concentração de sacarose de 4% obteve-se a maior taxa de formação de raízes (33.3%), sendo que aumentos na concentração para 6 e 8% diminuíram as taxas de enraizamento para 8.33 e 0% respectivamente. A percentagem de senescência dos explantes aumentou de 0% no meio com 2% de sacarose, para 8.33% em meios com 4% de sacarose, para 16.6% com 6% sacarose e 41.6% para meios com 8% de sacarose. A formação de calos diminuiu com o aumento da concentração de sacarose. As taxas de formação de calos foram de 100% em meios com 2% de sacarose para 66.6%, 58.3% e 25.0% respectivamente em meios com 4%, 6% e 8% de sacarose. O peso da matéria fresca dos calos produzidos também foi reduzido, quando aumentou-se a concentração de sacarose no meio. O meio com 2% de sacarose foi significativamente superior aos demais, produzindo cerca de 493.17 mg de peso da matéria fresca de calos, enquanto que nos meios com 4%, 6% e 8%, produziu-se respectivamente, 362.08 mg, 191.25 mg e 100.58 mg.

**Tabela 23.** Efeito de diferentes concentrações de sacarose em meio MS, suplementado com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA nas respostas morfogênicas e crescimento de calos, na presença de luz, a partir de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis*, inoculados na posição vertical.

Concentração de sacarose (%)	Ramos (%)	Raízes (%)	Senescência (%)	Calos (%)	Peso da matéria fresca dos calos (mg)
2	<sup>z</sup> 50.0	0	0	100	<sup>y</sup> 493.17 a
4	33.3	33.3	8.33	66.6	362.08 ab
6	16.6	8.33	16.6	58.3	191.25 bc
8	0	0	41.6	25.0	100.58 c

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas.

<sup>y</sup>Valores (N=12) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

### 4.3. MORFOGÊNESE “IN VITRO” EM COTILÉDONES DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

#### 4.3.1. Morfogênese “in vitro” em cotilédones isolados de *C. fissilis*

As respostas morfogênicas obtidas, a partir de culturas de cotilédones isolados de plântulas de *C. fissilis* cultivados na presença e ausência de luz, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA, estão apresentados nas Tabelas 24 e 25.

Verifica-se que, independente da origem dos cotilédones, uma proporção muito pequena, cerca de 8.33% deles formaram ramos na presença de luz. Assim, quando cotilédones foram removidos de plântulas de *C. fissilis* com 30 dias, germinadas na presença de luz, estes ramos foram formados em meio desprovido de reguladores de crescimento (Figura-6C), enquanto que em cotilédones removidos de plântulas com 20 dias de idade, germinadas na ausência de luz, estes ramos foram formados em meio contendo 0.12 mg/l de BA. Na ausência e luz, não foi observada a formação destes ramos em nenhuma das concentrações testadas.

Com relação à formação de raízes verifica-se, pelas Tabelas 24 e 25, que nos cotilédones excisados de plântulas de 30 dias, germinadas na presença de luz, ocorreu rizogênese apenas nos controles, na presença e ausência de luz (Figura-6A,B). Já nos cotilédones oriundos de plântulas com 20 dias, germinadas na ausência de luz, a rizogênese ocorreu nos controles, na presença e ausência de luz, e também em todas as concentrações de BA, na ausência de luz, mas apenas na concentração de 0.06 mg/l de BA, na presença de luz. Desta forma a adição de BA, inibiu a formação de raízes em cotilédones de plântulas de 30 dias.

A senescência dos cotilédones pareceu ter sido potencializada pela exposição a luz, uma vez que nos tratamentos na ausência de luz a taxa máxima de senescência, ao final de 45 dias de cultivo, foi de apenas 8.33%, enquanto que nos tratamentos mantidos na presença de luz, as taxas variaram entre 83.3 e 100%, mesmo nos cotilédones que formaram raízes e/ou calos. Nos tratamentos mantidos na presença de luz a senescência iniciou-se a partir da segunda semana de cultivo.

A formação de calos apenas ocorreu nos tratamentos na presença de luz e com

suplementação exógena de BA (**Figura-6D**), obtendo-se uma taxa de formação de calos máxima de 83.3%, no tratamento com 0.25 mg/l de BA, com cotilédones de plântulas com 20 dias germinadas na ausência de luz (**Tabela 25**) e de 50.0% e 58.3%, nos tratamentos com 0.25 e 0.12 mg/l de BA, respectivamente, em cotilédones de plântulas com 30 dias germinadas na presença de luz (**Tabela 24**).

**Tabela 24.** Efeitos de BA, presença e ausência de luz na morfogênese em cotilédones de plântulas de *Cedrela fissilis* com 30 dias, germinadas na presença de luz.

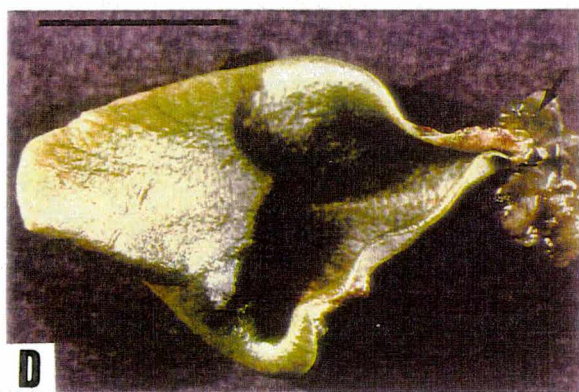
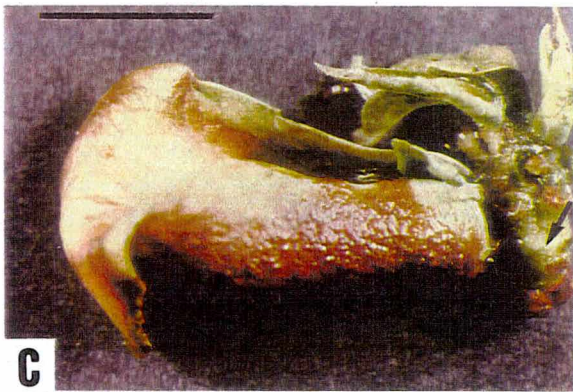
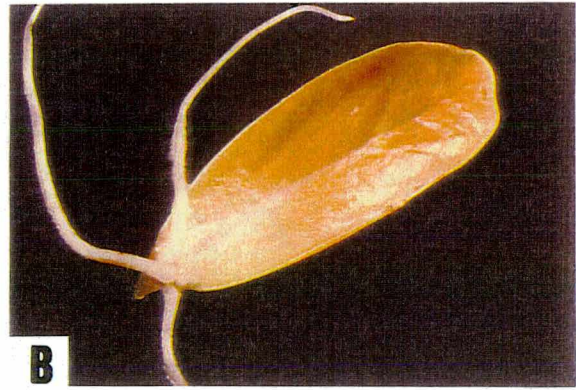
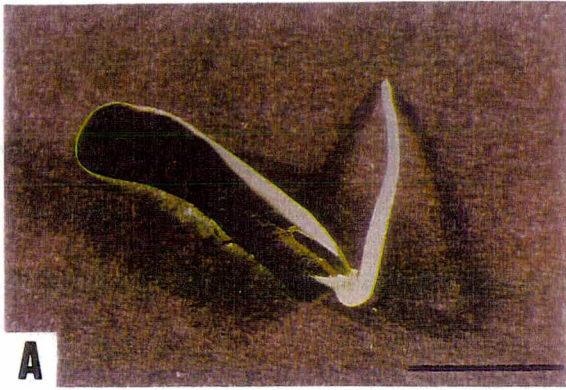
Condição de cultura	BA (mg/l)	Número De Explantes	Ramos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Senescência (%)
Ausência de luz	0.0	12	0	25.0	0	0
	0.06	12	0	0	0	8.33
	0.12	12	0	0	0	8.33
	0.25	12	0	0	0	0
Presença de luz	0.0	12	8.33	8.33	0	91.6
	0.06	12	0	0	0	100
	0.12	12	0	0	58.3	91.6
	0.25	12	0	0	50.0	100

<sup>2</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas, avaliadas aos 45 dias de cultura *in vitro*.

**Tabela 25.** Efeitos de BA, presença e ausência de luz na morfogênese em cotilédones de plântulas de *Cedrela fissilis* com 20 dias, germinadas na ausência de luz.

Condição de cultura	BA (mg/l)	Número De Explantes	Ramos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Senescência (%)
Ausência de luz	0.0	12	0	25.0	0	0
	0.06	12	0	33.3	0	8.33
	0.12	12	0	16.6	0	8.33
	0.25	12	0	8.33	0	0
Presença de luz	0.0	12	0	25.0	0	100
	0.06	12	0	8.33	0	100
	0.12	12	8.33	0	0	91.6
	0.25	12	0	0	83.3	83.3

<sup>2</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas, avaliadas aos 45 dias de cultura *in vitro*.



**Figura 6-** Rizogênese direta em cotilédones de *C. fissilis*, cultivados em meio MS na ausência de reguladores de crescimento. Cultura mantida na presença de luz (A) e ausência de luz (B). Brotações formadas no pecíolo do cotilédone de *C. fissilis* em meio MS, na presença de luz (C). Calos formado na base do pecíolo de cotilédone de *C. fissilis* em meio MS com 0.25 mg/l de BA (D). Barras = 1 cm.

#### 4.3.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos medianos de cotilédones de *C. fissilis*

Na **Tabela 26** estão apresentadas as porcentagens das diferentes respostas morfogênicas e do peso da matéria fresca das culturas obtidas a partir do cultivo de segmentos medianos de cotilédones de *C. fissilis*, cultivados em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose, 2 g/l de fitagel e com diferentes concentrações de BA e NAA, isolados ou em combinação. Verifica-se que nenhum dos tratamentos induziu a formação de ramos.

A formação de raízes esteve sempre associada à presença de NAA, em diferentes concentrações, combinado ou não com BA. Nos tratamentos sem NAA a formação de raízes não ocorreu. BA, na concentração de 3.0 mg/l, isolado ou em combinação com diferentes concentrações de NAA, inibiu a formação de raízes, exceto no tratamento em que 3.0 mg/l de BA foi combinada a 2.0 mg/l de NAA. Neste caso ocorreu a formação de raízes em 25% dos explantes. As taxas de formação de raízes foram bastante diversificadas para os diferentes tratamentos, sendo que o percentual máximo de formação de raízes, cerca de 75%, ocorreu no tratamento com 1.0 mg/l de BA e 2.0 mg/l de NAA.

Com relação à formação de calos, observa-se que estes somente se formaram quando houve a combinação de diferentes concentrações de BA e NAA, sendo que quando estes reguladores foram utilizados isoladamente não induziram a formação de calos nos segmentos de cotilédones. Normalmente associado à formação de calos ocorreu, posteriormente, a formação de raízes, exceto nos tratamentos com BA, na concentração de 3.0 mg/l. Valores de 100% de calos formados foram obtidos nos tratamentos com concentrações de 2.0 mg/l de BA combinados com NAA, nas concentrações 0.5 e 2.0 mg/l, bem como nos tratamentos com 3.0 mg/l de BA, combinados com 0.25, 0.5 e 2.0 mg/l de NAA.

Os diferentes pesos de matéria fresca das culturas obtidos refletem os pesos de matéria fresca dos calos, associados ou não às raízes. O tratamento com 3.0 mg/l de BA combinado com 0.25 mg/l de NAA produziu o maior valor de peso da matéria fresca produzida, cerca de 340.58 mg, sendo significativamente superior aos demais tratamentos.

**Tabela 26.** Efeitos de BA e NAA isolados e/ou em combinações na morfogênese de segmentos medianos de cotilédones de *Cedrela fissilis* obtidos de plântulas com 35 dias, germinadas na presença de luz.

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Ramos (%)	Raízes (%)	Senescên- cia (%)	Calos (%)	Peso da matéria Fresca das culturas (mg)
0.0	0.0	0	0	100	0	37.66 i
0.0	0.25	0	0	66.6	0	60.42 hi
0.0	0.5	0	50.0	50.0	0	118.83 fgh
0.0	1.0	0	25.0	83.3	0	54.83 hi
0.0	2.0	0	8.33	100	0	49.25 hi
0.0	3.0	0	58.3	41.6	0	127.16 efgh
0.25	0.0	0	0	100	0	35.83 i
0.25	0.25	0	8.33	75.0	0	69.91 hi
0.25	0.5	0	41.6	41.6	50.0	128.00 efgh
0.25	1.0	0	41.6	16.6	41.6	169.91 cdef
0.25	2.0	0	25.0	33.3	66.6	158.66 cdef
0.25	3.0	0	25.0	0	75.0	118.25 fgh
0.5	0.0	0	0	0	0	48.58 hi
0.5	0.25	0	8.33	16.6	75.0	136.83 defg
0.5	0.5	0	0	33.3	66.6	150.08 defg
0.5	1.0	0	8.33	16.6	75.0	119.25 fgh
0.5	2.0	0	33.3	16.6	83.3	298.58 ab
0.5	3.0	0	16.6	25.0	75.0	188.58 bcdef
1.0	0.0	0	0	83.3	16.6	69.75 hi
1.0	0.25	0	8.33	33.3	75.0	132.83 defgh
1.0	0.5	0	25.0	0	75.0	199.75 bcde
1.0	1.0	0	41.6	16.6	50.0	138.08 defg
1.0	2.0	0	75.0	33.3	91.6	205.08 bcde
1.0	3.0	0	16.6	33.3	83.3	218.75 bcde
2.0	0.0	0	0	100	0	80.33 ghi
2.0	0.25	0	25.0	25.0	66.6	236.41 bcd
2.0	0.5	0	8.33	0	100	196.66 bcde
2.0	1.0	0	16.6	8.33	83.3	227.41 bcde
2.0	2.0	0	41.6	0	100	316.83 ab
2.0	3.0	0	8.33	16.6	83.3	144.08 defg
3.0	0.0	0	0	100	0	52.08 hi
3.0	0.25	0	0	0	100	340.58 a
3.0	0.5	0	0	0	100	297.66 ab
3.0	1.0	0	0	16.6	83.3	166.25 cdef
3.0	2.0	0	25.0	0	100	302.50 ab
3.0	3.0	0	0	8.33	91.6	253.91 abc

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 culturas.

<sup>y</sup>Valores (N=12) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

#### 4.4. CONSERVAÇÃO “IN VITRO” DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

##### 4.4.1. Conservação “in vitro” de ápices e segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*

###### 4.4.1.1. Desenvolvimento dos explantes encapsulados em meio de recuperação padrão

A capacidade de ápices, segmentos nodais foliares e cotiledonares retomarem o crescimento após o encapsulamento em alginato de cálcio (**Figura-7A,B**) está apresentada na **Tabela 27**. Observa-se que estes explantes, encapsulados em alginato, iniciaram o rebrotamento já a partir do 5º dia e atingiram valores máximos de rebrotamento, 100, 100 e 98.0% para ápices, segmentos nodais cotiledonares e foliares respectivamente, por volta do 13º dia após a inoculação das cápsulas em meio de recuperação (**Figura-7D**).

A **Tabela 28** mostra as taxas de formação de raízes, de ramos, de calos e senescência destes explantes encapsulados, após 18 dias no meio de recuperação e em seguida inoculados em meios com diferentes concentrações de IBA, para induzir o enraizamento. Verificou-se que, para todos os explantes, os valores máximos de enraizamento alcançados, ocorreram nos tratamentos com IBA nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg/l, após 45 dias de cultivo. Foram atingidos valores máximos de enraizamento de ápices de 58.3% em meio com 1.0 mg/l de IBA, de segmento nodais cotiledonares, também de 58.3%, em meio com 0.5 mg/l de IBA e de nós foliares em meios com 0.5 e 1.0 mg/l de IBA. Houve a formação de ramos em 100% dos diferentes explantes encapsulados no diferentes tratamentos com IBA. Não ocorreram a formação de calos e tampouco a senescência dos explantes ao final de 45 dias de cultivo.

