

JULIANA MARGARIDO FONSECA COUTO

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *in vitro* DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2002

JULIANA MARGARIDO FONSECA COUTO

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *in vitro* DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de março de 2002

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Conselheiro)

---

Prof. Sebastião Venâncio Martins  
(Conselheiro)

---

Prof. Ésio de Pádua Fonseca

---

Prof. José Mauro Gomes

---

Prof. Antônio Lelis Pinheiro  
(Orientador)

*A Deus pelo seu infinito amor,*

## *OFEREÇO*

*Aos meus avós,  
Argemiro e Zizinha (in memoriam) e  
Jovino (in memoriam) e Maria (in memoriam);*

*Aos meus pais  
Laércio e Maria José, pelo amor e incentivo  
em todos os momentos da minha vida;*

*Aos meus irmãos  
Luciano e Michelle,  
pelo apoio e estímulo;*

*Ao meu namorado  
Givanildo, pelo apoio, amor e  
companheirismo,*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTO

Aos tios Ésio e Nilva pelas incansáveis ajudas, carinho, força e estímulo, e aos primos Vitor e Tayane pelo carinho.

Aos meus cunhados Vivian e Michel, e ao meu sobrinho Vinícius pelo apoio e momentos alegres.

Ao Sr. Alcides, Sra. Vanice, Ana, Alceu, Giovana, Aline e Pedro Augusto pelo constante carinho e incentivo.

Às amigas Cláudia, Kátia, Solange, Miranda, Fabiana, Elisa, Maria Rita e Silvana pela grande amizade.

Aos colegas Vespasiano, Luciano, Léo Batata, Rodrigo e Tiago do Laboratório de Cultura de Tecidos II, por toda ajuda e força ao longo do curso.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Florestal, pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Antônio Lelis Pinheiro pela orientação e amizade.

Ao professor Wagner Campos Otoni pelos conselhos, amizade, e apoio, e pela liberação do Laboratório de Cultura de Tecidos II onde foi realizado todo o trabalho de experimentação.

Aos professores, Écio de Pádua Fonseca, José Mauro Gomes e Sebastião Venâncio Martins.

À técnica de nível superior e grande amiga Elisonete (Lili) pelas idéias, ajuda e amizade.

Ao engenheiro Luiz Ongaratto, à empresa Tramontina Belém S.A., e à AIMEX Sementes Belém, pelo fornecimento das sementes de mogno utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do Viveiro de Pesquisa e do Setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal.

À toda minha família e a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Descrição da espécie.....	4
2.1.1. O mogno .....	4
2.1.2 Características gerais da planta.....	5
2.1.3. Área de ocorrência .....	6
2.2. Desinfestação e germinação de sementes .....	7
2.3. Micropropagação e morfogênese <i>in vitro</i> .....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12
CAPÍTULO I .....	16
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
2.1. Material experimental .....	18
2.2. Metodologia.....	19
2.2.1. Desinfestação de sementes de <i>Swietenia macrophylla</i> .....	19
2.2.2. Posição da semente .....	20
2.2.3. Tratamentos e delineamento experimental .....	20

2.2.4. Germinação de sementes de <i>Swietenia macrophylla</i> .....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Swietenia macrophylla</i> .....	23
3.2. Desinfestação <i>in vitro</i> das sementes de <i>Swietenia macrophylla</i> .....	28
4. CONCLUSÕES .....	34
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	35
CAPÍTULO II.....	38
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1. Material experimental .....	39
2.2. Metodologia.....	39
2.2.1. Obtenção de explantes .....	39
2.2.2. Morfogênese <i>in vitro</i> .....	40
2.2.3. Meio de cultura .....	40
2.2.4. Explante foliar.....	41
2.2.5. Segmento de epicótilo.....	41
2.2.6. Epicótilo invertido .....	42
2.2.7. Condução do experimento .....	42
2.2.8. Parâmetros avaliados .....	43
2.2.8.1. Explantes foliares e segmentos de epicótilo .....	43
2.2.8.2. Epicótilo invertido .....	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Avaliação de formação de calo em explantes foliares .....	44
3.2. Avaliação de regeneração em segmento de epicótilo .....	47
3.2.1. Brotação em segmentos de epicótilo .....	47
3.2.2. Intensidade e textura de calos formados .....	48
3.3. Avaliação de regeneração em epicótilo invertido.....	52
4. CONCLUSÕES .....	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
CONCLUSÕES GERAIS.....	60

## RESUMO

COUTO, Juliana Margarido Fonseca, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2002. **Germinação e Morfogênese *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Orientador: Antônio Lelis Pinheiro. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Sebastião Venâncio Martins.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver técnicas de regeneração *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo, epicótilo invertido e explantes foliares provenientes de plântulas de mogno (*Swietenia macrophylla*) germinadas em meio de cultura e determinar a melhor concentração e tempo de exposição das sementes ao agente desinfestante, bem como a melhor posição de semeadura para germinação. As sementes foram desinfestadas, após a retirada do tegumento, em soluções com hipoclorito de sódio nas concentrações 0; 2,5 e 5,0% (v/v), mantidas embebidas por 10, 20, 30 e 40 minutos e inoculadas no meio em duas posições, sendo a posição 1 com a concavidade da parte achatada voltada para cima e na posição 2 com a concavidade da parte achatada voltada para baixo. Após a inoculação foram mantidas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlado. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 x 2 (níveis de hipoclorito x tempos de embebição x posição da semente), totalizando 24 tratamentos com 3 repetições. Foram realizados aos 12, 18, 24 e 30 dias avaliações de germinação e

contaminação por microrganismos. De modo geral, os melhores tratamentos foram a desinfestação das sementes embebidas em 2,5 e 5% de hipoclorito de sódio por 30 e 20 minutos, respectivamente, e ambas inoculadas na posição 2, pois estas apresentaram a maior taxa de germinação (48%) e baixas taxas de contaminação. Com relação à posição, ocorreu diferença significativa aos 24 e 30 dias após inoculação, com as maiores médias para as sementes inoculadas na posição 2. Os explantes foliares foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico, 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 mg L<sup>-1</sup>) sendo avaliados aos 20, 30 e 40 dias o número de explantes calejados, intensidade de calejamento e textura dos calos dos explantes. Ao final de 40 dias não se observou embriogênese, porém observou-se formação de calos compacto de coloração branca. Para os segmentos de epicótilo, inoculados em meio MS suplementado com combinações do regulador BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) também se observou calogênese na maioria dos explantes, com formação de calo compacto esverdeado nas extremidades do explantes. Os hipocótilos invertidos, inoculados em meio suplementado com BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram emissão de brotação nos nós cotiledonares e em gemas preexistentes. Observou-se também neste tipo de explante uma alta taxa de oxidação na parte do explante em contato com o meio.

## ABSTRACT

COUTO, Juliana Margarido Fonseca, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2002. **Germination and Morphogenesis *in vitro* of Mahogany (*Swietenia macrophylla* King)**. Advisor: Antônio Lelis Pinheiro. Committee members: Wagner Campos Otoni and Sebastião Venâncio Martins.

The objective of this work was to develop techniques of *in vitro* regeneration of mahogany (*Swietenia macrophylla*), through epicotyls segments, inverted epicotyls and leaf explants from mahogany plantlets germinated in culture medium. Also the best concentration and time for seeds sterilization and the sterilizing agent were determined, as well as the best sowing position of the seed for germination. After removing the teguments of the seeds, they were sterilized in sodium hypochlorite solutions on concentrations 0; 2,5 and 5,0% (v/v), keeping them soaked by 10, 20, 30 and 40 minutes and inoculated in the culture medium in two positions: a) position 1 - with the concavity of the flat part turned upward, and b) position 2 - with the concavity of the flat part turned down. After the inoculation the seeds were kept in growth room with controlled temperature and photoperiod. The factorial design was entirely casual, with 3 x 4 x 2 (sodium hypochlorite levels x times of soaking x position of the seed), totaling 24 treatments with 3 repetitions. The germination stage and microorganism contaminations were evaluated at 12, 18, 24 and 30 days after

germination. In general, the best treatments were the seed sterilization soaked in 2,5 and 5% of sodium hypochlorite at 30 and 20 minutes, respectively, and both inoculated in the position 2, also these treatment presented the greatest germination rate (48%) and the lowest rates of microorganisms contamination. About position, it was detected a significant difference for the 24 and 30 days after inoculation, with the greatest averages for the seeds inoculated in the position 2. The leaf explants inoculated on MS culture medium supplemented with different concentrations of the growth regulator picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid, 0; 0,6; 1,2; 2,4 and 4,8 mg L<sup>-1</sup>) with the number of explants with callus, callusing intensity and callus texture, being evaluated at 20, 30 and 40 days. At the end of 40 days, embryogenesis was not observed, only formation of compact and white callus. For the epicotyl segments, inoculated in half MS supplemented with combinations of BAP (6-benzilaminopurine) and ANA (naphthalenacetic acid), calogenesis was observed in most of the explants, with formation of greenish compact callus in the extremities of the explants. The inverted hypocotyls, inoculated in half MS supplemented with BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 mg L<sup>-1</sup>) presented shoot elongation in the cotyledonary and preexistent knots. It was also observed in this explant type a discharge oxidation rate in the explant in contact with the culture medium.

## 1. INTRODUÇÃO

O mogno (*Swietenia macrophylla*), da família Meliaceae, é uma espécie de grande importância econômica devido à sua madeira, que é durável e muito apreciada para a fabricação de móveis de luxo e artigos de decoração. Nas Américas ocorrem três espécies do gênero *Swietenia* e a espécie *macrophylla* ocorre desde a Península de Yucatán, no Sul do México e estende-se à Região Amazônica do Brasil, abrangendo também o Peru e a Bolívia.

Devido à exploração intensiva, as reservas naturais do mogno vêm diminuindo cada vez mais, e por isso o governo decretou a Lei número 3.559, de 14 de agosto de 2000, que suspende na Região Amazônica a exploração da espécie pelo período de dois anos (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2000). Assim, o incentivo ao reflorestamento seria a única maneira de evitar sua extinção e o desaparecimento das reservas naturais, mas este tem sido limitado devido aos ataques severos de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller. (Lepidoptera, Pyralidae), que destroem a gema terminal das plantas jovens, acarretando a redução do vigor e a bifurcação do tronco.

A busca de alternativas para o cultivo da espécie tem sido um grande desafio para os pesquisadores florestais. A cultura de tecidos é uma das alternativas técnicas, pois pode ser usada como ferramenta para propagar espécies de interesse econômico, obtendo-se altas taxas de multiplicação em

curto espaço de tempo. Esta técnica pode também ser utilizada para a obtenção de propágulos, principalmente de espécies florestais que apresentam problemas que vão da produção, armazenamento, germinação até as patologias das sementes (MARUYAMA & SAITO, 1989). Segundo ALBARRÁN et al (1997), a aplicação da biotecnologia vegetal pode contribuir com vantagens para a propagação *in vitro* massal do mogno, empregando organogênese e embriogênese somática. Destacam ainda que, a técnica pode contribuir para os programas de reflorestamento e de preservação da espécie, e conhecimento maior dos padrões de variação genética e indução de variabilidade, possibilitando a seleção de indivíduos com características importantes como a resistência ao ataque da *Hypsipyla grandella*, fator limitante ao cultivo do mogno em grandes plantações. O inseto *Hypsipyla grandella* é a praga mais severa das plantações jovens de Meliáceas, sendo as plantações de mogno abandonadas depois de repetidas infestações. O dano ocorre devido à perfuração dos brotos terminais das plantas jovens pelas larvas, resultando na interrupção do crescimento em altura e conseqüente bifurcação do tronco.

De acordo com LEE & RAO (1988), apesar de haver relatos de sucesso da propagação de plantas arbóreas de clima temperado usando técnicas de cultura de tecidos, existem poucos trabalhos empregando esta técnica em espécies arbóreas de clima tropical. Dentre os poucos publicados sobre o uso da cultura de tecidos do mogno, destacam-se os trabalhos de MARUYAMA et al (1989), MARUYAMA & ISHII (1997) e VENKETESWARM et al (1988) que obtiveram plântulas de mogno a partir de segmentos nodais.

LOPES (2000) estudou a propagação *in vitro* de *Swietenia macrophylla*, verificando a influência da concentração de agentes desinfestantes e diferentes meios de cultura para germinação de sementes e indução de brotação e enraizamento de explantes *in vitro*.

Pesquisando 11 espécies florestais da região Amazônica com dificuldade de propagação clonal, via enraizamento de estacas, obtenção de sementes e germinação, MARUYAMA et al (1989) observaram a formação de calo em sementes de mogno quando essas foram inoculadas em meio de cultura acrescido

de regulador de crescimento. Por outro lado, ao utilizarem segmentos nodais como explantes, observaram que houve formação de brotações múltiplas.

De acordo com MARUYAMA & ISHII (1997) foi possível obter a multiplicação, regeneração, enraizamento e embriogênese somática em segmentos de epicótilo e gemas apicais de mogno (*Swietenia macrophylla*) empregando-se a técnica de cultura de tecido.

ALBARRÁN et al (1997) destacaram que no cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla*, os reguladores de crescimento utilizados e suas concentrações foram decisivos na obtenção da morfogênese. Apontaram ainda, a necessidade de um aprofundamento nos estudos da utilização de diversos tipos de explantes.

À luz dessas considerações, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de regeneração *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo, epicótilo invertido e folhas provenientes de plântulas de mogno germinadas *in vitro* e verificar a germinação da semente de mogno em meio de cultura, determinando a melhor concentração e tempo de exposição das sementes ao agente desinfestante, bem como a melhor posição de semeadura.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Descrição da espécie

#### 2.1.1. O mogno

Sob a denominação de “mogno” encontra-se no mercado aproximadamente uma centena de madeiras pertencentes às mais diversas famílias e gêneros. Considera-se madeira genuinamente de mogno apenas a pertencente ao gênero *Swietenia*, mas em um sentido amplo, podem designar-se ainda os outros gêneros e espécies da família Meliaceae, entre os quais se destacam *Khaya ivorensis* e *K. senegalensis*. Dentro do gênero *Khaya*, ocorrem as espécies como *K. grandifolia* e *K. anthotheca*, que são conhecidas sob a designação de “mogno africano”, não havendo distinção substancial do “verdadeiro mogno” no aspecto fisionômico, nem na qualidade da madeira (LAMPRECHT, 1990).

### 2.1.2 Características gerais da planta

Segundo MAYHEU & NEWTON (1998), a árvore do mogno é de grande porte, podendo atingir de 40 a 45 metros de altura e de 100 a 200 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), com fuste de 20 a 27 metros, folhas perenes, com curto período de desfolha, que ocorre por ocasião da maturação das sementes. Possui sapopemas basais, sua casca é parda avermelhada escura, inteiramente rosada, espessa, profundamente sulcada; quando jovem possui lenticelas; copa de folhagem densa, fortemente verde com ramificação pesada e bem distribuída.