Os efeitos do cultivo, por 45 dias dos explantes encapsulados em meios com diferentes concentrações de IBA, sobre alguns parâmetros de crescimento, após rebrotamento dos mesmos em meio de recuperação por 18 dias, estão apresentados na **Tabela 29**. Com relação ao número de ramos, nós foliares encapsulados, inoculados em meio com 1.0 mg/l de IBA, tiveram desempenho significativamente superior aos demais explantes, nos diferentes meios, produzindo 1.91 ramos por nó foliar encapsulado. Quanto aos demais parâmetros de crescimento avaliados, os ápices encapsulados, inoculados em meio com 0.5 mg/l de IBA, apresentaram valores significativamente superiores aos demais



tratamentos, sendo com relação ao comprimento de ramos (3.4 cm), número de nós (7.9), número de gemas (9.0) e número de folhas (7.6). A exceção se deu com relação ao número de raízes, onde cápsulas de segmentos nodais cotiledonares rebrotados, inoculados em meio com 0.5 mg/l de IBA, formaram 1.5 raízes por explante, sendo significativamente superior aos demais tratamentos. Com relação ao comprimento das raízes não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, atingindo-se valores máximos de 6.5 e 5.1 cm em segmentos nodais cotiledonares e ápices em meio com 1.0 mg/l de IBA, respectivamente, e 4.3 cm em segmentos nodais foliares em meio com 0.5 mg/l de IBA.

#### **4.4.1.2. Armazenamento de ápices e segmentos nodais cotiledonares encapsulados em substratos com diferentes concentrações de ágar**

A capacidade de sobrevivência de ápices e segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*, encapsulados em alginato de cálcio contendo MS e 2% de sacarose, armazenados em meios limitantes ao crescimento compostos por água destilada e diferentes concentrações de ágar (**Figura-7C**), por períodos de 3, 6 e 9 meses, e após inoculados em meio de recuperação estão apresentados nas **Tabelas 30, 31 e 32**, respectivamente.

Após 3 meses de armazenamento, tanto ápices quanto segmentos nodais cotiledonares encapsulados, mantiveram uma capacidade de rebrotamento bastante alta, com valores variando entre 81.2 e 100% de rebrotamento. Segmentos nodais cotiledonares encapsulados, quando armazenados em meio com 0.4 e 0.7% de ágar e ápices encapsulados em meio com 0.7% de ágar, após 3 meses de armazenamento, apresentaram capacidade de rebrotamento significativamente superiores aos demais tratamentos, atingindo valores de 100, 95.8 e 95.8% de rebrotamento, respectivamente, após 23 dias de cultivo em meio de recuperação. Ápices encapsulados armazenados em meio com 1.0% de ágar apresentaram porcentagens de rebrotamento significativamente inferiores aos tratamentos com 0.7% e também em relação aos segmentos nodais cotiledonares em 0.4 e 0.7%.

Após 6 meses de armazenamento, a capacidade de rebrotamento, tanto de segmentos nodais cotiledonares quanto de ápices foi praticamente reduzida para menos da metade. Ápices encapsulados, armazenados em meio com 0.4% de ágar, possibilitaram durante todo

o período de avaliação, valores percentuais de rebrotamento significativamente superiores aos demais tratamentos, estabilizando ao final de 23 dias em 43.7%.

A capacidade de rebrotamento destes explantes, reduziu-se drasticamente, após 9 meses de armazenamento. Nesta situação obteve-se valores que variaram entre 2.1 e 6.2% de rebrotamento ao final de 23 dias de cultivo. Não houve diferenças significativas ao longo de todo período de avaliação do rebrotamento, nos diferentes tratamentos, apesar dos maiores valores 8.3%, para segmentos nodais cotiledonares, e 6.2%, para ápices, terem sido observados em ágar 0.4%.

**Tabela 27.** Rebrotamento (%) de explantes de *Cedrela fissilis*, encapsulados em alginato de cálcio e inoculados em meio MS suplementado com 0.5 mg/l de BA.

Explantes	Tempo (dias)				
	5	7	9	11	13
Ápices	<sup>z</sup> 19.4	41.6	96.7	100	100
Segmentos nodais cotiledonares	10.4	22.9	52.0	95.8	100
Segmentos nodais foliares	8.3	20.8	54.0	91.6	98.0

<sup>z</sup>Valores obtidos, são as médias de 3 repetições com 12 explantes cada.

**Tabela 28.** Frequência (%) de respostas morfogênicas produzidas em culturas de ápices e de segmentos nodais cotiledonares e foliares de *Cedrela fissilis* encapsulados, rebrotados em meio de recuperação e transferidos para o meio MS suplementado com IBA. Dados após 45 dias de cultura *in vitro*.

Explante	IBA (mg/l)	Ramos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Senescência (%)
Segmentos nodais	0.0	<sup>z</sup> 100	16.6	0	0
	0.25	100	58.3	0	0
Cotiledonares	0.5	100	58.3	0	0
	1.0	100	50.0	0	0
Segmentos nodais	0.0	100	25.0	0	0
	0.25	100	25.0	0	0
Foliares	0.5	100	41.6	0	0
	1.0	100	41.6	0	0
Ápices	0.0	100	41.6	0	0
	0.5	100	50.0	0	0
	1.0	100	58.3	0	0

<sup>z</sup>Valores foram obtidos a partir de no mínimo 3 repetições de 12 explantes.

**Tabela 29.** Efeito de IBA no desenvolvimento de microplantas de *Cedrela fissilis* obtidas a partir de ápices e de segmentos nodais cotiledonares e foliares encapsulados, rebrotados em meio de recuperação e transferidos para o meio MS suplementado com IBA. Dados após 45 dias de cultivo *in vitro*.

Explante	IBA (mg/l)	Número de ramos	Comprimento ramos (cm)	Número de nós	Número de gemas	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)
Segmento nodal	0.0	<sup>z</sup> 1.58 ab	1.01 d	4.50 cd	6.33 bc	5.29 abc	0.16 c	2.30 a
	0.25	1.50 b	2.85 abc	6.45 abcd	7.95 abc	6.95 abc	1.25 ab	5.56 a
Cotiledonar	0.5	1.66 ab	1.74 abcd	6.37 abcd	7.91 abc	6.70 abc	1.50 a	3.26 a
	1.0	1.66 ab	2.92 abc	7.08 ab	8.75 a	7.33 ab	1.25 ab	6.47 a
Segmento nodal	0.0	1.66 ab	1.49 cd	4.33 d	6.20 bc	5.12 bc	0.75 abc	1.90 a
	0.25	1.50 b	0.98 d	4.88 bcd	6.25 bc	5.25 abc	0.25 bc	2.08 a
Foliar	0.5	1.41 b	1.46 cd	4.95 bcd	6.79 abc	5.70 abc	0.83 abc	4.33 a
	1.0	1.91 a	1.70 bcd	4.37 d	5.66 c	4.62 c	0.91 abc	3.52 a
Ápices	0.0	1.00 c	1.68 cd	6.41 abcd	7.58 abc	6.58 abc	0.75 abc	4.21 a
	0.5	1.00 c	3.36 a	7.91 a	9.00 a	7.58 a	1.00 abc	3.47 a
	1.0	1.00 c	3.33 a	7.00 abc	8.08 ab	6.75 abc	0.91 abc	5.12 a

<sup>z</sup>Valores (N=36-48) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 30.** Frequência (%) de rebrotamento em meio MS com 0.5 mg/l de BA, de ápices e de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* encapsulados em alginato e armazenados por 3 meses em meio com água destilada e ágar em diferentes concentrações.

Explante	Ágar (%)	Tempo (dias)									
		5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
Segmentos nodais cotiledonares	0.4	<sup>z</sup> 56.2	70.8	89.5	100	100	100	100	100	100	<sup>y</sup> 100 a
	0.7	33.3	62.5	81.2	89.5	93.7	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8 a
	1.0	33.3	66.6	72.8	87.4	89.5	89.5	89.5	93.7	93.7	93.7 ab
Ápices	0.4	33.3	50.0	56.2	74.9	81.2	81.2	85.4	85.4	85.4	91.6 ab
	0.7	33.3	52.0	52.0	77.0	81.2	83.3	85.4	85.4	91.6	95.8 a
	1.0	29.1	41.6	54.1	73.0	73.0	73.0	77.0	77.0	79.0	81.2 b

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 4 repetições de 12 explantes por tratamento.

<sup>y</sup>Valores (N=48) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 31.** Frequência (%) de rebrotamento em meio MS com 0.5 mg/l de BA, de ápices e de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* encapsulados em alginato e armazenados por 6 meses em meio com água destilada e ágar em diferentes concentrações.

Explante	Ágar (%)	Tempo (dias)									
		5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
Segmentos nodais cotiledonares	0.4	<sup>z</sup> 0.0	4.1	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	14.5	14.5	<sup>y</sup> 14.5 b
	0.7	0.0	4.1	10.3	12.5	16.6	16.6	16.6	18.7	18.7	20.8 b
	1.0	0.0	0.0	8.3	14.5	18.7	20.8	20.8	20.8	20.8	20.8 b
Ápices	0.4	14.5	29.1	35.4	37.5	37.5	37.5	37.5	41.6	41.6	43.7 a
	0.7	6.3	14.5	18.7	20.8	23.0	23.0	25.0	25.0	29.1	29.1 ab
	1.0	2.1	4.1	8.3	8.3	8.3	8.3	10.4	12.5	12.5	14.5 b

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 4 repetições de 12 explantes por tratamento.

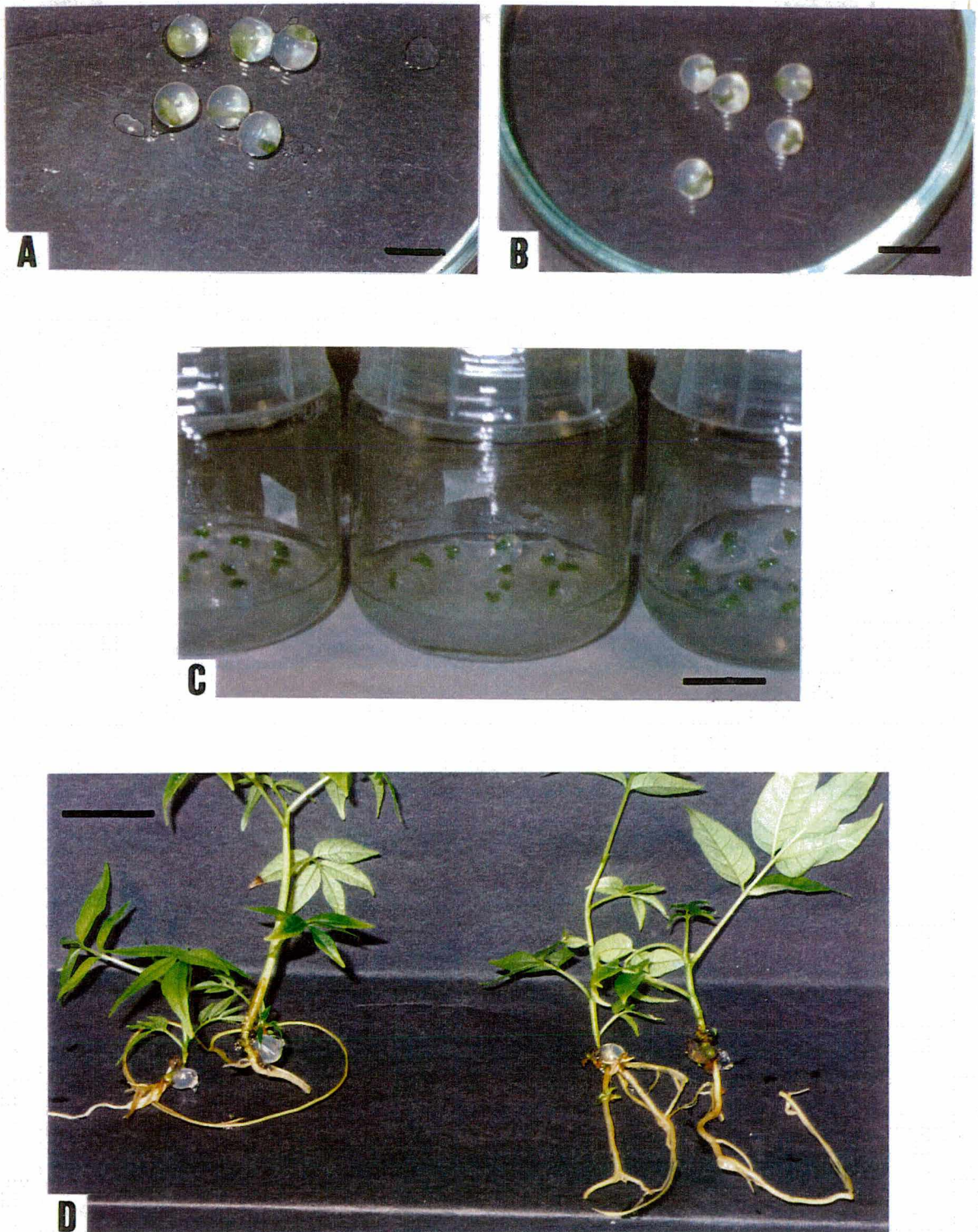
<sup>y</sup>Valores (N=48) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 32.** Frequência (%) de rebrotamento em meio MS com 0.5 mg/l de BA, de ápices e de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* encapsulados em alginato e armazenados por 9 meses em meio com água destilada e ágar em diferentes concentrações.

Explante	Ágar (%)	Tempo (dias)									
		5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
Segmentos nodais cotiledonares	0.4	<sup>z</sup> 0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	2.1	4.1	4.1	<sup>y</sup> 8.3 a
	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	2.1	4.1	4.1	4.1 a
	1.0	2.1	2.1	2.1	4.1	4.1	4.1	4.1	6.2	6.2	6.2 a
Ápices	0.4	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	4.1	4.1	6.2 a
	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	2.1	2.1	2.1 a
	1.0	0.0	0.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1 a

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 4 repetições de 12 explantes por tratamento.

<sup>y</sup>Valores (N=48) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.



**Figura 7-** Segmento nodais cotiledonares de *C. fissilis* encapsulados em alginato (A). Ápices de *C. fissilis* encapsulados em alginato (B). Segmentos nodais cotiledonares encapsulados em alginato, armazenados em meio limitante ao crescimento (C). Microplantas de *C. fissilis*, com 90 dias, obtidas de ápices (esquerda) e segmentos nodais cotiledonares (direita) rebrotados em meio MS com 0.5 mg/l de BA (D). Barras = 1 cm.

#### 4.4.2. Criopreservação de sementes de *C. fissilis*

Os dados da **Tabela 33** indicam que as sementes de *C. fissilis*, que foram criopreservadas em nitrogênio líquido, possuíam teor de umidade em torno de 6-7%. Na **Tabela 34** e **Figura 8**, estão apresentadas as taxas e as curvas de germinação de sementes, que foram criopreservadas em nitrogênio líquido (**Figura-9A**), bem como a germinação de sementes que não sofreram tal tratamento. Observa-se que no final de 10 dias o percentual de sementes germinadas nas duas condições não foi estatisticamente diferente, apesar de terem sido detectadas diferenças estatísticas no terceiro dia, sendo significativamente maiores as porcentagens de germinação das sementes criopreservadas (28.3%). Obteve-se valores máximos de germinação de 91.6% e 90% para sementes criopreservadas e não criopreservadas, respectivamente. Esta mesma constatação foi verificada pelo teste de tetrazólio (**Figura-9B**), realizado com sementes criopreservadas e não criopreservadas, cujos resultados estão apresentados na **Tabela 35**. Verifica-se que não houve diferença significativa na viabilidade, tanto para sementes criopreservadas quanto para as não criopreservadas, sendo detectadas taxas de viabilidade de 93.3 e 94.9%.