As folhas são paripenadas alternas e têm de 25 a 45 cm de comprimento, sendo compostas por 3 a 4 pares de folíolos opostos. As pequenas flores de coloração creme-amarelada estão inseridas em panículas de 15 a 25 cm de comprimento. O fruto é lenhoso, constituído por cápsula, ovóide, de coloração castanho-clara, com cerca de 12 a 18 cm de comprimento, que se abre em 5 partes, com 10 a 14 sementes aladas com comprimento de 8 a 11 cm cada uma (LAMPRECHT, 1990) (Figura 1).

A madeira do mogno é moderadamente pesada variando de 0,55 a 0,70 g cm<sup>-3</sup>, possuindo cerne variando do castanho avermelhado a castanho escuro uniforme. O alburno é amarelo ou levemente pálido, de pouca espessura, grã-direita e textura média. Possui cheiro característico, gosto amargo, superfície lustrosa e geralmente lisa ao tato (GASPARETTO, 1998). É fácil de trabalhar, sendo utilizada na confecção de móveis finos, nos trabalhos arquitetônicos e paredes ornamentais, móveis para rádios e televisores, botes e barcos, molduras, cofres, esculturas torneadas ou entalhadas e instrumentos musicais, particularmente pianos (HOLDRIDGE, 1973).

### 2.1.3. Área de ocorrência

A área de ocorrência natural do mogno situa-se entre a latitude 20° N e 18° S, desde Yucatán no México passando pela América Central, Colômbia e Venezuela até as zonas de baixa altitude da Amazônia Ocidental do Equador, Peru, Brasil e Bolívia (LAMPRECHT, 1990).

No Brasil, o mogno ocorre na região Amazônica, com distribuição que vai do Rio Araguaia, ultrapassando as fronteiras brasileiras com a Bolívia e Peru. Ocorre também em pequenas áreas dos estados do Maranhão e Tocantins, seguindo pelo Pará, Mato Grosso, Rondônia, Acre e parte sul do Amazonas. Os estados do Acre (100%) Rondônia (97,2%) têm seus territórios quase que integralmente dentro da área de ocorrência do mogno. A menor ocorrência é observada em Tocantins (0,27%) e no Maranhão (0,85%). Por outro lado, o estado do Pará participa com 46,7% de seu território na zona de ocorrência natural do mogno (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 1999).



Figura 1. *Swietenia macrophylla*: A - ramo florido, B – flor masculina, C – flor feminina, D – fruto, E – semente.

Fonte: PENNINGTON (1981).

## **2.2. Desinfestação e germinação de sementes**

Segundo MALAVASI (1988), a germinação das sementes é a reativação do crescimento ativo do embrião resultando no rompimento do tegumento da semente e na emergência da plântula. Assume-se portanto, que a semente tenha ficado em estado de repouso depois de sua formação e desenvolvimento, apresentando um estado de relativa inatividade com atividade metabólica mínima. A semente pode permanecer neste estado até que o local e as condições ambientais sejam adequados à reativação do crescimento.

Assim, quando a semente é reidratada, ocorre a absorção de água, respiração, e outras atividades que desencadeiam o processo germinativo (ARAÚJO NETO, 1997) e ela pode ser afetada por uma série de condições intrínsecas e extrínsecas, cujo conjunto é essencial para que o processo se desenvolva normalmente (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977).

Segundo SILVA as sementes podem ser materiais convenientes para o trabalho de cultura de tecido. Após lavagem e esterilização de sua superfície, elas podem se desenvolver em meio nutritivo e dar origem diretamente à cultura de calo, ou germinarem em um meio simples, sem regulador de crescimento, produzindo plântulas livres de contaminantes, que poderão então ser seccionadas sob condições assépticas e usadas como explantes.

A esterilização, segundo GEORGE (1996), consiste na limpeza na parte externa da planta de onde o explante será removido, reduzindo a contaminação e a mesma pode ser realizada com lavagem em água corrente, água com sabão, ou com qualquer outro detergente, que possa facilitar a ação do agente descontaminante sobre a superfície do explante.

Segundo os mesmos autores citados acima, existem vários produtos que podem ser usados nesta operação, dentre eles o hipoclorito de sódio e o hipoclorito de cálcio, em solução filtrada. Embora o hipoclorito de cálcio seja menos apropriado para se manejar e nem sempre efetivo na remoção dos contaminantes, pode ser o menos tóxico ao vegetal. A água sanitária comercial é

fonte de hipoclorito de sódio (NaOCl) e por isto, usada por muitos laboratórios em várias concentrações, no processo de descontaminação.

Alguns autores afirmam que dez minutos de imersão em bactericida foi mais efetivo do que o NaOCl, para esterilização de sementes ou cultura de embriões, e que a penetração do agente esterilizante foi consideravelmente aumentada pela rápida imersão em etanol a 70% v/v.

GEORGE (1996), dizem que se deve considerar o período de exposição ao agente desinfestante, sendo que longos períodos podem danificar o tecido e um curto período não destrói os microrganismos. O tempo de exposição depende do material a ser desinfestado, pois explantes de diferentes partes da planta variam em sensibilidade à solução esterilizante.

LOPES (2000) verificou o efeito de diferentes substratos e condições de luz e temperatura para germinação de plântulas de mogno *in vitro*, concluindo que a vermiculita foi superior ao ágar como substrato para germinação, que a sacarose a 3% na vermiculita não favoreceu a emergência de plântulas de mogno *in vitro*, e ainda que as temperaturas de 25° e 30° C, independente da presença de luz, foram equivalentes para emergência e velocidade de emergência de plântulas de mogno *in vitro*.

Visando aumentar o potencial germinativo, KALIL FILHO et al (2000) testaram métodos de desinfestação em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*), utilizando-se hipoclorito de sódio e fungicida Tolyfluanid.

### **2.3. Micropropagação e morfogênese *in vitro***

Segundo MAYHEW & NEWTON (1998) a micropropagação é uma técnica que tem como vantagem proporcionar alta taxa de multiplicação, porém apresenta altos custos em termos de treinamento de equipe e equipamentos.

Essa técnica pode ser conduzida, segundo BONGA & VON ADERKAS (1992), de três maneiras: por meio da proliferação de gemas axilares e meristemas apicais; multiplicação a partir de gemas adventícias por organogênese, e multiplicação por embriogênese somática.

A morfogênese é definida segundo WARDLAW (1968), como sendo uma mudança fisiológica e morfológica que permite a especialização de células, tecidos ou órgãos da planta inteira durante o desenvolvimento.

O termo desenvolvimento abarca, em nível do órgão individual, todas as alterações que intervêm entre a iniciação da forma e o estabelecimento da morfologia adulta, e, em nível do organismo, a seqüência global de alterações na forma e função que intervêm entre o óvulo fertilizado e a morte da planta. Os eventos morfogênicos podem, a partir disso, ser considerados como as variações qualitativas através das quais os padrões de desenvolvimento se apresentam. Além do mais, só quando é concentrada a atenção em algum critério particular de alterações, fala-se de morfologia, anatomia ou fisiologia do desenvolvimento (STREET e ÖPIK, 1974).

Apenas quando se trata de níveis particulares de organização, distingui-se uma diferenciação celular, organização individual, desenvolvimento de órgão, da ontogenia do organismo individual. É claro que um vasto campo de pesquisa biológica pode ser considerado como dirigido à compreensão do desenvolvimento (STREET & ÖPIK, 1974).

De acordo com AMMIRATO (1985) as fases envolvidas na morfogênese *in vitro* são: fase de indução e de expressão. A primeira induz as células a adquirirem competência organogênica ou embriogênica e a segunda expressa o potencial de desenvolvimento de órgãos ou embriões. A competência pode ser definida como a capacidade de resposta da célula ou tecido a sinais morfogênicos.

Segundo GEORGE (1996), o padrão de crescimento e diferenciação no desenvolvimento de um calo vegetal típico e não organizado pode começar com um novo explante ou com um pedaço de uma cultura previamente estabelecida e possuem três estágios de desenvolvimento: a) indução da divisão celular; b) período de efetiva divisão celular durante o qual células desdiferenciadas ou não diferenciadas se dividem e redividem; c) período quando a divisão celular diminui ou cessa e dentro dos calos há um aumento da diferenciação celular.

A organogênese direta, segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) ocorre em tecidos que apresentam potencial morfogênico na planta *in vivo*, mas que não se expressa (como base de pecíolos em dicotiledôneas, base de folhas e segmentos de raízes) e a organogênese indireta ocorre quando as gemas são originadas de calos pré-formados.

As dificuldades na regeneração de qualquer material vegetal na cultura de tecidos, principalmente quando se trata de espécies lenhosas, preocupa os geneticistas, pois o sucesso do estabelecimento dessas *in vitro* depende da capacidade de indução de crescimento e diferenciação dos tecidos. Em espécies lenhosas algumas espécies têm maior facilidade de regenerar do que outras, e essa capacidade de regeneração pode estar relacionada a fortes componentes genéticos (AHUJA, 1983).

Outra dificuldade da cultura de tecidos de espécies arbóreas com relação à recalcitrância, é a presença de substância fenólica nos tecidos das plantas. Segundo ZAERR & MAPES (1982), existe uma variedade de compostos, dentre eles os compostos fenólicos e o ácido abscísico, que têm efeitos na regulação do crescimento ou morfogênese, embora de modo contraditório, inibindo a manifestação morfogênica em alguns experimentos e promovendo a realização em outros.

Os inibidores fenólicos e não fenólicos, segundo os mesmos autores, apresentam as seguintes características: acumulam-se nos órgãos em que os efeitos são manifestados; não são degradados por tecidos em repouso; são ativamente sintetizados por tecidos verdes; deprimem a germinação e a abertura das gemas e deprimem o crescimento longitudinal em concentração mais baixa do que em outros tipos de crescimento. O de natureza fenólica, intervem ainda em numerosos outros processos, seja em antagonismo com as substâncias de crescimento, seja como inibidor de reações metabólicas, intervindo nos fenômenos de início de dormência das gemas ou das sementes. Na cultura *in vitro*, estes compostos são às vezes liberados no meio e se oxidam, provocando injúria e muitas vezes a morte do explante.

Plântulas de mais de 50 espécies arbóreas já foram regeneradas utilizando técnicas de cultura de tecidos, mas apenas algumas dessas espécies obtiveram progresso para a produção em larga escala (AHUJA, 1993).

Segundo EVANS (1992) a propagação *in vitro* do mogno já foi realizada com algum sucesso, podendo-se aplicar a técnica na multiplicação de genótipos resistentes a pragas, oferecendo a possibilidade de resolver o problema da morte de plantas devido ao ataque da larva da *Hypsipyla grandella* às gemas apicais.

Existem poucos estudos com a cultura de tecidos do mogno, podendo-se citar autores como VENKETESWARAN et al (1988), LEE & RAO (1988), MARUYAMA et al (1989), KONDO & OKAMURA (1994) e ALBARRAN et al (1997).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRÁN, J.G., VIELMA, M. & CONTRERAS, G. I. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla*: Estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Forestal Venezuela** v.41, n. 2, p 111-118, 1997.
- AMMIRATO, P.V. Patterns of development in culture. HENKE, R.R et al. (eds). Tissue Culture in Forestry and Agriculture. **New York: Plenum**. pp. 9-29. 1985.
- ARAÚJO NETO, J. C. **Caracterização e germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal de Mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.)**. Jaboticabal, 1997. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo.
- BONGA, B. M. & VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 236p. 1992.

- BRASIL. Decreto número 3.559 de 14 de agosto de 2000. Suspende a exploração da espécie mogno (*Swietenia macrophylla*), na região Amazônica, pelo período de dois anos, e dá providência. **Diário Oficial da Nação**, Brasília, D.O.U. DIA 15/08/2000 SEÇÃO 1, p. 02.
- EVANS, J. **Plantation forestry in the tropics**. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Claredon Press, 418p. 1992.
- GASPARETTO, O. Síntese da situação do mogno, a nível internacional – “Reunião do Grupo de Trabalho sobre o Mogno”. **Relatório Informativo** 01-98. Brasília, 1998. 36p.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. Parte 2. Exegetics Limited, Reino Unido, 1996. 1361pp.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS. L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p. 183-260.
- HOLDRIDGE, L. R. Ecologia de las Meliaceae Latinoamericanas. **In: FIRST SYMPOSIUM ON INTEGRATED CONTROL OF *HYPHIPHYLA***, IICA – CTEI (CATIE). Turrialba, Costa Rica, 1973. p.7-13.
- KALIL FILHO, A. N., GRAÇA, M. E. C. & GRIGOLETTI JUNIOR, A. Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. **In: VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSISTEMAS FLORESTAIS - FOREST 2000**. **Anais...**Porto Seguro, 2000, p.1013.
- LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos Trópicos** – Ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas – Possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado. Deutsche Gesellschaft für Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. p.308-310, Eschborn 1990.

- LEE, S. K. & RAO, A. N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King , through tissue culture. **Garden Bulletin**, v.41, p. 11-18. 1988.
- LOPES, S. C. **Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Pelotas, 2000. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – Rio Grande do Sul.
- MALAVASI, M. M. **Manual de análise de sementes florestais**. Fundação Cargil. Campinas. p.25-40. 1988
- MARUYAMA, E., ISHII, K., SAITO, A. & MIGITA, K. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Peru-Amazon Forest. **Journal of Agriculture Science**, v.23, p.252-261. 1989.
- MARUYAMA, E. & ISHII, K. Tissue culture studies on big-leaf mahogany *Swietenia macrophylla*. **Proceedings of the International Workshop BIO-REFOR**, Brisbane, 1997. p.116-118.
- MAYHEU, J.E. & NEWTON, A.C. The silviculture of mahogany (*Swietenia macrophylla* King). **CAB International**, 1998. 226p.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE**. “Status do mogno (*Swietenia macrophylla*) na Amazônica Brasileira”. Documento de Trabalho n.16. Projeto UTF/BRA/047 – “Agenda positiva para o setor florestal do Brasil”. Projeto TCP/BRA/6712 – “Apoio à agenda florestal do Brasil”. 35p. 1999.
- PENNINGTON, T.D. A monograph of Neotropical Meliaceae. **The New York Botanical Garden**. New York, 1981. 397p.
- SILVA, A. A. **Morfogênese *in vitro* de diferentes tipos de explantes em progênies de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golfari**. Piracicaba, SP, 1989. 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade de São Paulo. Piracicaba – São Paulo.

- STREET, H.E.; ÖPIK, H., **Fisiologia das Angiospermas- crescimento e desenvolvimento**. São Paulo, Edusp, 1974, 315p.
- TOLEDO, F. F. & MARCOS FILHO, J. **Manual de Sementes: tecnologia da produção**. São Paulo, v.2, n.6, p.71-77, 1995.
- VENKETESWARN, S., DIAS, M. A. D. L., SULTANBAWA, F.& MEYERS, U. V. Tissue culture studies on mahogany tree, *Swietenia macrophylla* King  
In: AHUJA, M. R. (ed.) **Somatic Cell Genetics of Woody Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 147-153. 1988.
- WARDLAW, C. W. **Morphogenesis in Plants**. Methuen & Co. Ltd. London, 1968. p.11-24.
- ZAERR, J. B. & MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: BONGA, J. M & DURZAN, D. J. (ed.). **Tissue culture in forestry**. The Hague, Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, p.231-255. 1982.