O crescimento das plântulas em substrato areia/solo (**Figura-9C,D**), obtidas a partir de sementes criopreservadas e não criopreservadas estão apresentados na **Tabela 36**. Observa-se que não houve diferença significativa para todos os parâmetros de crescimento avaliados, tanto aos 15 quanto aos 30 dias após a transferência.

**Tabela 33.** Teor (%) de umidade de sementes de *Cedrela fissilis*, após diferentes tempos de secagem em estufa a 75° C.

Repetição	Peso da matéria Fresca (mg)	Peso da matéria seca após 48 h (mg)	Água (%)
Lote 1	337	313	7.1
Lote 2	311	290	6.7
Lote 3	303	285	5.9
Média± DP	<sup>z</sup> 317±17.7	296±14.9	6.56±0.61

<sup>z</sup>Valores foram obtidos a partir de três repetições de 10 sementes.

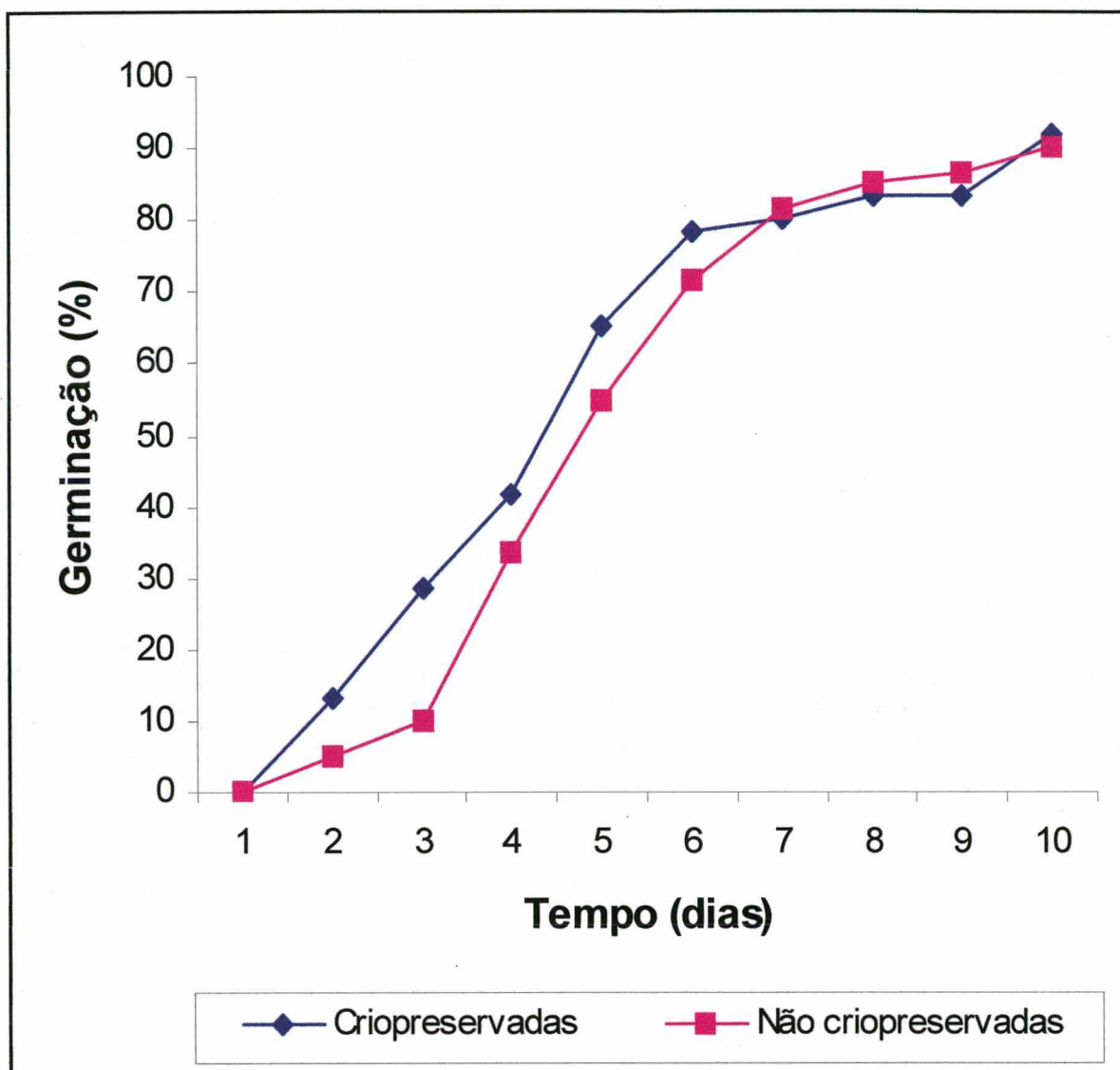


**Tabela 34.** Germinação (%) em placas de Petri forrada com papel filtro umedecido, de sementes de *Cedrela fissilis*, criopreservadas e não criopreservadas em nitrogênio líquido.

Tratamento	Repetição	Tempo (dias)								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sementes criopreservadas	1	<sup>z</sup> 0	16.6	33.3	66.6	83.3	83.3	83.3	83.3	100
	2	8.33	33.3	50.0	66.6	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0
	3	25.0	33.3	66.6	83.3	83.3	83.3	91.6	91.6	91.6
	4	25.0	50.0	50.0	50.0	66.6	75.0	75.0	75.0	91.6
	5	8.33	8.33	8.33	58.3	83.3	83.3	91.6	91.6	100
	Média	<sup>y</sup> 13.3 a	28.3 a	41.6 a	64.9 a	78.3 a	79.9 a	83.3 a	83.3 a	91.6 a
Sementes não criopreservadas	1	<sup>z</sup> 0	8.33	16.6	41.6	58.3	83.3	83.3	83.3	83.3
	2	8.33	16.6	33.3	58.3	83.3	83.3	91.6	91.6	100
	3	0	8.33	58.3	66.6	83.3	83.3	83.3	83.3	91.6
	4	8.33	8.33	33.3	58.3	58.3	75.0	75.0	83.3	83.3
	5	8.33	8.33	25.0	50.0	75.0	83.3	91.6	91.6	91.6
	Média	4.9 a	9.9 b	33.3 a	54.9 a	71.6 a	81.6 a	84.9 a	86.6 a	89.9 a

<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 12 sementes.

<sup>y</sup>Valores (N=5) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.



**Figura 8** – Curva de germinação em placas de Petri em papel de filtro umedecido, de sementes de *Cedrela fissilis*, criopreservadas e não criopreservadas em nitrogênio líquido.

**Tabela 35.** Viabilidade (%) de sementes de *Cedrela fissilis*, não criopreservadas e após criopreservação em nitrogênio líquido, determinada pelo teste de tetrazólio.

Tratamento	Repetições	Viabilidade (%)
Sementes não criopreservadas	1	<sup>z</sup> 91.6
	2	100
	3	91.6
	4	91.6
	5	100
	Média	<sup>y</sup> 94.9 a
Sementes criopreservadas	1	100
	2	100
	3	91.6
	4	91.6
	5	83.3
	Média	93.3 a

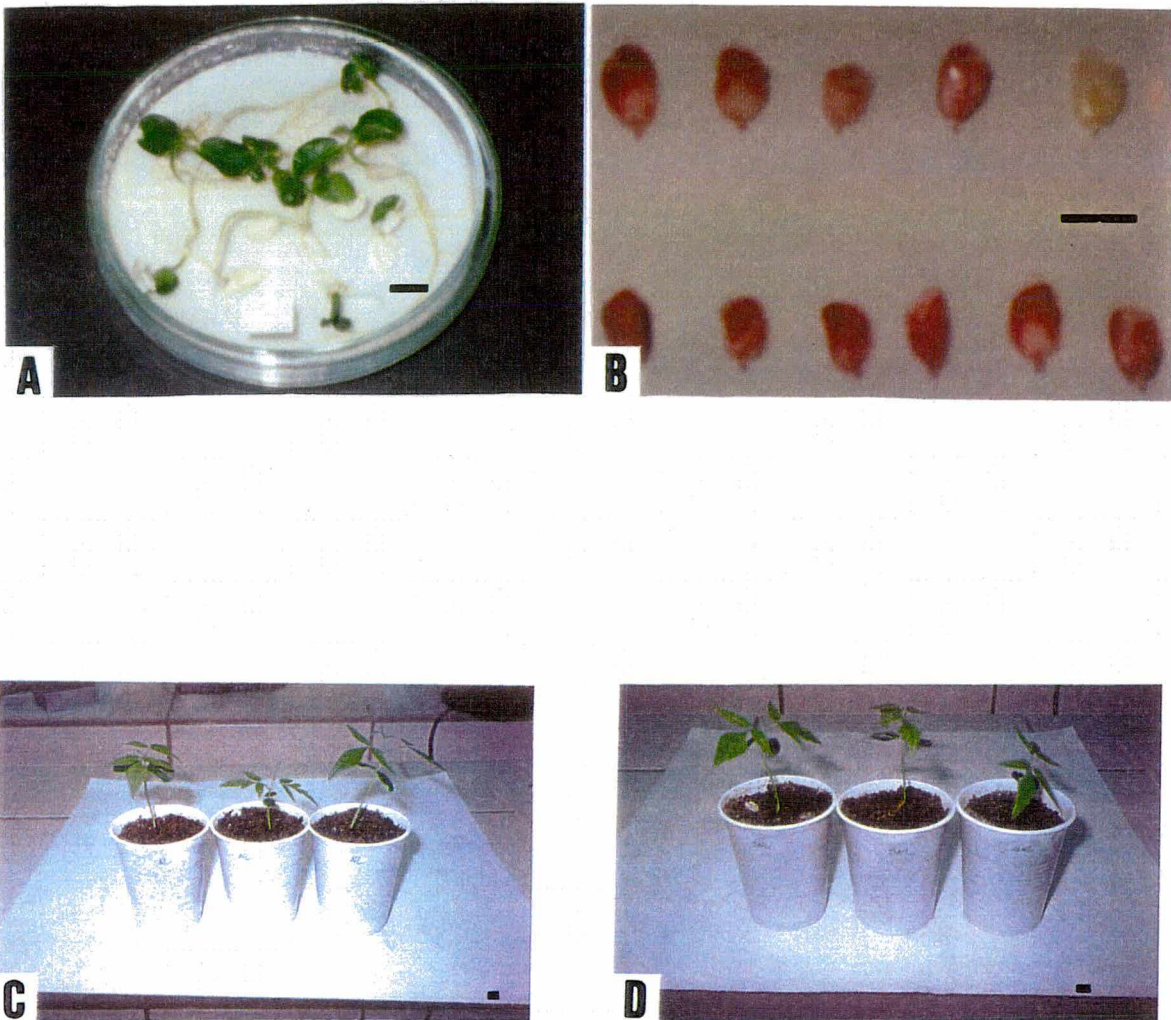
<sup>z</sup>Valores são proporções obtidas de 5 repetições de 12 sementes.

<sup>y</sup>Valores (N=5) da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

**Tabela 36.** Crescimento em substrato areia/solo, aos 15 e 30 dias após transplante, de plântulas de *Cedrela fissilis*, obtidas a partir da germinação de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido (A) e não criopreservadas (B).

Períodos de avaliação (dias)	Tratamentos	Comprimento dos ramos (cm)	Número de nós	Número de gemas	Número de folhas
15	A	<sup>z</sup> 4.42 a	3.8 a	5.9 a	2.9 a
	B	4.74 a	3.7 a	5.9 a	3.1 a
30	A	5.35 a	4.0 a	6.1 a	3.7 a
	B	5.30 a	3.9 a	6.3 a	4.0 a

<sup>z</sup>Valores (N=10) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima significativa.



**Figura 9-** Germinação de sementes de *C. fissilis* criopreservadas em nitrogênio líquido (A). Teste de tetrazólio em sementes de *C. fissilis* criopreservadas (acima) e não criopreservadas (abaixo) (B). Crescimento em substrato areia/solo de plântulas de *C. fissilis* após 15 dias, obtidas da germinação de sementes criopreservadas (C) e não criopreservadas (D). Barras = 1 cm.

## 5- DISCUSSÃO

### 5.1. Micropropagação de *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

#### 5.1.1. Germinação “in vitro” de *C. fissilis*

Para viabilizar os estudos de germinação e crescimento “in vitro” de *C. fissilis* foi necessário inicialmente o estabelecimento de uma forma eficiente de assepsia das sementes, que não prejudicasse a germinação e que ao mesmo tempo permitisse a obtenção de plântulas axênicas com sucesso. MORENO & VIANA (1996) e CASTILHO & VIANA (1997) obtiveram sucesso com protocolos de desinfecção de sementes de *C. fissilis* e *C. mexicana*, respectivamente, baseados principalmente na imersão das sementes por 45 minutos em uma solução comercial de hipoclorito de sódio, com 2.5 % de cloro ativo em câmara de fluxo laminar. Esta mesma metodologia foi adotada para possibilitar a desinfecção das sementes do lote utilizado neste trabalho. No entanto, a mesma não se mostrou eficiente, ocorrendo altas taxas de contaminação “in vitro”, em torno de 50%.

Como a desinfecção eficiente é crucial para o estabelecimento de sistemas eficazes de cultivo “in vitro”, alguns experimentos foram conduzidos nesse trabalho visando a otimização do protocolo. Esses experimentos indicaram que a utilização de uma solução comercial de hipoclorito de sódio (2.5 % de cloro ativo), para a imersão das sementes durante 75 minutos, em câmara de fluxo laminar, foi a forma mais eficiente de desinfecção, permitindo a germinação normal das sementes “in vitro”, com assepsia total. Podemos concluir desta forma, que quando se trabalha com lotes de sementes de uma mesma espécie, porém de procedências diferentes o processo de desinfecção básico das mesmas talvez tenha que ser ajustado, para garantir maior eficiência. Essa constatação deve estar relacionada com fatores como: o ambiente, o período e formas de coleta, assim como com o beneficiamento e armazenamento das sementes. É importante ressaltar que os trabalhos sobre cultura “in vitro” de árvores normalmente utilizam sementes como explante inicial, para estabelecimento de culturas assépticas, em função principalmente das dificuldades de

coleta e de desinfecção de outros tipos de explantes como meristemas apicais ou gemas axilares de árvores adultas.

A germinação “in vitro” de *C. fissilis* ocorreu de forma muito rápida, a partir do 3º dia de cultivo e estabilizando-se ao redor do 12º dia, obtendo-se uma taxa de germinação média de 97.14%. Esta germinação rápida é importante, uma vez que possibilita a obtenção de plântulas uniformes em grande quantidade, num curto espaço de tempo, das quais serão excisados os explantes para a realização dos experimentos de cultivo “in vitro”.

MORENO & VIANA (1996) estudando o comportamento germinativo de sementes *C. fissilis* “in vitro”, de procedência diferente, obtiveram resultados semelhantes, sendo que a germinação iniciou-se a partir do 4º dia e taxas de germinação, entre 85 e 100% foram atingidas ao redor do 12º dia. Observaram também que diferentes meios de cultura não afetaram significativamente a germinação e o crescimento inicial desta espécie. Estudos similares conduzidos posteriormente com *C. fissilis* e *C. mexicana* (CASTILHO & VIANA, 1997) confirmaram estes resultados, demonstrando que a germinação nas duas espécies ocorreu a partir do 3º dia de cultivo, estabilizando-se também no 12º dia, sendo que em *C. mexicana* a germinação iniciou-se antes, e as taxas de germinação aumentaram mais lentamente do que para *C. fissilis*. Mas ao final de 15 dias, foram obtidas taxas de germinação médias de 95.5% e de 81.67%, respectivamente para *C. fissilis* e *C. mexicana*.