## CAPÍTULO I

### GERMINAÇÃO E DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)

#### 1. INTRODUÇÃO

A falta de política, de conhecimento técnico e da consciência ecológica podem levar à exploração desordenada das florestas da Amazônia com conseqüente diminuição da biodiversidade e perdas de recursos genéticos de espécies com elevados valores econômicos, além de acarretar problemas ambientais como a redução da cobertura florestal, destruição dos mananciais hídricos, prejudicando a fauna e a flora principalmente das espécies com risco de extinção.

O governo brasileiro reconhecendo o risco de extinção de algumas espécies, entre elas a *Swietenia macrophylla* (mogno) de grande interesse econômico decretou em 2000 a Lei nº 3.559, proibindo a exploração e comercialização da madeira. A proibição é importante para garantir a manutenção de maciços florestais com essas espécies e faz com que os técnicos incrementem as pesquisas, a fim de melhorar os conhecimentos de auto-ecologia,

sinecologia e meio ambiente aplicáveis para os futuros planos de manejos sustentáveis para a região.

A falta de conhecimento dos principais processos básicos da germinação que ocorrem nas sementes de espécies nativas tem dificultado que as metas dos programas de reflorestamento sejam atingidas devido às dificuldades encontradas durante o processo de produção de mudas em viveiro ou no laboratório. Os pesquisadores têm encontrado dificuldades em estabelecer procedimentos para a propagação *in vitro* do mogno devido à escassez de trabalhos publicados.

Espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente se for utilizado material vegetal proveniente de plantas adultas, pois podem apresentar infestação interna ou externa por microrganismos. Por isso, a utilização de plântulas germinadas *in vitro* em condições assépticas torna-se mais vantajosa (SKIRVIN, 1981).

Porém, segundo CORDER & BORGES JUNIOR (1999), vários fatores podem afetar o vigor germinativo de sementes ou promover a formação de plântulas anormais ou sua morte, dentre eles a dormência e a presença de microrganismos, principalmente fungos e bactérias. Por isso, os métodos de desinfestação devem ser eficazes para que a plântula sirva de fonte de explante livre de fungos e bactérias.

LOPES (2000), germinou sementes de mogno *in vitro* utilizando ágar e vermiculita, concluindo que a vermiculita foi superior ao ágar como substrato para a germinação do mogno.

KALIL et al (2000) testaram a desinfestação e germinação de sementes de mogno *in vitro* com objetivo de obter o tratamento mais eficiente, quanto ao controle de fungos na obtenção de plântulas germinadas *in vitro*.

Espécies como a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All), foram germinadas *in vitro* por ANDRADE et al (2000), com o objetivo de utilizar as plântulas como fonte de explantes para estudos de propagação *in vitro*.

CORDER & BORGES JUNIOR (1999), estudaram métodos de desinfestação e quebra de dormência de *Acacia mearnsii in vitro*, com o objetivo

de determinar uma metodologia adequada para quebra de dormência de sementes de acácia negra e indicar um método eficiente de desinfestação das sementes.

COELHO et al (2001), compararam a germinação de sementes de sucupira branca (*Pterodon pubescens* BENTH) *in vitro* e *ex vitro*, objetivando melhorar a taxa de germinação.

PRADHAN et al (1998), germinaram sementes de *Dalbergia sissoo* Roxb. *in vitro*, para obter plântulas utilizadas como fonte de explantes na propagação *in vitro*.

O mogno tem dificuldade de regenerar após práticas de exploração, que geralmente são seletivas e irracionais, que dizimam inúmeras árvores adultas, diminuindo a disponibilidade de sementes (LOPES, 2000), dificultando a obtenção das sementes de mogno. Por isso, estudos para viabilizar a germinação das sementes, evitando o desperdício das mesmas devem ser levados em conta.

Diante desses fatos, este trabalho teve como objetivo verificar a germinação da semente de mogno em meio de cultura, determinando a melhor concentração e tempo de exposição das sementes ao agente desinfestante, bem como a melhor posição de semeadura.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material experimental**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa–MG, no período de agosto de 2001 a janeiro de 2002.

As sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) foram doadas pela empresa Tramontina Belém S.A. da cidade de Belém-PA.

## 2.2. Metodologia

### 2.2.1. Desinfestação de sementes de *Swietenia macrophylla*

As sementes com tegumento foram previamente desinfestadas em hipoclorito a 5% (v/v) durante trinta minutos. Posteriormente, os tegumentos foram retirados e as sementes foram submersas em solução de etanol 70% (v/v) por um minuto. A seguir foram embebidas em solução contendo hipoclorito de sódio nas concentrações 0; 2,5 e 5,0 % (v/v) com 3 gotas 100 ml<sup>-1</sup> de detergente comercial Tween 20. Foram então, novamente submersas na solução de benlate na concentração de 1 g L<sup>-1</sup> e finalmente enxaguadas em água destilada autoclavada, conforme mostra o esquema da Figura 1.

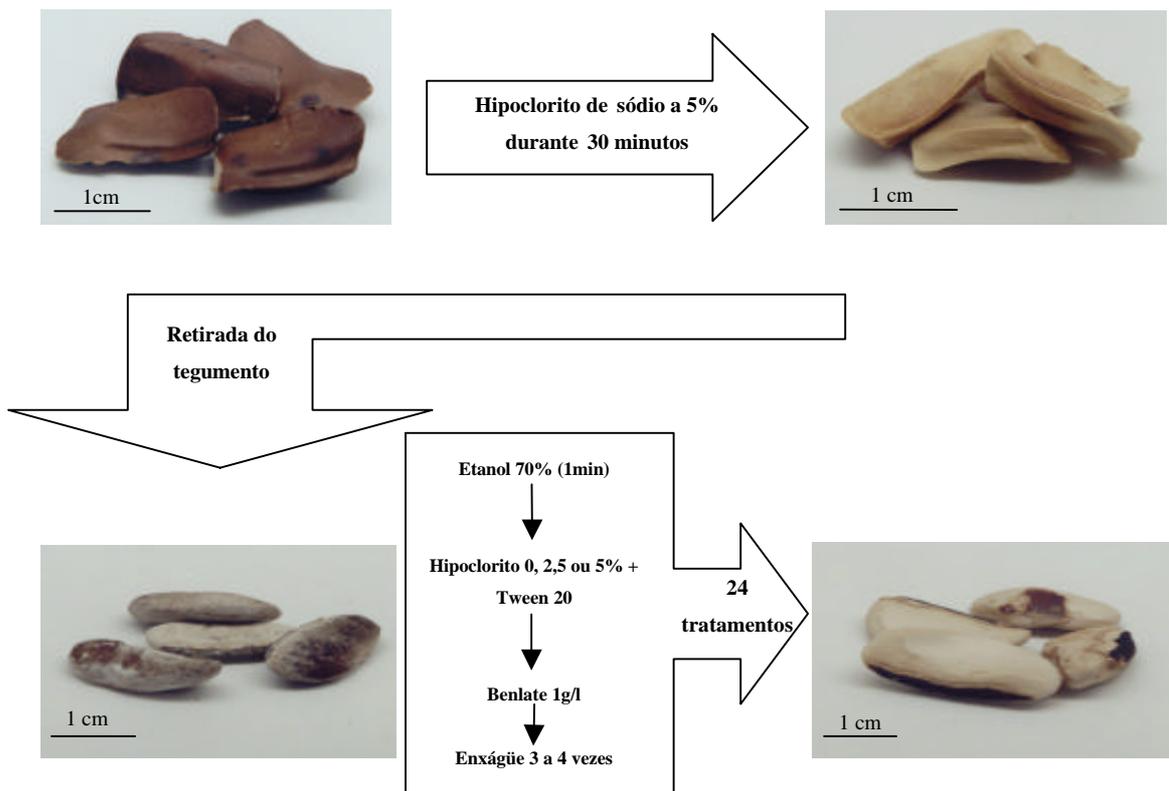


Figura 1. Esquema do processo de desinfestação utilizado nas sementes de *Swietenia macrophylla*.

### 2.2.2. Posição da semente

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio de cultura em tubos de ensaio em duas posições: posição 1, com a concavidade da parte achatada voltada para cima e, posição 2, com a concavidade da parte achatada voltada para baixo, como é mostrado na Figura 2.

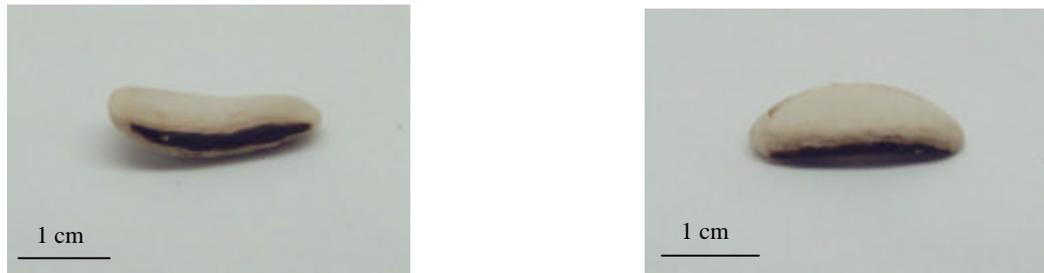


Figura 2. Sementes de *Swietenia macrophylla* sem tegumento antes da inoculação em meio de cultura, nas posições 1 e 2, respectivamente.

### 2.2.3. Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos utilizados para desinfestação, tempo de embebição e posição de semeadura das sementes estão relacionados no Quadro 1.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 x 2 (níveis de hipoclorito de sódio x tempos de embebição x posições de inoculação), totalizando 24 tratamentos com 3 repetições cada um. Em cada repetição foram utilizadas 7 sementes, num total de 504 sementes.

Para as análises estatísticas dos dados ( $X$ ) de germinação, da presença de bactéria e de fungo foi utilizada a transformação radicial ( $\sqrt{X+1}$ ).

Foram efetuadas análises de variância e de regressão, utilizando-se o programa SAEG (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas) (UFV, 2000). As comparações entre médias, quando necessárias, foram feitas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quadro 1. Tratamentos utilizados na desinfestação, tempo de embebição e posição de semeadura de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*).

Tratamentos	Hipoclorito (%)	Tempo (minutos)	Posição
01	0,0	10	1
02	0,0	20	1
03	0,0	30	1
04	0,0	40	1
05	0,0	10	2
06	0,0	20	2
07	0,0	30	2
08	0,0	40	2
09	2,5	10	1
10	2,5	20	1
11	2,5	30	1
12	2,5	40	1
13	2,5	10	2
14	2,5	20	2
15	2,5	30	2
16	2,5	40	2
17	5,0	10	1
18	5,0	20	1
19	5,0	30	1
20	5,0	40	1
21	5,0	10	2
22	5,0	20	2
23	5,0	30	2
24	5,0	40	2

#### 2.2.4. Germinação de sementes de *Swietenia macrophylla*

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio de cultura composto por sais básicos de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com o complexo vitamínico MS, 100 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2% (p/v) de sacarose, 0,5% (p/v) de ágar (Merck), sendo o pH ajustado em 5,7± 0,1. Foram vertidos 10 ml do meio de cultura antes da autoclavagem em cada um dos tubos de ensaio de 25 x 150 mm.

As sementes foram colocadas sobre o meio de cultura nas posições 1 e 2, descritas no subitem 3.3.2. Logo após a inoculação das sementes os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento e mantidos no escuro à temperatura de 26 ± 2 °C, até os 30 dias após a semeadura.

As avaliações das contaminações por fungos e bactérias ocorreram aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação das sementes. A germinação foi avaliada ao 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação, seguindo a escala de germinação, como mostra a Figura 3. Foram consideradas germinadas as sementes com germinação a partir do estágio 3.

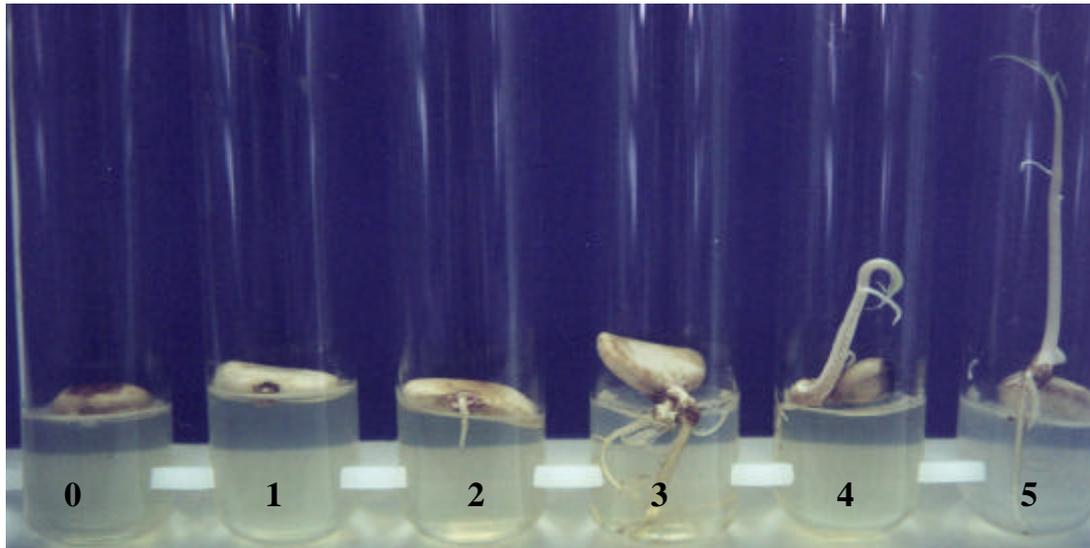


Figura 3. Estágios de germinação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* (0 - semente não germinada; 1 - a semente apresenta início de lançamento da radícula; 2 - semente com presença da radícula; 3 - semente com presença da radícula e início de lançamento da parte aérea; 4 - semente com presença da radícula e parte aérea < 5 cm; 5 - a plântula apresenta parte aérea  $\geq$  5cm).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Germinação *in vitro* de sementes de *Swietenia macrophylla***

Pode-se observar na Figura 4, que as maiores porcentagens de germinação das sementes (48 %) *in vitro*, aos trinta dias após a inoculação ocorreram para os tratamentos T15 e T22.

As sementes do tratamento T15 foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5%, mantidas embebidas por 30 minutos e inoculadas na posição com a parte achatada voltada para baixo, ou seja, posição 2 (T15).

As sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio 5,0 %, mantidas embebidas por 20 minutos e inoculadas na posição 2 (T22), com destaque para o T15 onde a máxima germinação já havia ocorrido aos vinte e quatro dias após a inoculação, enquanto que no T22 havia ocorrido apenas 33 % de germinação.