Estudos de germinação “ex vitro”, mostram que em *C. fissilis* a germinação inicia-se entre o 5º e o 7º dia após a semeadura, com taxas de germinação entre 35 a 95%, com média de 70% (CARVALHO, 1994). REITZ et al. (1979) destacam como uma importante característica de *C. fissilis* a germinação rápida (10-20 dias). LORENZI (1992) também realça como importante a característica de rápida (12-18 dias) e abundante germinação desta espécie, bem como a rápida obtenção de mudas prontas para o plantio.

As sementes de *C. fissilis* são ortodoxas, o que significa que perdem gradativamente a viabilidade e portanto a capacidade de germinação, quando armazenadas em condições ambientais de baixa umidade e alta temperatura, porém, se armazenadas em câmara fria, em baixa umidade, mantém a sua viabilidade integral por até 3 anos (CARVALHO, 1994). LORENZI (1992) diz que a viabilidade das sementes se mantém por um período superior a 4 meses, em condições normais de armazenamento, desde que os frutos sejam colhidos

diretamente das árvores e que logo em seguida sejam secados ao sol para completar a abertura e liberação das sementes.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que, “in vitro”, tanto o início da germinação, bem como as taxas máximas podem ser alcançadas em período de tempo menor do que “ex vitro”.

O estabelecimento de condições otimizadas, assim como o conhecimento sobre os padrões de germinação “in vitro”, são importantes como referência para estudos posteriores, sobre a utilização de criopreservação de sementes ou embriões zigóticos de *C. fissilis*. Estas técnicas tem sido empregadas para muitas espécies de árvores incluindo algumas Meliáceas como *Swietenia macrophylla* e *Melia azaderach* (MARZALINA & KRISHNAPILLAY, 1999).

#### **5.1.2. Crescimento inicial de plântulas de *C. fissilis* “in vitro”**

Os dados sobre o crescimento inicial de plântulas de *C. fissilis* são importantes, pois indicam que, após 30 dias de cultivo “in vitro”, as plântulas axênicas produzidas, apresentaram crescimento suficiente para serem utilizadas como fonte de diferentes explantes, para os experimentos de micropropagação, indução de calos, conservação “in vitro” de germoplasma e cultura de raízes. Uma outra constatação importante é que neste período de desenvolvimento “in vitro” as plântulas não apresentaram sintomas visuais de desenvolvimento anormal, indicando que o processo de desinfecção, bem como o meio de cultura e as condições ambientais foram adequados.

CASTILHO & VIANA (1997) obtiveram resultados muito semelhantes aos obtidos neste trabalho, quando também avaliaram o crescimento “in vitro” de lotes de procedências diferentes de *C. fissilis*. Os resultados obtidos por estes pesquisadores indicaram que as plântulas apresentavam dois tipos de nós, um cotiledonar e um apical, contendo em média 4 gemas, comprimento total de  $15.8 \pm 0.447$  cm, comprimento da parte aérea de  $8.1 \pm 0.652$  cm, apresentando em média 4 folhas e comprimento médio da raiz principal de  $7.9 \pm 0.418$  cm. Esses dados indicam que o crescimento inicial “in vitro”, em meio MS, de plântulas desta espécie é semelhante, apesar das plântulas terem sido obtidas a partir de sementes de diferentes procedências.

Estudos preliminares realizados por MORENO & VIANA (1996) sobre a influência dos meios MS, B5, WPM, KM, SH e AR sobre o crescimento inicial “in vitro” de plântulas de *C. fissilis* indicaram que não houve diferença significativa em termos de peso da matéria fresca, peso da matéria seca, comprimento total das plântulas e número de folhas. Entretanto diferenças significativas foram detectadas em termos do número de raízes secundárias e na altura das plântulas. Assim as plântulas crescidas nos meios B5, KM e AR apresentaram alturas significativamente menores (cerca de 3.0-4.0 cm em média) em relação às crescidas em meio MS, WPM e SH. Da mesma forma, em termos do número de raízes secundárias, os meios B5, KM e SH estimularam significativamente o crescimento das mesmas em relação aos meios WPM, AR e MS. Isso indica que a escolha do meio para o crescimento inicial das plântulas, que servirão como fonte de explantes deve ser adequada aos propósitos dos experimentos. Caso o objetivo seja a obtenção de segmentos nodais, como neste trabalho, é importante que sejam utilizados meios como o MS que propiciou maior altura e por conseguinte maior distância entre nós, o que facilitou a remoção dos mesmos.

### **5.1.3. Morfogênese “in vitro” em segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis***

Os resultados indicam que BA nas concentrações de 0.0, 0.25, 0.5 e 1.0 mg/l possibilitaram que em 100% dos seguimentos nodais cotiledonares ocorresse a formação de ramos. Enquanto que combinando-se essas mesmas concentrações de BA com NAA nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg/l ocorreu redução na freqüência de ramos formados. Isto significa que concentrações acima de 0.25 mg/l de NAA isoladas e/ou em combinação com BA inibiram a formação de ramos em segmentos de nós cotiledonares de *C. fissilis*, pelo bloqueio do desenvolvimento das gemas axilares. Este fato foi reforçado pela observação de que na ausência de BA, nos tratamentos sem reguladores ou com 0.25 mg/l de NAA ocorreu a indução de formação de ramos em 100% dos explantes, enquanto que nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg/l de NAA apenas 73% dos explantes formaram ramos.

A formação de raízes ocorreu em maior freqüência nos meios sem a presença de BA e NAA. Nos meios com BA não ocorreu a formação de raízes, porém nos meios onde houve a ação combinada de BA com NAA, observou-se enraizamento. Isto indica que o BA



inibiu a formação de raízes e que o NAA reverteu o processo, induzindo um percentual máximo de 66% de culturas enraizadas no tratamento com 0.25 mg/l de BA e NAA 0.25 mg/l.

Diferentemente do que ocorreu com as raízes, a formação de calos nestes explantes foi dependente da ação isolada e/ou conjunta de BA e NAA. O tratamento controle, sem a presença de reguladores de crescimento, não propiciou a formação de calos. Entretanto houve de 70-100% de formação de calos em todos os casos em que o BA foi utilizado em combinação com concentrações de NAA ou quando o NAA foi utilizado isoladamente.

Análises histológicas realizadas preliminarmente indicaram que existem apenas duas gemas pré-formadas nas axilas de nós cotiledonares de *C. fissilis* e portanto é possível que, os ramos excedentes detectados nas culturas de nós cotiledonares em meios com 0.25 e 0.5 mg/l de BA na ausência de NAA, sejam ramos adventícios originados a partir dos calos formados na base das gemas axilares. Estudos mais aprofundados a este respeito devem ser conduzidos para elucidar esta questão e se realmente for confirmada a regeneração de ramos adventícios o sistema poderá ser utilizado em experimentos de transformação genética.

Com relação ao comprimento dos ramos, o NAA a 1.0 mg/l, usado isoladamente ou em combinação com diferentes concentrações de BA, mostrou-se inibitório ao crescimento dos ramos. CASTILHO & VIANA (1997), obtiveram os maiores valores relacionados ao comprimento de ramos, com a combinação de BA e NAA na concentração de 0.25 mg/l para ambos, com ramos atingindo  $0.7 \pm 0.503$  cm, mas constataram entretanto que o aumento das concentrações de BA e NAA isoladamente ou em combinação exerceram um efeito inibitório no alongamento dos ramos. Houve portanto diferenças em termos de resultados encontrados com relação ao comprimento de ramos. Este tipo de constatação foi de certa forma discutido por ZEL et al. (1988), onde afirmam que estas diferenças são devidas à utilização de explantes de diferentes sementes, uma vez que cada semente possui genótipo diferente das demais e possivelmente à diferença nos níveis de hormônios endógenos. Estes autores alertaram ainda para o fato da organogênese ser complexa e regulada por muitos fatores, mesmo em condições controladas. Logo, a interação entre a quantidade de hormônios endógenos e exógenos definirá, em última análise, as respostas

morfogênicas obtidas, podendo, portanto, resultar na obtenção de resultados diferentes, quando se trabalha com diferentes genótipos de uma mesma espécie.

O NAA em níveis crescentes isoladamente ou em combinação com BA reduziu e/ou inibiu o aumento de número de nós formados e em consequência o número de gemas formadas. O número de nós e gemas produzidos são importantes pois serão fontes de novos propágulos para a multiplicação e determinantes da taxa de multiplicação num sistema de micropropagação eficiente.

Concentrações crescentes de BA inibiram a formação e o crescimento de raízes. O NAA combinado ao BA reverteu o efeito inibitório provocado. Logo para formação de raízes a presença de BA e/ou NAA é dispensável, pois o maior número e o máximo comprimento de raízes foram obtidos no tratamento sem reguladores de crescimento, onde foram formadas 2.27 raízes por explante, com comprimento médio de 5.75 cm, valores esses significativamente diferentes dos obtidos nos demais tratamentos. Sendo assim, para estes propósitos especificamente, BA e NAA não exerceram efeitos significativos sendo suficiente somente um meio de cultura contendo macronutrientes, micronutrientes e sacarose.

Efeito sinérgico no aumento do peso da matéria fresca das culturas, e especialmente no crescimento dos calos, foi detectado no tratamento com BA a 0.5 mg/l combinado com NAA a 1.0 mg/l. Este fato é reforçado pela constatação de que nos tratamentos com estes reguladores de crescimento agindo isoladamente o peso da matéria fresca obtido foi bem menor.

Os níveis de citocinina/auxina afetam a organogênese de forma geral, quando os níveis de auxinas relativas as citocininas são altos, ocorre a rizogênese. Quando ocorre o inverso, ramos são formados e quando os níveis entre auxinas e citocininas são proporcionais, calos são produzidos (KRIKORIAN et al., 1990). Logo, dependendo da resposta que se deseja obter, existe uma combinação apropriada entre essas duas classes de reguladores de crescimento. Por exemplo, LEMOS & BLAKE (1996), observaram que para *Annona muricata* (graviola), para cada concentração de BA utilizado, existiu uma concentração correspondente ótima de NAA que produziu um número máximo de ramos.

Neste trabalho a indução e produção de calos foi também inversamente proporcional à indução e quantidade de ramos produzidos em segmentos nodais cotiledonares,

dependendo das concentrações dos dois reguladores de crescimento utilizados. Assim, a maior porcentagem de plantas normais produzidas (92%), ou seja, em que ocorreu a formação de ramos concomitante à formação de raízes foi observada no tratamento controle desprovido de BA ou NAA. VANDEMOORTELE et al. (1996) verificaram também que, para *Petroselinum crispum*, combinações de BA com altas concentrações de NAA reduziram o brotamento de gemas axilares. Em *C. fissilis* foram observados a formação de dois tipos de calos: um formado na base do caule do explante e outro na base das gemas axilares, de onde surgiram os ramos. Os calos formados na base do caule possuíam aspecto de pouca friabilidade, pouco desenvolvimento e sua formação pareceu estar associado à presença em baixas concentrações de BA. À medida em que a concentração de BA foi acima de 0.25 mg/l, juntamente com doses crescentes de NAA, os calos começaram a surgir na base das gemas axilares. Esses calos possuíam aspecto friável e grande desenvolvimento, chegando muitas vezes a cobrir totalmente as gemas principalmente nos casos em que estas apresentavam pouco desenvolvimento. Em trabalhos realizados com *Nothofagus nervosa*, uma espécie arbórea das florestas temperadas e subantárticas da Argentina e Chile, MARTÍNEZ PASTUR & ARENA (1996) observaram que concentrações mais elevadas de BA favoreceram o crescimento de calos nas gemas, mas o mesmo fato ocorreu relacionado à formação de calos na base do caule e nas folhas desta espécie. Em culturas de *Gmelina arborea*, espécie arbórea da família Verbenaceae de madeira muito valiosa, altas concentrações de BA, isoladas ou em combinação com NAA, também promoveram a formação acentuada de calos, no ponto de excisão do explante e pequeno alongamento dos ramos axilares, sendo que o BA, isoladamente, foi mais eficiente na multiplicação e desenvolvimento de ramos (KANNAN & JASRAI, 1996). Mas para *Hypericum canariensis*, uma planta medicinal das Ilhas Canárias, os melhores resultados quanto à proliferação, alongamento e peso da matéria fresca dos ramos foram obtidos com a utilização combinada de BA e NAA (MEDEROS et al., 1996). Meios que contenham combinações de BA e NAA são conhecidos pela capacidade de indução de calos (REY & MROGINSKI, 1996). Estas constatações corroboram os resultados obtidos com *C. fissilis* nos quais foi também a combinação destes reguladores de crescimento que induziu e promoveu a formação de calos de maior peso e tamanho.

De maneira geral, para vários parâmetros avaliados tais como: número de ramos, número de nós, número de gemas e número de folhas os tratamentos com BA, nas concentrações de 0.25 e 0.5 mg/l na ausência de NAA mostraram-se efetivos, sendo estatisticamente diferentes da maioria dos demais tratamentos. Na presença de BA, além da brotação das duas gemas axilares preexistentes (MORENO & VIANA, 1996), surgiram também ramos oriundos possivelmente de gemas adventícias, que se desenvolveram a partir dos calos formados na base das gemas axilares. Quando, porém, se observa o efeito da presença isolada de BA na produção de calos, no comprimento dos ramos produzidos e na formação de raízes conclui-se que este regulador de crescimento não causou efeitos de promoção significativos. Para *C. fissilis*, a indução e formação de calos torna-se interessante, por viabilizar o desenvolvimento de sistemas de transformação genética e pela possibilidade de se obter plantas formadas a partir dos mesmos, que apresentem variação somaclonal e que possam ser testadas quanto à resistência a insetos (WILLIAMS et al., 1987 apud HADI & BRIDGEN, 1996). Esse fato foi demonstrado entre variantes somaclonais de um cultivar de cana-de-açúcar, susceptível à broca da cana, em que as plantas mostraram variação randômica na quantidade de danos causados pela broca, detectando-se aumentos nos níveis de resistência (WHITE & IRVINE, 1987 apud HADI & BRIDGEN, 1996). Logo, a variação somaclonal pode ser explorada e utilizada como ferramenta para a obtenção de plantas tolerantes ao ataque de insetos.

Para a micropropagação de diversas espécies, entre elas *Nothofagus nervosa* (MARTÍNEZ PASTUR & ARENA, 1996), *Ribes magellanicum* (ARENA & MARTÍNEZ PASTUR, 1995), *Annona muricata* (LE MOS & BLAKE, 1996) e *Cedrela mexicana* (CASTILHO & VIANA, 1997), o BA, em baixas concentrações, proporcionou aumento significativo no número de ramos formados, a exemplo do que ocorreu com *C. fissilis* neste trabalho. MORENO & VIANA (1996), também trabalhando com *C. fissilis*, de procedência diferente do lote utilizado neste trabalho, demonstraram que o meio MS suplementado com BA a 0.5 mg/l produziu os melhores resultados para a frequência de formação de ramos, número de ramos e número de gemas. Testaram também a influência de diferentes reguladores de crescimento na formação múltipla de ramos, em explantes cotiledonares e epicotiledonares, concluindo que os explantes de segmentos nodais cotiledonares, na presença de BA a 0.5 mg/l, formaram em média 3 ramos por explante, enquanto que na

presença de outras citocininas, como a cinetina e 2iP, a média encontrada diminuiu para 2. Para uma espécie arbórea da família Myrtaceae, *Myrtus communis*, PARRA & AMO-MARCO (1996) também verificaram que a utilização de cinetina induziu níveis muito baixos de proliferação de ramos.