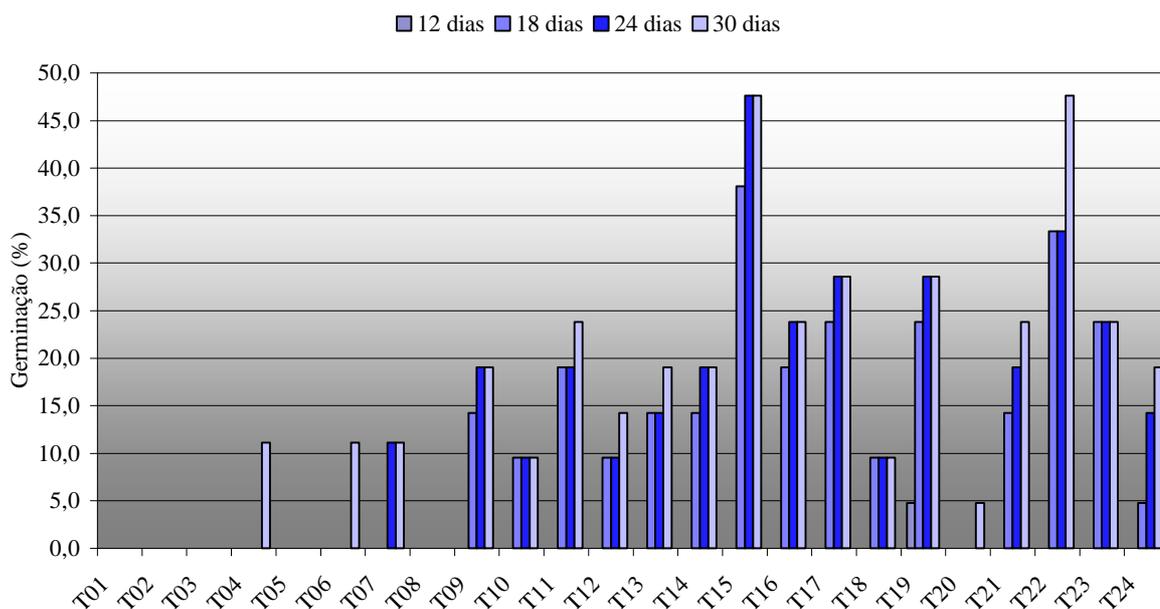


Figura 4. Porcentagem de germinação de sementes de *Swietenia macrophylla* King *in vitro* aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação, de acordo com os tratamentos utilizados para a desinfestação.

Os resultados deste trabalho são similares aos obtidos por PARRAGUIRRE & CAMACHO (1992), que observaram germinação máxima das sementes de mogno em condições de viveiro em torno de vinte e quatro dias.

Pode-se observar pelos resultados do Quadro 2 que o uso dos agentes desinfestantes não promoveu efeito significativo sobre os valores de germinação aos 12 dias após a inoculação, mas aos 18, 24 e 30 dias observou-se efeito quadrático na germinação em função do aumento da concentração do hipoclorito de sódio (Figura 5). Esses resultados não são similares aos obtidos por KALIL et al (2000), que alcançaram em até 100% a germinação das sementes de mogno quando desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos e germinadas *in vitro*, na ausência de luz.

LOPES (2000) concluiu que o mogno tem uma germinação rápida, levando seis dias para germinar. LEMOS et al. (1998), obtiveram resultado similar ao inocular o mogno *in vitro*, observando o crescimento das plântulas que atingiram de 40 a 65 mm em 10 dias.

CORDER & BORGES JUNIOR (1999), após desinfestar sementes de *Acacia mearnsii* em água quente a 80 °C por 3 minutos, e tratadas com hipoclorito de sódio comercial a 10% por 10 minutos, após imersão em álcool por 40 segundos, seguido de três lavagens com água destilada, obtiveram 100% de germinação, porém 50% dessas plântulas se mostraram anormais.

Com relação ao tempo de embebição das sementes em hipoclorito de sódio, observa-se que ocorreu efeito cúbico da germinação apenas aos 18, 24 e 30 dias após a inoculação (Figura 6).

Em relação à posição da semente quando do momento da inoculação, pode-se observar que ocorreu diferença significativa o número de sementes germinadas nas avaliações com 24 e 30 dias após a inoculação das sementes, com as maiores médias para as sementes inoculadas na posição 2, ou seja, quando a parte côncava da semente ficou voltada para baixo.

Resultados similares foram observados por TITO & RODRIGUEZ (1988), porém a semeadura realizada em viveiro, e observaram que as sementes de mogno semeadas na posição horizontal apresentaram maior índice de germinação. MATOS (1972), também destaca que a posição da semente no momento da semeadura pode ser um fator que influencia a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* e relata que sementes semeadas na posição horizontal antecipam a sua germinação em até 30 dias, em condições de viveiro.

Ainda MONDALA (1977) ao estudar a posição de semeadura de mogno em condições de casa de vegetação, observou que, quando as sementes foram semeadas com o eixo embrionário perpendicular ao solo, a percentagem de germinação foi maior.

Autores como NOLTEE (1926) e LAMB (1966), também sugerem que as sementes de mogno devem ser semeadas na posição horizontal com o embrião perpendicular ao solo ou com o embrião voltado para cima. Porém, NEIL (1986) observou que ao semear as sementes de mogno em posição vertical, as plântulas apresentaram uma redução quanto à deformidade do sistema radicular.

Quadro 2. Médias do número de sementes germinadas aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação das sementes de *Swietenia macrophylla* King., de acordo com os tratamentos utilizados para desinfestação.

FONTES DE VARIAÇÃO		GERMINAÇÃO			
		12	18	24	30
Hipoclorito	0	0,0000	0,0000 b	0,0417 b	0,1250 b
	2,5	0,0000	1,2083 a	1,4583 a	1,5417 a
	5,0	0,0417	1,1667 a	1,4167 a	1,6250 a
Tempo	10	0,0000	0,7778 ab	1,0000 ab	1,0556 ab
	20	0,0000	0,7778 ab	0,8333 b	1,0556 ab
	30	0,0556	1,2222 a	1,5000 a	1,5000 a
	40	0,0000	0,3889 b	0,5556 b	0,7778 b
Posição <sup>1</sup>	1	0,0278	0,6389	0,7500 b	0,8611 b
	2	0,0000	0,9444	1,1944 a	1,3333 a
<b>MÉDIA GERAL</b>		0,0139	0,7917	0,9722	1,097

TESTE F					
Hipoclorito de sódio	Linear	NS	**	**	**
	Quadrático	NS	**	**	**
Tempo	Linear	NS	NS	NS	NS
	Quadrático	NS	*	*	NS
	Cúbico	NS	*	**	NS
Posição		NS	NS	*	*
Tempo X Hipoclorito		NS	*	NS	NS
Tempo X Posição		NS	NS	NS	NS
Hipoclorito X Posição		NS	NS	NS	NS
CV (%)		4,85	18,04	18,15	19,56

\*\* (P < 0,01) \* (P < 0,05)

a > b Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05)

<sup>1</sup>a > b Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente pelo teste F (P < 0,05)

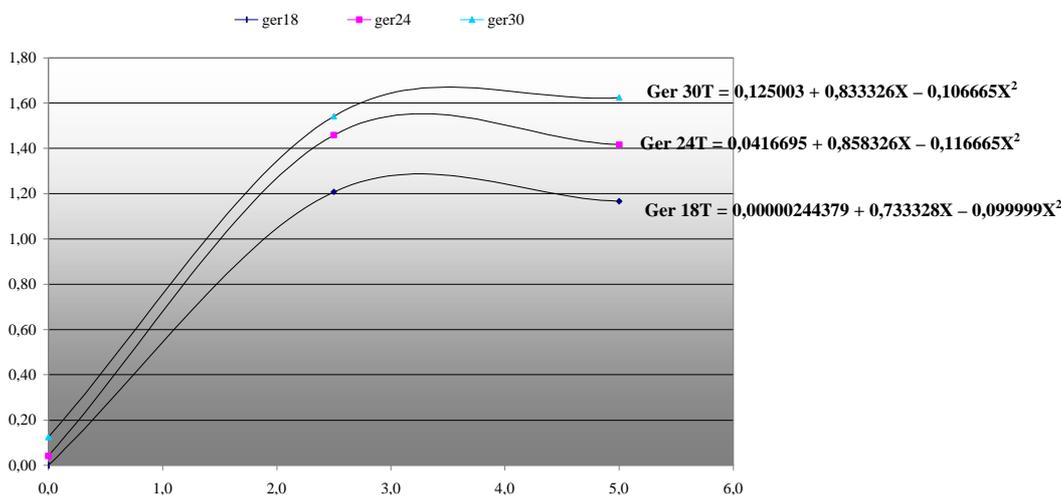


Figura 5. Médias ajustadas de sementes germinadas de *Swietenia macrophylla*, aos 18, 24 e 30 dias após inoculação, em função da concentração de hipoclorito de sódio.