#### 5.1.4. Enraizamento “in vitro” de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*

Durante o enraizamento de microestacas de *C. fissilis*, tanto em meios MS e MS/2, suplementados com diferentes concentrações de IBA, não foi verificada a formação de calos. O que é um resultado importante pois indica que nenhuma das condições testadas na fase de enraizamento provocou mudanças na morfogênese dos explantes.

O IBA não agiu de forma inibitória sobre o desenvolvimento e crescimento dos ramos originados das gemas axilares de microestacas de *C. fissilis* submetidos a enraizamento em meios com diferentes concentrações deste regulador.

Os dados indicam ainda que a suplementação exógena de IBA, com o intuito de induzir o enraizamento “in vitro”, não foi condição necessária para as microestacas de *C. fissilis*. Mesmo no meio MS/2 os explantes apresentaram considerável desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, e como será demonstrado no item de aclimação, este porte mínimo foi suficiente para estabelecimento com sucesso, das microplantas nas condições “ex vitro”. Entretanto, quando forem necessárias microplantas com sistemas radiculares mais desenvolvidos e/ou com maior número de folhas e comprimento de ramos, deve-se considerar os efeitos benéficos da interação concentração salina do meio de cultura versus concentrações de IBA.

Por outro lado, a presença de IBA parece ter relação com o aumento da velocidade de enraizamento das microestacas. A presença de IBA a 0.5 mg/l, em meio MS/2 fez com que 100% das microestacas enraizassem num período de 10 dias, ao passo que nos meios desprovidos desse regulador foram necessários de 16-18 dias, quase o dobro do tempo, para que as máximas taxas de enraizamento fossem obtidas. Estes dados sugerem que estas condições otimizadas devem ser adotadas quando o objetivo for produzir o maior número possível de microplantas, em menor espaço de tempo, apesar do aumento do custo de produção.

Os meios de cultura apresentam diferenças em suas composições salinas no que se refere à concentração e à natureza dos sais que cada um contém e por isto podem influir nas taxas finais e na velocidade de enraizamento. CASTILHO & VIANA (1997), testaram diferentes formulações salinas na frequência e velocidade de enraizamento de microestacas de *C. fissilis*, obtendo maior taxa de enraizamento (80%) com a utilização do meio MS e menores taxas (60%) para os meios WPM e WHITE. Quanto à velocidade de indução, os meios MS, SH e WHITE possibilitaram um enraizamento mais rápido, sendo possível visualizar a formação de primórdios radiculares já a partir do 6º dia de cultivo. Nos demais meios, as raízes apenas apareceram após o 8º dia e as taxas de enraizamento estabilizaram-se primeiramente no meio MS, após 12 dias, enquanto que no meio WPM, a estabilização ocorreu somente ao redor do 24º dia. Em *Ribes magellanicum*, segundo ARENA & MARTÍNEZ PASTUR (1995), a porcentagem de enraizamento aumentou com a utilização de meio MS com a metade de sua concentração salina e diversas pesquisas que demonstram o efeito positivo da redução de sais no enraizamento foram citadas por esses autores. Esse efeito foi observado de forma significativa para *C. fissilis* e a utilização de MS com metade da sua concentração salina significa a redução no custo final do processo de micropropagação, tornando-se uma constatação bastante interessante. Em muitas situações o WPM é considerado como sendo superior ao MS para o enraizamento de espécies arbóreas (ORLIKOWSKA, 1992 apud PARRA & AMO-MARCO, 1996). No entanto para *C. fissilis*, os meios MS ou MS/2 mostraram-se adequados, pois mesmo desprovidos de reguladores de crescimento, demonstraram capacidade de induzir, apesar de mais lentamente, o enraizamento de nós cotiledonares. MARUYAMA et al. (1997a) observaram que para *Guazuma crinita*, uma árvore da Amazônia conhecida como Bolaina blanca, a adição de auxinas não é necessária para o enraizamento “in vitro” de ramos desta espécie. Estes autores atribuem este comportamento à presença de níveis endógenos de reguladores de crescimento, nos explantes excisados, suficientes para induzir o enraizamento. Muitos fatores podem influenciar no enraizamento “in vitro” de microestacas. HARBAGE & STIMART (1996), estudaram os efeitos do pH, de reguladores como o IBA e do genótipo no enraizamento de microestacas de macieira. Discutem que o pH adequado do meio de cultura é importante, porque o movimento das auxinas para dentro das células é dependente deste fator. Além disto alertam ainda a possível presença, nos explantes, de compostos que

podem inibir o enraizamento. Por exemplo, em macieira, observou-se que o cálcio exerce um efeito inibidor, uma vez que parece atuar antagonicamente nos processos mediados por auxinas durante o enraizamento inicial das microestacas.

#### 5.1.5. Aclimação

Durante o processo de aclimação de *C. fissilis* observou-se que nas três primeiras semanas, tão fundamental quanto à escolha do substrato, é manter-se a umidade do ar em níveis altos (próximo de 100%) e evitar a alta umidade do substrato. Os resultados indicam que este processo não necessita ser executado com sistemas sofisticados de nebulização, bastando tão somente, utilizar-se um sistema que evite a perda excessiva e reposição a cada dois dias da umidade durante as duas primeiras semanas de aclimação. Porém para que as plantas atinjam tamanho suficiente, em menor tempo, para transplante definitivo em condições de campo, é fundamental então a escolha de um substrato que promova o crescimento rápido e que possibilite altas taxas de sobrevivência das microplantas. As plantas de *C. fissilis* aclimatadas em substrato contendo areia/solo e solo, estavam aos noventa dias, plenamente preparadas para sobreviverem ao transplante nas condições de campo. Apresentavam bom tamanho e uma relação proporcional entre a parte aérea e o sistema radicular. É importante enfatizar que para *C. fissilis*, as raízes formadas “in vitro” permaneceram nas microplantas aclimatadas, somente se modificando em termos morfológicos, emitindo mais raízes secundárias e crescendo vigorosamente, principalmente nos substratos compostos pela mistura de areia/solo e solo. Logo, as raízes formadas “in vitro” permaneceram funcionais durante a aclimação, o que normalmente não ocorre com outras espécies, em que as raízes induzidas “in vitro” são substituídas por outras funcionais durante o processo de aclimação (DEBERGH & MAENE, 1981 apud PEDROTTI et al., 1999).

A aclimação é imprescindível para que as microplantas produzidas “in vitro” tenham capacidade de sobreviver às condições naturais de campo. Quando estão sendo aclimatadas as microplantas sofrem, gradativamente, mudanças na anatomia e fisiologia das folhas e raízes, que possibilitam a sobrevivência nas condições “ex vitro”, que normalmente apresentam baixa umidade relativa e altos níveis de luminosidade (COLÓN-GUASP et al.,

1996). Em *C. fissilis* foi possível verificar, visualmente alterações na morfologia foliar, pelo aparecimento de pilosidade nas folhas novas que surgiram, a partir da segunda semana do início da aclimatação.

Em algumas situações, mesmo quando os procedimentos de aclimatação são executados, a sobrevivência ao transplante pode ser reduzida, devido à inabilidade das plantas em manterem as relações hídricas adequadas ou uma perfeita transição do modo de nutrição mixotrófico para fotoautotrófico (GROUT & AUSTIN, 1978 e WARDLE et al., 1983 apud COLÓN-GUASP et al., 1996). Neste sentido alguns trabalhos de pesquisa tem demonstrado que a inoculação de fungos micorrízicos em estacas enraizadas “in vitro” ou “ex vitro” após a micropropagação, aumentam a sobrevivência durante a aclimatação, bem como o crescimento das plantas após o transplante (NORMAND et al., 1996 e MARTINS et al., 1996).



## **5.2. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E TIPOS DE EXPLANTES NA PRODUÇÃO DE CALOS DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

### **5.2.1. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos a partir de diferentes explantes de plântulas de *C. fissilis* germinadas na presença de luz**

Neste estudo foram testadas as auxinas 2,4-D e NAA, associadas às condições de presença e ausência de luz, na promoção de calos em segmentos de raízes, de epicótilo, e em segmentos basais e medianos de cotilédones, excisados de plântulas de *C. fissilis* germinadas na presença de luz.

Todos os tratamentos inibiram a formação de ramos nos explantes. Isto pode indicar que as auxinas testadas, tanto na presença quanto na ausência de luz, impediram a formação de ramos. A formação de raízes nestes explantes foi variável de acordo com a origem dos explantes e dos tratamentos. Quando utilizaram-se segmentos de raízes, apenas o NAA a 0.5 mg/l na presença de luz e a 0.25 e 0.5 mg/l na ausência de luz pareceu ser efetivo. Para segmentos de epicótilo formaram-se raízes em todos os tratamentos com presença de NAA, tanto na presença quanto na ausência de luz. Já com o 2,4-D somente as concentrações de 0.25 mg/l na presença de luz, e 0.50 mg/l, na ausência de luz foram efetivas para estes explantes. Em segmentos basais de cotilédones tanto o NAA quanto o 2,4-D em todas as concentrações testadas, na presença de luz, apresentaram rizogênese ao passo que na ausência de luz, somente algumas concentrações foram efetivas. Já os segmentos medianos de cotilédones formaram raízes em todas as concentrações de NAA testadas, tanto na presença quanto na ausência de luz, ao passo que o com 2,4-D, formaram-se raízes em todas as concentrações, na ausência de luz, enquanto que na presença de luz somente ocorreu rizogênese nas concentrações de 0.25 e 0.5 mg/l.

De maneira geral segmentos de epicótilo e segmentos medianos de cotilédones, na presença de diferentes concentrações de NAA, na presença de luz, apresentaram as maiores frequências de formação de raízes, enquanto que segmentos de raízes na presença de 2,4-D em diferentes concentrações, tanto na presença quanto na ausência de luz, não apresentaram formação de raízes, porém com NAA, na presença de luz e na ausência de luz ocorreu a formação de raízes, mesmo que em baixas frequências.

Os resultados sobre indução de calos, indicam que em segmentos de raízes e epicótilos a formação dos mesmos se deu em todos os tratamentos com presença das auxinas NAA ou 2,4-D, tanto na presença quanto na ausência de luz. Já em segmentos basais de cotilédones somente não ocorreu a formação de calos nos tratamentos com NAA na presença de luz e em segmentos medianos de cotilédones somente não formaram-se calos nos tratamentos com NAA na ausência de luz e no tratamento com 0.25 mg/l de NAA na presença de luz.

Com relação ao crescimento de calos obtidos nos diferentes explantes, na presença de luz, verificou-se que tanto o NAA quanto o 2,4-D, promoveram o incremento do peso de matéria fresca das culturas, dependendo da origem do explante. Nos tratamentos com 2,4-D, segmentos de epicótilo possibilitaram os maiores valores de peso de matéria fresca produzidos, de acordo com as concentrações de 2,4-D utilizadas. Segmentos de epicótilo também foram os explantes que possibilitaram a obtenção dos maiores valores de peso de matéria fresca das culturas, quando tratados com NAA. Já nos tratamentos em que as culturas foram mantidas na ausência de luz, o 2,4-D na concentração de 1.0 mg/l e o NAA a 0.5 mg/l, possibilitaram os maiores pesos de matéria fresca produzidos em segmentos de epicótilo. Para os demais explantes esta auxinas não se mostraram tão eficientes na promoção do crescimento dos calos formados.

### **5.2.2. Efeito de NAA, 2,4-D, presença e ausência de luz na formação de calos em segmentos de raiz e de hipocótilo de plântulas de *C. fissilis* germinadas na ausência de luz**

Da mesma forma como ocorreu com os explantes obtidos de plântulas de sementes germinadas na presença de luz, nos explantes obtidos de plântulas de sementes germinadas na ausência de luz, também não houve a formação de ramos em nenhum dos tratamentos testados.

Segmentos de hipocótilo possibilitaram a formação de raízes em todos os tratamentos com NAA, tanto na presença quanto na ausência de luz. Em segmentos de raízes ocorreu formação de raízes somente no tratamento com 0.5 mg/l de NAA na

ausência de luz. Já os tratamentos com 2,4-D inibiram totalmente a formação de raízes nestes explantes.

A formação de calos foi eficientemente promovida em segmentos de raízes na presença de luz com NAA e/ou 2,4-D nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg/l, enquanto que na ausência de luz, todas as concentrações de 2,4-D e NAA a 1.0 mg/l possibilitaram a formação de calos. Em segmentos de hipocótilo houve formação de calos em todos os tratamentos, de forma muito eficiente, nas diferentes concentrações de NAA e 2,4-D, tanto na presença quanto ausência de luz.

Com relação ao incremento em peso de matéria fresca dos calos produzidos, constatou-se que segmentos de hipocótilo, submetidos a tratamentos com 2,4-D a 1.0 mg/l e NAA a 0.25 mg/l, na ausência de luz, foram os mais eficientes em termos de promoção do aumento da biomassa de calos produzidos.

Os resultados discutidos acima, guardam muita similaridade com algumas outras afirmações discutidas por alguns autores, principalmente no que se refere a necessidade de utilização de auxinas para indução e formação de calos, logicamente guardando uma relação também com o tipo de explante e também com a condição de cultivo.

Entre estes, KRIKORIAM (1995) comenta que para se induzir a formação e promover o crescimento de calos "in vitro", a partir de diferentes tipos de explantes, geralmente adicionam-se ao meio de cultura uma ou mais auxinas. As auxinas promovem a alongação celular, mas quando em contato com tecidos excisados elas podem promover a divisão celular. A concentração de cada auxina, isolada e/ou em combinação, que promova a formação de calos, raramente coincide entre as diferentes espécies vegetais. Logo, uma concentração auxínica eficiente para uma determinada espécie, não necessariamente o será para outra. Normalmente há a necessidade de adição de uma ou mais auxinas no meio de cultura para propiciar a formação e o crescimento de calos.

Em vários casos, para diversas espécies de plantas, algumas citocininas também são necessárias para indução de calos, sendo as mais utilizadas o BA e 2iP. Porém algumas destas citocininas somente são ativas, na presença das auxinas, como ocorreu em testes com cenoura e fumo. No casos em que não houve a suplementação exógena de auxinas, concluiu-se que o próprio sistema as sintetiza (KRIKORIAM, 1995). GEORGE (1993) também reforça a necessidade de adição de citocininas no meio de cultura simultaneamente ou

posteriormente às auxinas para a indução de calos em várias espécies, e que para algumas espécies, somente concentrações mais altas de auxinas agindo isoladamente, já são suficientes para a indução e crescimento dos mesmos. Com espécies de *Corchorus*, ABBAS et al. (1997), realizaram vários testes com citocininas e auxinas para induzir a formação de calos. Nestas espécies (*C. olitorius* e *C. capsularis*) houve a necessidade de utilização de citocininas para a produção de calos. Neste caso, também verificou-se, que o efeito das citocininas utilizadas variou com o genótipo e com o tipo de explante utilizado. A zeatina estimulou mais a formação de calos em *C. olitorius* do que o BA. Entretanto, a combinação dessas duas citocininas estimulou a formação de calos em *C. capsularis*. Em cotilédones a zeatina também estimulou mais a formação de calos, quando comparado com BA, porém não foi eficiente em segmentos nodais e segmentos de raízes.

Para espécies de *Phyllanthus stipulatus*, *P. caroliniensis* e *P. fraternus* as auxinas NAA, AIA e IBA foram eficientes na indução e formação de calos. As citocininas BA e 2iP foram também eficientes em promover a formação de calos em *P. stipulatus* e para *P. urinaria* somente o 2iP foi eficiente (CATAPAN, 1999).

### **5.2.3. Formação de calos em segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis***

#### **5.2.3.1. Efeitos da posição do explante no meio de cultura**

Reportando-nos aos resultados mostrados no item 4.1.3 e discutidos no item 5.1.3, uma das conclusões a que chegamos foi que o meio de cultura com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA, possibilitou eficientemente a indução e crescimento de calos em segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*. Visando averiguar se a posição do explante, bem como a condição de cultura, interfeririam na indução e formação de calos, inoculou-se estes explantes em meio de cultura MS com BA e NAA nas concentrações citadas acima.

A luz mostrou ter influência nas respostas morfogênicas nestes explantes. Ramos só se formaram nas culturas mantidas na presença de luz tanto nos explantes mantidos na posição vertical quanto horizontal. Porém, a formação de raízes somente ocorreu em explantes mantidos na posição horizontal, tanto na presença quanto na ausência de luz. A formação de calos ocorreu em todos os tratamentos de forma eficiente, ou seja, calos se

formam nestes explantes, tanto na presença quanto na ausência de luz, na posição vertical e horizontal. Porém a posição do explante e a condição de cultura são importantes com relação a produção de biomassa dos calos produzidos. Assim no tratamento em que os explantes foram mantidos na posição vertical na presença de luz, obteve-se um maior peso de matéria fresca dos calos produzidos.

Resultados semelhantes com relação a influência da posição do explante no aumento da biomassa produzida foram obtidos por CATAPAN (1999), que trabalhando com diferentes espécies de *Phyllanthus*, constatou que segmentos nodais de *P. caroliniensis* e *P. stipulatus* mantidos na posição vertical em meios com NAA e 2,4-D, produziram maior quantidade de biomassa de calos, refletido pelos maiores pesos de matéria fresca obtidos nesta situação.

#### 5.2.3.2. Efeito de meios de cultura

Da mesma forma com no item anterior, aqui buscou-se verificar a influência de diferentes formulações salinas suplementadas com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA e 2% de sacarose, na morfogênese, mais especificamente na formação de calos em segmentos nodais cotiledonares inoculados na posição vertical, na presença de luz. A formação de ramos ocorreu nos meios MS, WPM, B5 e Kao, enquanto que a formação de raízes ocorreu nos meios WPM, B5 e Kao. Todas as formulações salinas possibilitaram a indução de calos, porém a maior produção de biomassa ocorreu no meio MS, sendo portanto mais eficiente em promover o incremento de peso de matéria fresca das culturas, enquanto que o meio WHITE produziu calos com a menor biomassa, dentre as formulações salinas testadas.

As diferentes formulações salinas, apresentam muitas diferenças entre si, principalmente relacionadas a quantidade de nitrogênio inorgânico, a relação amônia:nitrato e a sua concentração iônica. Por esta razão podem interferir de forma diferenciada em muitas resposta morfogênicas para diferentes espécies. SELBY & HARVEY (1990) por exemplo, demonstraram que a indução de ramos em gymnospermas foi inibida em meio B5, creditando este fato em função da baixa relação amônia:nitrato e da concentração iônica total deste meio. Para *Solanum tuberosum* a razão ótima de amônia/nitrato

encontrada por LILLO (1989) para a formação de ramos a partir do cultivo de calos foi de 1:2. JAIN & NESSLER (1996) trabalhando com diferentes formulações de meios de cultura no estabelecimento de culturas “in vitro” de *Camptotheca acuminata*, em que seus estudos demonstraram que o meio B5 suplementado com 4 mg/l de BA, foi o mais eficiente para a multiplicação de ramos, atribuindo esta eficiência a relação entre a espécie estudada e a razão amônia:nitrato requerida e encontrada neste meio. Muitas vezes as culturas são sensíveis à concentração iônica total da solução. Este fato foi constatado por PARRO & AMO-MARCO (1996) que testando o efeito de diferentes meios de cultura na micropropagação de *Myrtus comunis*, obtiveram os melhores resultados em meio MS/4 suplementado com 1.0 mg/l de BA. BON et al. (1998), também obtiveram resultados superiores na micropropagação de *Acacia mangium* trabalhando com 3/4 da concentração salina do meio B5 e para *Paraserianthes falcataria* MS/2 no aumento do comprimento de ramos. MORARD & HENRY (1998) trabalhando com *Solanum paludosum*, chegaram a conclusão de que a formulação mais precisa do meio de cultura a ser utilizado “in vitro” deverá ser ajustada de acordo com o requerimento de cada espécie de planta, considerando a composição mineral da planta completa. Assim idealizaram e formularam um meio de cultura para *S. paludosum* diminuindo a concentração iônica total, suplementando o nitrogênio na forma de nitrato e aumentando a quantidade de cálcio em relação a de potássio. Esta adequação possibilitou a duplicação da biomassa produzida e triplicou a produção do metabólito secundário solamargina.

### **5.2.3.3. Efeito da concentração de sacarose**

Para segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*, cultivados em meio MS, suplementados com 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA, mantidos na posição vertical e na presença de luz, aumentos na concentração de sacarose interferiram na obtenção de diferentes respostas morfogênicas.

As taxas de formação de ramos, raízes e calos diminuíram consideravelmente a medida que a concentração de sacarose foi aumentada no meio de cultura de 2% para 4, 6 e 8%. Da mesma forma a biomassa produzida também reduziu-se gradativamente com o aumento crescente da concentração de sacarose. Um efeito marcante, também relacionado

com o aumento na concentração de sacarose, refere-se ao aumento na percentagem de senescência dos explantes.

Estes efeitos negativos, provocados pelo aumento da concentração de sacarose no meio de cultura, estão muito provavelmente relacionados a diminuição da disponibilidade de BA e de macro e micronutrientes aos explantes, em função do aumento do potencial osmótico do meio, dificultando dessa forma a absorção desses elementos e em consequência as respostas morfogênicas dependentes deles.

### **5.3. MORFOGÊNESE “IN VITRO” EM COTILÉDONES DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

#### **5.3.1. Morfogênese “in vitro” em cotilédones isolados de *C. fissilis***

A luz, pareceu ter efeito importante no processo de indução da formação de ramos, uma vez que estes apenas se formaram, apesar da baixa frequência, nos tratamentos mantidos sob condições de luminosidade. CASTILHO & VIANA (1997) também constataram, que nos tratamentos com BA e TDZ, a eficiência de indução de ramos em cotilédones, nas culturas submetidas à presença de luz foi maior, atingindo no tratamento com 0.06 mg/l de TDZ, a maior porcentagem de ramos formados (30%), enquanto que com BA, nas mesmas condições de luminosidade, obteve-se um percentual de 20% de ramos formados.

O surgimento de ramos a partir de cotilédones poderia sugerir que, durante a excisão deste explante da planta, viriam junto com o mesmo as gemas axilares pré-existentes. Pensando nesta possibilidade, paralelamente à implantação dos experimentos com os cotilédones, foi executado um experimento controle, onde os segmentos nodais remanescentes após extração dos cotilédones, foram inoculados em um meio com BA 0.5 mg/l para forçar o brotamento das gemas axilares. Neste controle todos os segmentos nodais desenvolveram dois ramos através do desenvolvimento das gemas axilares que neles permaneceram. Logo o surgimento de ramos em cotilédones foi devido a formação de gemas adventícias.

O BA adicionado ao meio de cultura inibiu a formação de raízes em cotilédones de plântulas de 30 dias. Esta constatação parece-nos óbvia, em função do BA ser uma citocinina, que em muitos casos inibe a formação de raízes nos explantes. Esses dados confirmam os obtidos por CASTILHO & VIANA (1997) que obtiveram resultados semelhantes trabalhando também com cotilédones de plântulas de *C. fissilis* de diferente procedência, em meios com BA (citocinina) e TDZ.

Somente ocorreu formação de calos nos tratamentos na presença de luz e com suplementação exógena de BA, obtendo-se maiores taxas nas concentrações de 0.25 mg/l em cotilédones de plântulas com 20 dias germinadas na ausência de luz e de 0.25 e 0.12 mg/l em cotilédones de plântulas com 30 dias germinadas na presença de luz. CASTILHO & VIANA (1997) obtiveram, no tratamento com BA 0.25 mg/l, na presença de luz, uma taxa máxima de indução de calos de 50% e também constataram que os calos foram mais freqüentes nos tratamentos mantidos na presença de luz. A formação dos calos ocorreu na região basal do pecíolo do cotilédone. Neste mesmo ponto ocorreram a indução de outras respostas morfogênicas, como a formação de raízes e/ou brotos. Segundo DE KLERK et al. (1997), durante a regeneração, somente uma proporção de células participam deste processo. Em *C. fissilis*, provavelmente as células mais competentes em responderem aos estímulos organogênicos estão localizadas nesta região do cotilédone.

DE KLERK et al. (1997) explicam que a regeneração consiste de três etapas: a) diferenciação, durante a qual o tecido torna-se competente a responder ao estímulo organogênico/embriogênico; b) indução, quando as células tornam-se determinadas a formar raízes, ramos ou embriões, e c) crescimento do órgão ou embrião. Na primeira fase pode ocorrer um período de divisão celular, formação de calos, caracterizando a regeneração de forma indireta, mas freqüentemente as células tornam-se competentes sem divisão celular em larga escala, caracterizando a regeneração direta.

Nos experimentos aqui relatados, bem como nos trabalhos de CASTILHO & VIANA (1997), observou-se regeneração direta de ramos e raízes. Muitos autores, entre eles SUMANA & KAVERIAPPA (1996), ressaltam a importância deste tipo de resposta, quando comparada à regeneração indireta, em função da possibilidade de ocorrência de instabilidade genética nos calos formados, gerando variabilidade genética nas plantas regeneradas a partir dos mesmos.



Sistemas de regeneração de plantas, a partir de tecidos ou calos, permitem a possibilidade de manipulação genética. A introdução de genes de interesse em células de cotilédones ou calos, seguida pela seleção das células transformadas e regeneração de plantas a partir delas, pode permitir a introdução de novos genes numa espécie (STIMART & MATHER, 1996). Com relação ao cedro rosa, a possibilidade da regeneração, a partir de cotilédones, oferece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de sistemas de transformação genética, com o objetivo de inserir genes que confirmam resistência às pragas desta planta, a exemplo do que buscaram GABA et al. (1999), estudando a regeneração a partir de cotilédones de melão (*Cucumis melo* L. cv. Galia), com propósitos de regenerar plantas transformadas.

### 5.3.2. Morfogênese “in vitro” em segmentos medianos de cotilédones de *C. fissilis*

Nenhum dos tratamentos com diferentes concentrações de BA e NAA, isolados e/ou em combinação possibilitaram a formação de ramos em segmentos medianos de cotilédones de *C. fissilis*. Porém a formação de raízes nestes explantes esteve sempre associada à presença de NAA, em diferentes concentrações, associado ou não com BA, que na concentração de 3.0 mg/l isoladamente ou em combinação com NAA inibiu a formação de raízes. A formação de calos somente ocorreu quando houve a combinação de diferentes concentrações de BA e NAA, e quando usados isoladamente não induziram esta resposta morfogénica.

O maior peso de matéria fresca obtido se deu no tratamento com a combinação de 3.0 mg/l de BA e 0.25 mg/l de NAA. Cabe ressaltar aqui, que neste tratamento, o peso de matéria fresca obtido, se deve exclusivamente ao calo formado, haja visto que nesse tratamento não ocorreu formação de raízes e que os calos possuíam aspecto friável.

Nos tratamentos em que não houve a formação de calos, tais como, os tratamentos com NAA somente, em concentrações acima de 0.5 mg/l ocorreu a formação de raízes via organogênese direta. Esse fato também é comentado por CASTILHO & VIANA (1997) e por MORENO & VIANA (1996) onde mencionam que a rizogênese direta em cotilédones de plantas ocorre na região distal do cotilédone, a partir de células da margem dos mesmos, quando cultivados em meios com NAA em concentrações superiores a 2.0 mg/l, atingindo

valor máximo de 80% de rizogênese no tratamento com 4.0 mg/l de NAA.

Esta habilidade dos tecidos de cotilédones de plantas e de segmentos medianos de cotilédones de apresentarem rizogênese direta, quando submetidos a meios de cultura com NAA ou outras auxinas (IAA e IBA) citadas por MORENO & VIANA (1996), sugere que algumas células dos cotilédones, principalmente as das margens, apresentam potencial de organogênese e podem ser também manipuladas em meios com citocininas, para produzirem ramos adventícios. Este sistema é importante para o desenvolvimento de sistemas de transformação genética, como citado anteriormente, bem como poderia ser utilizado para se iniciar culturas de raízes para a produção de substâncias com atividade biológica. Da mesma forma, a produção de calos via manipulação destes explantes, combinando nos meios de cultura, BA e NAA, pode também possibilitar o estabelecimento de sistemas de suspensões celulares para a produção de compostos bioativos, além de constituir-se numa alternativa para a regeneração de plantas transgênicas.

## 5.4. CONSERVAÇÃO “IN VITRO” DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

### 5.4.1. Conservação “in vitro” de ápices e segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*

A conservação de germoplasma de plantas “in vitro”, é possível em função do uso das técnicas de micropropagação e criopreservação. Para que a técnica de micropropagação seja viável, a mesma deve ser adaptada, de forma que as sucessivas repicagens das culturas em curto espaço de tempo, que normalmente são necessárias, sejam evitadas. Pois este processo pode inviabilizar a manutenção de germoplasma “in vitro” por longo período, por questões operacionais e de custos. Assim a conservação de germoplasma “in vitro” deve basear-se em condições que limitem o crescimento das culturas, o que normalmente se dá pela manipulação das condições ambientais, como redução da temperatura e dos níveis de oxigênio de cultivo, ou por alterações na composição normal dos meios de cultura, pela adição de retardantes de crescimento, aumento na concentração de sacarose e redução na quantidade de nutrientes minerais ( DODDS & ROBERTS, 1995; GROUT, 1995 a, b apud MARUYAMA et al., 1997a; OKA & NIINO, 1997). Mais recentemente, tem-se utilizado para conservação de germoplasma de plantas “in vitro”, o encapsulamento de diferentes explantes em alginato, técnica que além de possibilitar uma nova alternativa de manutenção de germoplasma “in vitro”, é também utilizada para produção de sementes artificiais (SORVARI et al., 1997; MARUYAMA et al., 1997a, b; STANDARDI & PICCIONI, 1998; REPUNTE, TAYA & TONE, 1995; JANEIRO, BALLESTER & VIEITEZ, 1997; KHOR, NG & LOH, 1998; SUPRASANNA, GANAPATHI & RAO, 1996). Esta tecnologia, associada à algumas outras possíveis variáveis, se constitui numa boa alternativa para a conservação de germoplasma de muitas espécies intolerantes a sistemas de armazenamento convencionais em temperaturas reduzidas, bem como, também não requer técnicas sofisticadas empregadas em protocolos que utilizam temperaturas ultra baixas de armazenamento, como a criopreservação em nitrogênio líquido.

Os resultados dos experimentos conduzidos para estabelecer a dinâmica do rebrotamento de explantes viáveis no meio de recuperação padrão indicaram que as cápsulas não impediam o rebrotamento dos explantes, uma vez que os mesmos após serem inoculados em meio de recuperação, demonstraram uma rápida capacidade de

rebrotamento, iniciada a partir do quinto dia após a inoculação e alcançando a taxa máxima no décimo terceiro dia. Isto indica que os explantes são capazes de romper as cápsulas, em função das mesmas não impedirem e/ou prejudicarem a difusão dos nutrientes e de BA do meio de recuperação, entrando em contato com os explantes e induzindo as gemas neles contidos, permitindo o seu crescimento normal, como ocorre quando não são encapsulados. Após rebrotados em meio de recuperação com BA 0.5 mg/l, os explantes foram colocados em meios com IBA para enraizamento. A frequência de enraizamento após 45 dias de cultura, foi relativamente baixa para todos os explantes, independente da concentração de IBA no meio de cultura. Esta baixa porcentagem de enraizamento, deve-se muito provavelmente, à inibição promovida por concentrações endógenas de BA, que se acumularam nos explantes durante o rebrotamento no meio de recuperação. Esta constatação é reforçada quando compara-se os índices de enraizamento obtidos, por estes explantes sem terem passado por meios com BA (item 5.1.4), onde mesmo em meios sem a presença de IBA, ocorreram altos índices de enraizamento de segmentos nodais cotiledonares. Conclui-se desta forma que o baixo índice de enraizamento, não deveu-se a presença da cápsula.

Após 3 meses de armazenamento em meios limitantes ao crescimento, ápices e segmentos nodais cotiledonares mantiveram bastante alta a capacidade de rebrotamento quando submetidos aos meios de recuperação. Tanto para segmentos nodais cotiledonares, quanto para ápices encapsulados, o meio com água destilada e ágar nas concentrações de 0.4% e 0.7%, permitiram uma maior capacidade de manutenção da viabilidade dos explantes. Após 6 meses de armazenamento, a capacidade de rebrotamento reduziu-se para menos da metade da obtida após 3 meses. Neste caso ápices encapsulados e armazenados em meio com 0.4% de ágar, mantiveram capacidade de sobrevivência significativamente superior aos demais tratamentos, atingindo 43.7% de sobrevivência. Ao final de nove meses de armazenamento, os ápices e segmentos nodais encapsulados tiveram sua capacidade de sobrevivência extremamente reduzida. Os explantes, em todos os tratamentos, ao final de 9 meses de armazenamento tiveram sua capacidade de rebrotamento reduzida para menos de 10%. Da mesma forma como ocorreu aos 3 e 6 meses de armazenamento, aos 9 meses, parece que o meio com concentração de 0.4% de ágar, possibilitou maior capacidade de manutenção da viabilidade dos explantes. Esta redução

acentuada da capacidade de recuperar o crescimento dos explantes a medida que aumentasse o período de armazenamento, talvez deva-se a degradação progressiva da sacarose contida nas cápsulas, haja visto que a mesma é a única fonte de carbono e energia dos explantes, uma vez que o alginato é metabolicamente inerte para a célula vegetal (SORVARI et al., 1997). Assim como a quantidade de sacarose na cápsula é muito reduzida, a medida que o tempo passa, a sua quantidade passa a ser limitante para a manutenção do metabolismo das células, mesmo que seja em níveis muito reduzidos. MARUYAMA et al. (1997a) obtiveram para *Cedrela odorata*, nas mesmas condições, porém com concentração de ágar no meio de 1.0%, resultados muito semelhantes aos descritos acima. Neste trabalho os valores de rebrotamento dos explantes foram de 80, 50 e 20% aos 3, 6 e 12 meses de armazenamento respectivamente. Com esta mesma espécie quando associaram a utilização deste mesmo meio, porém armazenados a uma temperatura de 12°C a capacidade de rebrotamento foi de 80, 70 e 80% aos 3,6 e 12 meses de armazenamento respectivamente. Pode-se concluir que a temperatura é outro fator importante na manutenção da viabilidade dos explantes ao longo do tempo.

Pelos resultados obtidos e pelas considerações feitas acima, podemos concluir que o encapsulamento de ápices e segmentos nodais de *C. fissilis*, em alginato de cálcio e seu armazenamento em meios limitantes ao crescimento, podem ser utilizados como uma forma viável de conservação de germoplasma ‘in vitro’ para esta espécie. Muito embora, estudos devam ser realizados para aprimoramento desta técnica, principalmente no que concerne às condições ambientais de armazenamento, determinando-se condições ótimas de temperatura e intensidade luminosa, além de novos testes com a concentração de alginato das cápsulas, concentração de nutrientes essenciais no substrato, dentre outras condições para manter viáveis os explantes em condições limitantes ao seu crescimento e assim melhorar a eficiência do sistema.

#### **5.4.2. Criopreservação de sementes de *C. fissilis***

Segundo MARZALINA & KRISHNAPILLAY (1999), sementes ortodoxas ou semi-recalcitrantes de espécies tropicais podem ser criopreservadas sem maiores problemas, desde que tenham conteúdo de água abaixo de 20%. Para *C. fissilis* ainda não se tem

registros de trabalhos com relação a possibilidade de se criopreservar diretamente em nitrogênio líquido sementes zigóticas, fato que já foi descrito para diversas espécies de outras famílias (HOR, 1996; MARZALINA et al., 1997; NORMAH & MARZALINA, 1996).

Sementes de *C. fissilis*, possuem cerca de 6-7% de umidade. Este fator as torna passíveis de criopreservação direta em nitrogênio líquido, sem necessidade de serem realizados com as mesmas, tratamentos de desidratação ou ação de agentes crioprotetores. Outras meliáceas como *Swietenia macrophylla* e *Melia azaderach* que possuem 5-6% e 12.4% de umidade na sementes respectivamente, já foram criopreservadas com sucesso, obtendo-se viabilidade após a criopreservação de 63 e 43% respectivamente, com o adendo de que as sementes de *Melia* não foram criopreservadas em nitrogênio (-196°C) e sim em -20°C (MARZALINA & KRISHNAPILLAY, 1999). O sucesso na criopreservação destas meliáceas, repetiu-se com sementes de *C. fissilis*, onde após criopreservadas, foram descongeladas rapidamente a 45°C em banho-maria e colocadas para germinar em placas de Petri com papel filtro umedecido. Após 10 dias, das sementes que haviam sido criopreservadas, obteve-se um percentual de 91.6% de sementes viáveis, enquanto que das sementes não criopreservadas obteve-se 90%, não havendo diferenças estatísticas significativas entre elas. A realização do teste de tetrazólio confirmou esta constatação, mostrando-se ser uma forma bastante confiável de se acessar de forma bastante rápida a viabilidade de sementes de *C. fissilis* criopreservadas. Estes dois aspectos indicam que o processo de criopreservação de sementes de *C. fissilis* em nitrogênio líquido não afeta a sua viabilidade nem o vigor. Uma constatação importante além destas, foi também verificar-se que não ocorreram alterações no crescimento normal das plântulas após a germinação. Plântulas originadas a partir de sementes que foram criopreservadas tiveram crescimento equivalente, em vários parâmetros avaliados, como comprimento dos ramos, número de nós, número de gemas e número de folhas, aos alcançados por plântulas obtidas das sementes que não foram criopreservadas. Além desta constatação quantitativa, não foi verificado visualmente, até 30 dias após o transplante, qualquer alteração morfológica no desenvolvimento destas plantas.

Logo, é totalmente viável utilizar-se para conservação de germoplasma e da variabilidade ainda remanescente, para estudos futuros, a criopreservação em nitrogênio

líquido de sementes de *C. fissilis*, por ser neste caso específico, uma tecnologia bastante simples e que mostrou-se bastante eficiente.

## 6- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos de micropropagação, produção de calos, morfogênese em cotilédones e de conservação de germoplasma “in vitro”, realizados com *Cedrela fissilis* permitem as seguintes conclusões.

1. As sementes de *C. fissilis*, após desinfecção, iniciaram a germinação “in vitro” a partir do 4º dia de cultivo, atingindo porcentagens máximas por volta do 12º dia. Estes dados são importantes pois servem como referência para os estudos de criopreservação de sementes desta espécie.

2. Plantas axênicas de *C. fissilis* cultivadas em meio MS, após 30 dias de cultivo, apresentavam crescimento suficiente para serem utilizadas como fontes de diferentes explantes para experimentos de micropropagação, indução de calos e de conservação “in vitro”.

3. Diferentes respostas morfogênicas foram obtidas a partir de segmentos nodais cotiledonares em meio MS, suplementado com BA e NAA, isoladamente ou em combinação. O BA em diferentes concentrações possibilitou a formação de ramos em 100% dos explantes. Concentrações de NAA acima de 0.25 mg/l isoladamente ou em combinação com BA inibiram a formação de ramos. A formação de raízes ocorreu em maior frequência nos meios sem a presença destes reguladores de crescimento. Nos meios com BA não ocorreu a formação de raízes, mas quando combinado com NAA ocorreu enraizamento. Logo BA inibiu a formação de raízes, enquanto o NAA pareceu reverter este processo. A formação de calos foi dependente da ação combinada de BA e NAA e de NAA isoladamente.

4. Para efeitos de micropropagação, para vários parâmetros avaliados tais como número de ramos, número de nós, número de gemas e número de folhas os tratamentos com BA, nas concentrações de 0.25 e 0.5 mg/l na ausência de NAA, foram as mais efetivas para



segmentos nodais cotiledonares, não ocorrendo o mesmo com relação à produção de calos, incremento no comprimento de ramos e formação de raízes. O comprimento de ramos foi inibido pela concentração de 1.0 mg/l de NAA isolado ou em combinação com IBA.

5. O enraizamento de microestacas de *C. fissilis* ocorreu de forma eficiente, tanto em meio MS quanto em MS/2, sem a necessidade de suplementação exógena de IBA. Por outro lado, a presença de IBA aumentou a velocidade de enraizamento das microestacas. IBA a 0.5 mg/l, em meio MS/2 propiciou que 100% das microestacas enraizassem num período de 10 dias, enquanto que nos meios desprovidos desse regulador, o enraizamento máximo ocorreu após 16-18 dias.

6. O método desenvolvido para a aclimação de *C. fissilis* possibilitou a sobrevivência de 100% das microplantas durante 90 dias. Constatou-se que nas 3 semanas iniciais de aclimação, tão fundamental quanto a escolha do substrato, é manter-se a umidade do ar em níveis altos (100%), evitando excesso de umidade no substrato. As plantas de *C. fissilis* aclimatadas em substrato contendo areia/solo e solo, estavam aos 90 dias, plenamente aptas a sobreviverem ao transplante nas condições de campo. As raízes formadas “in vitro” permaneceram funcionais e não foram substituídas durante a aclimação.

7. A formação de calos em explantes obtidos de plântulas germinadas na presença de luz, demonstraram que segmentos de epicótilo submetidos às auxinas NAA e 2,4-D, foram mais eficientes em promover a formação e produção de biomassa, tanto na presença quanto na ausência de luz. Para os demais explantes estas auxinas não se mostraram tão eficientes. Já para explantes obtidos de plântulas germinadas no escuro, segmentos de hipocótilo se mostraram mais aptos para a formação e incremento de biomassa dos calos produzidos. Ocorreu a formação de calos em todos os tratamentos de forma muito eficiente, nas diferentes concentrações de NAA e 2,4-D, tanto na presença quanto na ausência de luz e a maior produção de biomassa foi verificada nos tratamentos com 2,4-D a 1.0 mg/l e NAA a 0.25 mg/l, na ausência de luz.

8. Em segmentos nodais cotiledonares a formação de calos e a maior produção de biomassa, ocorreu eficientemente, quando estes explantes foram cultivados na posição vertical, em meio MS suplementado com 2% de sacarose, 0.5 mg/l de BA e 1.0 mg/l de NAA e com as culturas mantidas na presença de luz. O meio WHITE produziu calos com a menor biomassa, dentre as formulações salinas testadas para estes explantes. Concentrações de sacarose acima de 2% provocaram diminuição crescente nas taxas de formação de ramos, raízes e calos, diminuindo também a biomassa dos calos produzidos.

9. Os tecidos cotiledonares mostraram-se capazes de regenerar diretamente ramos e raízes quando cultivados em meio MS. No processo de indução de ramos a presença de luz foi uma condição necessária. O BA adicionado ao meio de cultura inibiu a formação de raízes em cotilédones de plântulas com 30 dias. A formação de calos nestes explantes, somente ocorreu com suplementação exógena de BA, nas culturas mantidas na luz. As diferentes respostas morfogênicas, como formação de calos, ramos e raízes, ocorreram na região basal do pecíolo.

10. Segmentos medianos de cotilédones não formaram ramos, quando tratados com BA e NAA, isolados e/ou em combinação. Mas a formação de raízes ocorreu nestes explantes, sempre associada à presença de NAA, em diferentes concentrações, combinados ou não com BA, sendo que na concentração de 0.5 mg/l de NAA ocorreu rizogênese direta. O BA na concentração de 3.0 mg/l agindo isoladamente ou em combinação com NAA inibiu a formação de raízes. A formação de calos nestes explantes ocorreu quando houve a combinação de diferentes concentrações de BA e NAA. Estes reguladores agindo isoladamente nestes explantes não induziram tal resposta morfogênica. A maior biomassa de calos produzida ocorreu com 3.0 mg/l de BA e 0.25 mg/l de NAA e os calos formados possuíam aspecto friável.

11. A habilidade dos cotilédones inteiros e de segmentos medianos de cotilédones de *C. fissilis* de apresentarem rizogênese direta, quando submetidos a meios de cultura com NAA ou outras auxinas, sugere a possibilidade de manipulação destes explantes em meios com citocininas, para produção de ramos adventícios. Este aspecto é importante para o

desenvolvimento de sistemas de transformação genética, bem como para a iniciação de culturas de raízes e também para a produção de calos, combinando, nos meios de cultura, BA e NAA, estabelecendo-se sistemas de suspensões celulares. Desta forma, possibilitando em ambos os casos a produção de substâncias com atividade biológica, além de constituir-se em alternativas para a regeneração de plantas transgênicas.

12. O encapsulamento de ápices e segmentos nodais de *C. fissilis*, em alginato de cálcio e seu armazenamento em meios limitantes ao crescimento, compostos por água e ágar, mostrou-se ser uma alternativa viável de conservação de germoplasma “in vitro” por um período de até 3 meses. Há, porém, a necessidade de otimização desta metodologia, principalmente no que concerne à possibilidade de manipulação das condições ambientais de armazenamento, determinando-se condições ótimas de temperatura e intensidade luminosa, além de novos testes com a concentração de alginato das cápsulas, concentração de nutrientes no substrato de armazenamento, bem como outras condições para manter viáveis os explantes por períodos mais longos de armazenamento.

13. Sementes de *C. fissilis* podem ser criopreservadas diretamente em nitrogênio líquido, dispensando tratamentos de desidratação ou ação de agentes crioprotetores, desde que as mesmas apresentem teor de umidade em torno de 6.5%. A criopreservação não afetou o vigor e a viabilidade das sementes, determinados por teste de germinação e pelo teste de tetrazólio, bem como não afetou o crescimento normal das plântulas, em substrato areia/solo, durante 30 dias, após o transplante.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.M.; JONES, J.K.; CALIGARI, P.D.S. – Clonal propagation by “in vitro” culture of *Corchorus* (Jute). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 47: 231-238, 1997.
- AGOSTINHO, S.M.M.; SILVA, M.F.G.F. da; 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**, 22(suppl. 3): 323-328, 1994.
- ARENA, M.E. & MARTINEZ PASTUR, G.J. – “In vitro” propagation of *Ribes magellanicum* Poiret. **Scientia Horticultural**, 62 : 139-144, 1995.
- ASHMORE, S.E. – **Status report on the development and application of “in vitro” techniques for the conservation and use of plant genetic resources**. Rome, Italy, Internacional Plant Genetic Resource Institute, 1997. 57 p.
- BENENCIA, F.; COURRÉGES, M.C.; NORES, M.M.; COULOMBIÉ, F.C. - Immunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 49: 133-139, 1995.
- BERJAK, P.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; DUMET, D.; WATT, M.P. – Strategies for “in vitro” conservation of hydrated germplasm. In: NORMAH, M.N.; NARIMAH, M.K.; CLYDE, M.M. (eds.). – **“In vitro” conservation of plant genetic resources**. Kuala Lumpur, Percetakan Watan Sdn. Bhd, 1996. p. 19 – 52.
- BOHNENSTENGEL, F.I.; WRAY, V.; WITTE, L.; SRIVASTAVA, R.P.; PROKSCH, P. - Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, 50 : 977 – 982, 1999.
- BOM, M.C.; BONAL, D.; GOH, D.K.; MONTEUIS, O. – Influence of different macronutrient solutions and growth regulator on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 53 : 171-177, 1998.
- BRAVERMAN, Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; YERUHAM, I.; KOLSKY, O.; SARAN, A. – Control experiments with Yellow Jacket Wasps (Hymenoptera: Vespidae) Injuring cattle in Israel. **Journal of Economic Entomology**, 91 (suppl. 2): 486 – 491, 1998.
- CARVALHO, P.E.R. - **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, EMBRAPA-CNPQ/SPI, 1994. p. 147-152.

CASTILHO, V.C. & VIANA, A.M. – Cultivo “in vitro” de *Cedrela fissilis* Vell. e *Cedrela mexicana* M.J. Roem (Meliaceae). Florianópolis, SC, 1997. (TCC – Graduação Biologia – Universidade Federal de Santa Catarina)

CATAPAN, E. – Cultivo “in vitro” e análises fitoquímicas de espécies de *Phyllanthus*. Florianópolis, SC, 1999. (Tese – Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina)

CERDAS, L.V.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. – “In vitro” organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 46 (suppl. 2): 225 – 228, 1998.

CIMA. - Relatório da comissão interministerial sobre desenvolvimento e meio ambiente. Brasília, DF, Brazil. 1991.

CÓLON-GAUSP, W.; NELL, T.A.; KANE, M.E.; BARRETT, J.E. – Effect of abscisic acid on “ex vitro” acclimatization of *Aronia arbutifolia* (L.) Pers. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 121 (suppl. 1): 101-104, 1996.

DE KLERK, G.J.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; LIEBEREI, R.; NEUMANN, K.H. – Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum*, 39 (suppl. 1): 53-66, 1997.

DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. - **Experiments in plant tissue culture**. 3<sup>a</sup> ed. New York, Cambridge University Press, 1995. p. 126-135.

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 nº3, 1992. p.102-108.

FAY, M.F. - In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation ?. *Biodiversity and Conservation*, 3: 176-183, 1994.

Fundação SOS Mata Atlântica. - **Dossiê SOS Mata Atlântica**. São Paulo, Estudos do Projeto e Edições Ltda. 1992.

GABA, V.; SCHLARMAN, E.; ELMAN, C.; SAGEE, O.; WATAD, A.A.; GRAY D.J. – “In vitro” studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 35: 1-7, 1999.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. - Nutrients requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158, 1968.

GATEHOUSE, J.A.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R. - Genetic engineering of plants for insect resistance. In: GRIERSON, D. - **Plant genetic engineering**. New York, Chapman & Hall, Plant Biotechnology Series, 1991. p. 105-135.

- GEORGE, E.F. – **Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology.** 2<sup>a</sup> ed., Edington Exegetics, 1993. 574 p.
- GOMEZ, K.A. & GOMEZ, A. - **Statistical Procedures for Agricultural Research.** 2<sup>nd</sup> ed. , Singapore, John Wiley & Sons, 1984. 660 p.
- HADI, M.Z. & BRIDGEN, M.P. – Somaclonal variation as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia founieri* “Compacta Blue”. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 46 (suppl. 1): 43-50, 1996.
- HAINES, R. - **Biotechnology in forest tree improvement with special reference to developing countries.** Rome, FAO/IBPGR, 1994. 230 p. (Forest Paper n°118).
- HARBAGE, J.H. & STIMART, D.P. – Effect of pH and 1H-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 121 (suppl. 6): 1049-1053, 1996.
- HARDING, K.; BENSON, E.E.; CLACHER, K. – Plant conservation biotechnology: na overview. **Agro-Food Industry Hi-Tech**, MAY-JUNE : 24 –29, 1997.
- HARTNEY, V.J. & SVENSSON, J.G.P. - The role of micropropagation for australian tree species. In: BAKER, F.W.G. (org.) - **Rapid propagation of fast-growing tree species.** .Melksham, Redwood Press, 1992. p. 7-28. (CASAFA Report series n° 3).
- HOR, Y.L. – Storage of tropical tree seeds with special reference to cryopreservation. In: YAPA, A.C. (ed.).- **Proceedings of the international symposium: On recent advances in tropical tree seed technology and planting stock production.** Thailand, AFTS, 1996. p. 63-69.
- HULSE, J.H. - Plant cell and tissue culture: progress and prospects. In: BAKER, F.W. (org.) - **Rapid propagation of fast-growing tree species.** Melksham, Redwood Press, 1992. p. 1-6. (CASAFA Report series n° 3).
- INADA, A.; OHTSUKI, S.; SORANO, T.; MURATA, H.; INATOMI, Y.; DARNAEDI, D.; NAKANISHI, T. – Cycloartane triterpenoids from *Aglaiia harmsiana*. **Phytochemistry**, 46 (suppl. 2): 379 – 381, 1997.
- JAIN, A.K. & NESSLER, C.L. – Clonal propagation of *Camptotheca acuminata* through shoot bud culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44 : 229-233, 1996.
- JANEIRO, L.V.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. – “In vitro” response of encapsulated somatic embryos of camellia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51: 119-125, 1997.
- KANNAN, V.R. & JASRAI, Y.T. – Micropropagation of *Gmelina arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 46 : 269-271, 1996.

- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. – A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. **Planta**, **115**: 355-367, 1974.
- KINOSHITA, I. & SAITO, A. – Propagation of Japanese white birch by encapsulated axillary buds, regeneration of plantlets under aseptic conditions. **J. Jpn For Soc.**, **72** : 166 – 170, 1990.
- KLEIN, R.M. - **Flora Ilustrada Catarinense - Meliáceas**. Itajaí ,SC, 1984. 140p.
- KHOR, E.; NG, W.F.; LOH, C.S. – Two-coats systems for encapsulation of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds and protocorms. **Biotechnology and Bioengineering**, **59** (suppl. 5): 635-639, 1998.
- KRIKORIAN, A.D. – Hormones in tissue culture and micropropagation. In: **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Ed. Kluwer Academic Publishers, 4<sup>a</sup> ed. 1995. p. 774-779.
- 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. 593-611.
- LEMOS, E.E.P.; & BLAKE, J. – Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L.. **Journal of Horticultural Science**, **73** (suppl. 3): 395-403, 1996.
- LILLO, C. Effects of media components and enviromental factors on shoot formation from protoplasts derived calli of *Solanum tuberosum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **19**: 103-111, 1989.
- LISBOA, P.L.B.; TEREZO, E.F.M.; SILVA, J.C.A. - **Madeirasas Amazônicas: Considerações sobre exploração, extinção de espécies e conservação**. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Sér. Bot.**, **7** (suppl.2): 521-542, 1991.
- LISBOA, P.L.B. - Notes on south american cedar (*Cedrela fissilis*) in the sacred art of Brazil. **IAWA Journal**, **15** (suppl.1): 47-50, 1994.
- LLOYD, G. & McCOWNS, B. - Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Int. Plant Prop. Soc. Proc.**, **30**: 421- 427, 1981.
- LORENZI, H. - **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa – SP, Ed. Plantarum, 1992. 352 p.
- MARTÍNEZ PASTUR, G.J.; ARENA, M.E. – “In vitro” propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. Et Mil. **Revista Internacional de Botânica Experimental**, **58** (suppl. 1-2): 1-7, 1996.

- MARTINS, A.; BARROSO, J.; PAIS, M.S. – Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. **Micorrhiza**, **6** : 265-270, 1996.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K. – Somatic embryogenesis in Big-leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (eds.) – **Somatic Embryogenesis in Wood Plants**. Great Britain, Kluwer Academic Publisher. 1999. v. 5 p. 45-62.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. – Micropropagation of Cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. **J. Jpn. For. Soc.** **71** (suppl. 8): 329 – 331, 1989.
- 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 Report**, **16**: 393-396, 1997a.
- MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; SHIGENAGA, H.; OHBA, K.; SAITO, A. Alginate-encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. **Silva Genetica**, **46** (suppl. 1): 17-23, 1997b.
- MARZALINA, M. & KRISHNAPILLAY, B. – Recalcitrant seed biotechnology application to rain forest conservation. In: BENSON, E.E. (Ed.). – **Plant Conservation Biotechnology**. London, Taylor and Francis Ltd, 1999. p. 265 - 276.
- MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B.; NASHATUL ZAIMAH, N.A. – “In vitro” conservation of tropical rainforest germplasm via cryopreservation. In: **Proceedings of the 4<sup>th</sup> Conference on Forest Products Research**. FRIM, 1997.
- MEDEROS, S.; LOPEZ-BAZZOCCHI, I.; RAVELO, A.; GONZALES, A. – Hypericin from clonal propagation of *Hypericum canariensis* L.. **Plant Tissue Culture**. **6** (suppl. 1): 7-13, 1996.
- MERTENS, M.; WERBROUCK, S.; SILVA, H.B.S.M.; DEBERG, P. – “In vitro” regeneration of evergreen azalea from leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **45** (suppl.3): 231-236, Jun. 1996.
- MORARD, P. & HENRY, M. – Optimization of the mineral composition of “in vitro” culture media. **J. Plant Nut.**, **21**: 1565-1576, 1998.
- MORENO, F.N. & VIANA, A.M. - **Propagação “in vitro” de *Cedrela fissilis***. Florianópolis, SC, 1996. (TCC – Graduação Biologia – Universidade Federal de Santa Catarina)



- MORI, S.A., BOOM, B.M. & PRANCE, G.T. - Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. **Brittonia**, **33**: 233-245, 1981.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, **15**: 473-497, 1962.
- MYERS, N. - Tropical moist forests: over-exploited and under-utilised. **Forest Ecology and Management**, **6**: 59-79, 1983.
- MYERS, N. - Tropical forest: much more than stocks of wood. **Journal of Tropical Ecology**, **4**: 209-221, 1988.
- NEWTON, A.C.; CORNELIUS, J.P.; MESÉM, J.F.; LEAKEY, R.R.B. - Genetic variation in apical dominance of *Cedrela odorata* seedlings in response to decapitation. **Silvae Genetica**, **44**(suppl.2-3): 146-150, 1995.
- NORMAH, M.N. & MARAZALINA, M. - Achievements and prospects of "in vitro" conservation for tree germplasm. In: NORMAH, M.N. (ed.). - "In vitro" Conservation of Plant Genetic Resource. UKM, 1996. p. 253-261.
- NORMAND, L.; BARTSCHL, H.; DEBAUD, J.; GAY, G. - Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. **Physiologia Plantarum**, **98** : 759-766, 1996.
- OKA, S. & NIINO, T. - Long term storage of Pear (*Pyrus* spp.) shoot cultures "in vitro" by minimal growth method. **JARQ**, **31** (suppl. 1): 1-7, 1997.
- PARRA, R. & AMO-MARCO, J.B. - Efect of plant growth regulators and basal media on "in vitro" shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L.. **Biologia Plantarum**, **38** (suppl. 2): 161-68, 1996.
- PAULA, J.R.; VIEIRA, I.J.C.; SILVA, M.F.G.F.; FO, E.R.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PINHEIRO, A.L.; VILELA, E.F. - Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and falvonoids of *Cedrela odorata* graft and speculations on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*. **Phytochemistry**, **44** (suppl. 8): 1449 - 1454, 1997.
- PEDROTTI, E.L.; VOLTOLINI, J.A.; MACIEL, S.C. - Porta-enxerto de macieira: enraizamento "ex vitro" e aclimatização de plantas produzidas "in vitro". **Agropecuária Catarinense**, **12** (suppl. 4): 32-34, 1999.
- PUPO, M.T.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. - Potenciais antitumorais de *Trichilia clausenii*. In: **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Fortaleza - CE, 1994. (Resumo de temas livres).

- PUPO, M.T.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; FO, E.R. – Androstane and pregnane 2 $\beta$ ,19-hemiketal steroids from *Trichilia claussenii*. **Phytochemistry**, **45** (suppl. 7): 1495 – 1500, 1997.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. - **Madeiras do Brasil**. Florianópolis –SC, Ed. Lunardelli, 1979.
- REY, H.Y. & MROGINSKI, L.A. – Regeneration of plants from callus tissue of *Aeschynomone* spp. (Leguminosae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **45**: 185-190, 1996.
- REPUNTE, V.P.; TAYA, M.; TONE, S. – Preparation of artificial seeds using cell aggregates from Horseradish Hairy roots encapsulated in alginate gel with paraffin coat. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **79** (suppl.1): 83-86, 1995.
- SCHENK, R.U. & HILDEBRAND, A.C. - Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. **Can. J. Bot.**, **50**: 199-204, 1972.
- SELBY, C. & HARVEY, B.M.R. – The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured *Sitka spruce* tissues. **Annals of Botany-London**, **65**: 395-407, 1990.
- SORVARI, S.; TOLDI, O.; AHANEN, K.; VIINAMÄKI, T.; HAKONEN, T.; TAHVONEN, R. – Using polyssaccharides and Galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. **Journal American Societ Horticultural Science**, **122** (suppl. 6): 878-883, 1997.
- SOUZA, L.A. & SILVA, I. - Frutos e plântulas de espécies nativas de interesse medicinal. In: **Resumos do XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Fortaleza -CE, 1994. (Resumo de temas livres).
- STANDARDI, A. & PICCIONI, E. – Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic “in vitro”-derived explants. **Int. Journal Plant Science**, **159** (suppl. 6): 968-978, 1998.
- STIMART, D.P. & MATHER, J.C. – Regeneration adventitious shoots from “in vitro” culture of *Liatris spicata* (L.) Willd. cotyledons. **Hort Science**, **31** (suppl.1): 154-155, 1996.
- SUMANA, K.R.; KAVERIAPPA, K.M. – “In vitro” micropropagation of *Asystasia dalzelliana* Santapau, na endemic species of the Western Ghats. **Current Science**, **70** (suppl. 9): 777-779, 1996.

- SUPRASANNA, P.; GANAPATHI, T.R.; RAO, P.S. – Artificial seeds in Rice (*Oryza sativa* L.): encapsulation of somatic embryos from mature-embryo callus cultures. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, 4 (suppl. 2): 90-93, 1996.
- TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. – Forest-tree biotechnology: genetic transformation and application to future forests. **Trends in Biotechnology**, 16 : 439 – 446, 1998.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H. - Protein engineering in plants: expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein genes. In: VASIL, I.K. - **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. San Diego, Academic Press. v. 6, 1989. p. 425-39.
- VALLADARES, G.; DEFAGO, M.T.; PALACIOS, S.; CARPINELLA, M.C. – Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the Elm Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, 90 (suppl. 3): 747 – 750, 1997.
- VANDEMOORTELE, J.L.; BILLARD, J.P.; BOUCAUD, J.; GASPAR, T. – Micropropagation of parsley through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 44 : 25-30, 1996.
- VIANA, A.M.; TABANEZ, A.J. and BATISTA, J.L. - Dynamics and restoration of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. In: LAURENCE, W.F. and BIERREGAARD Jr., R.O. (Ed.). - **Tropical Forest Remnants, Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago, The University of Chicago Press, 1997. p. 351-65.
- VIANA, A.M.; MAZZA, M.C.; MANTELL, S. - Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain Forests. In: BENSON, E.E. (Ed.). – **Plant Conservation Biotechnology**. London, Taylor and Francis Ltd, 1999. p. 277-95.
- WHITE, P.R. - **The cultivation of animal and plant cells**. New York, Roland Press, 1963.
- WRIGHT, B.D. – Crop genetic resource policy: the role of “ex situ” genebanks. **The Australian Journal of Agricultural and Resource Economics**, 41 (suppl. 1): 81-115, 1997.
- ZEL, J.; GOGALA, N.; CAMLOH, M. – Micropropagation of *Pinus sylvestris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 14: 169-175, 1988.