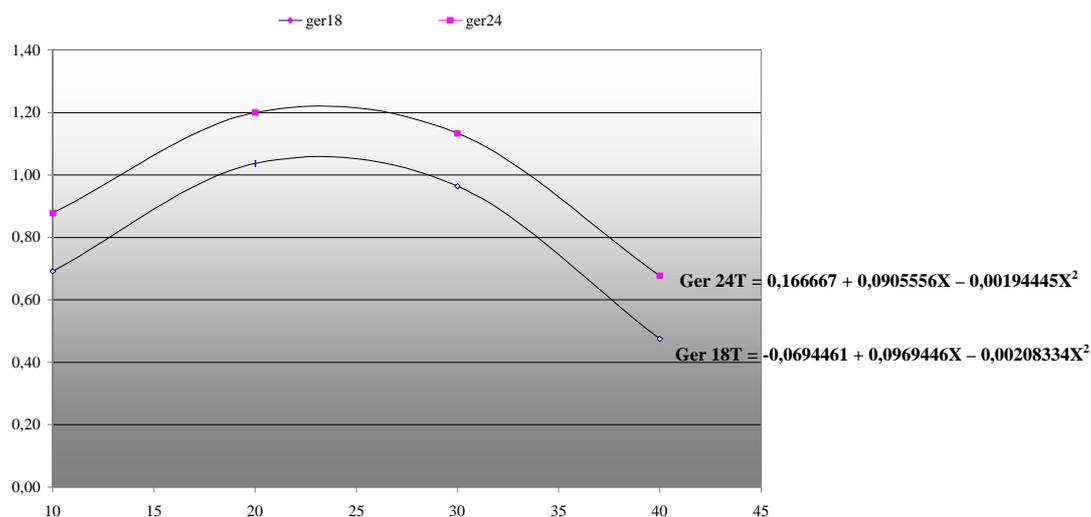


Figura 6. Médias ajustadas de sementes germinadas de *Swietenia macrophylla* aos 18 e 24 dias após inoculação, em função dos tempos de desinfestação.

A interação entre tempo de desinfestação e a concentração de hipoclorito de sódio somente foi significativa para a germinação das sementes aos 18 dias após a inoculação (Quadro 3).

Quadro 3. Interação significativa para o número de sementes germinadas entre hipoclorito de sódio e tempo de embebição utilizados para desinfestação de sementes de *Swietenia macrophylla*, aos 18 dias após inoculação.

	HIPOCLORITO	TEMPO				MÉDIA HIPOCLORITO
		10	20	30	40	
Hipoclorito	0	0,0000 bA	0,0000 bA	0,0000 bA	0,0000 bA	<b>0,0000</b>
	2,5	1,0000 abA	0,8333 abA	2,0000 aA	1,0000 aA	<b>1,2083</b>
	5,0	1,3333 aAB	1,5000 aAB	1,6667 aA	0,1667 abB	<b>1,1667</b>
<b>MÉDIA TEMPO</b>		<b>0,7778</b>	<b>0,7778</b>	<b>1,2222</b>	<b>0,3889</b>	

Médias seguidas de letras diferentes (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

Quando se avaliou o número de sementes germinadas aos 18 dias após a inoculação utilizando hipoclorito de sódio 2,5% não foram observadas diferenças significativas nos diferentes tempos de desinfestação, mas quando hipoclorito de sódio foi igual a 5%, a maior e menor porcentagem de germinação ocorreram aos 30 e 40 minutos, respectivamente.

Ao se avaliar o número de sementes germinadas aos 18 dias nos tempos de desinfestação utilizados, observou-se que, de modo geral, as maiores médias ocorreram para as sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 5,0 % para os tempos de 10 e 20 minutos de desinfestação e para as sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% com desinfestação por 30 e 40 minutos.

Não foram observadas interações significativas entre hipoclorito de sódio e a posição de inoculação das sementes e entre o tempo de desinfestação e posição de inoculação para a capacidade de germinação das sementes aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação.

### 3.2. Desinfestação *in vitro* das sementes de *Swietenia macrophylla*

A variação dos dados da eficiência dos tratamentos de desinfestação das sementes de mogno, em relação à formação e desenvolvimento de microrganismos como bactérias e fungos realizados aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação, é mostrada nas Figuras 7 e 8.

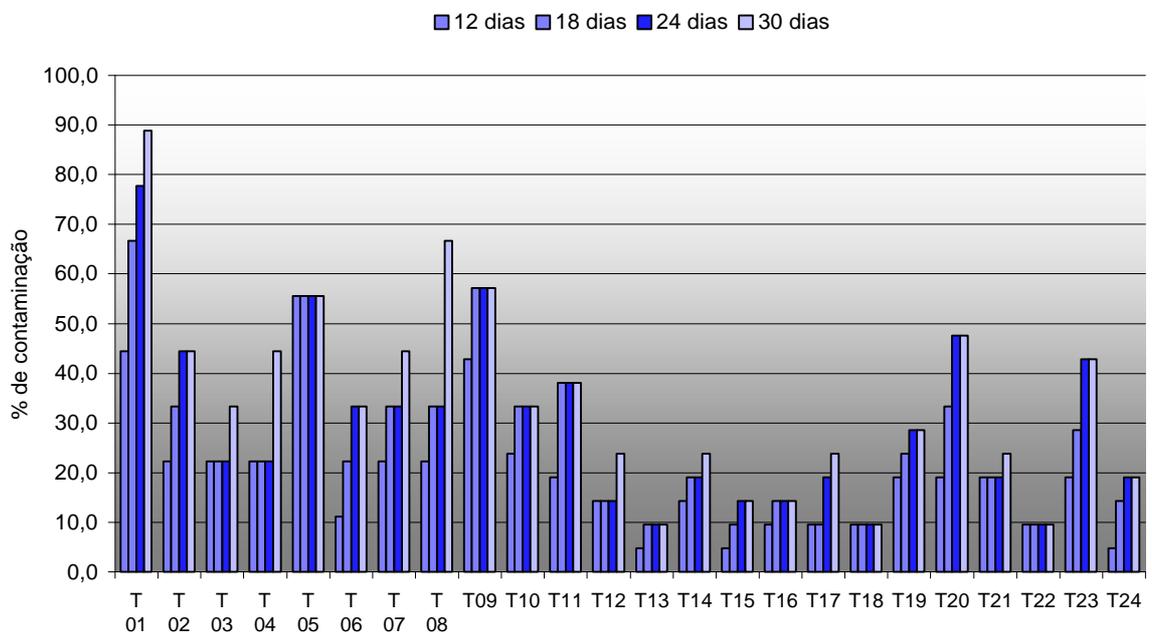


Figura 7. Médias das porcentagens de contaminação por bactéria em sementes de *Swietenia macrophylla* germinadas *in vitro*, aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação.

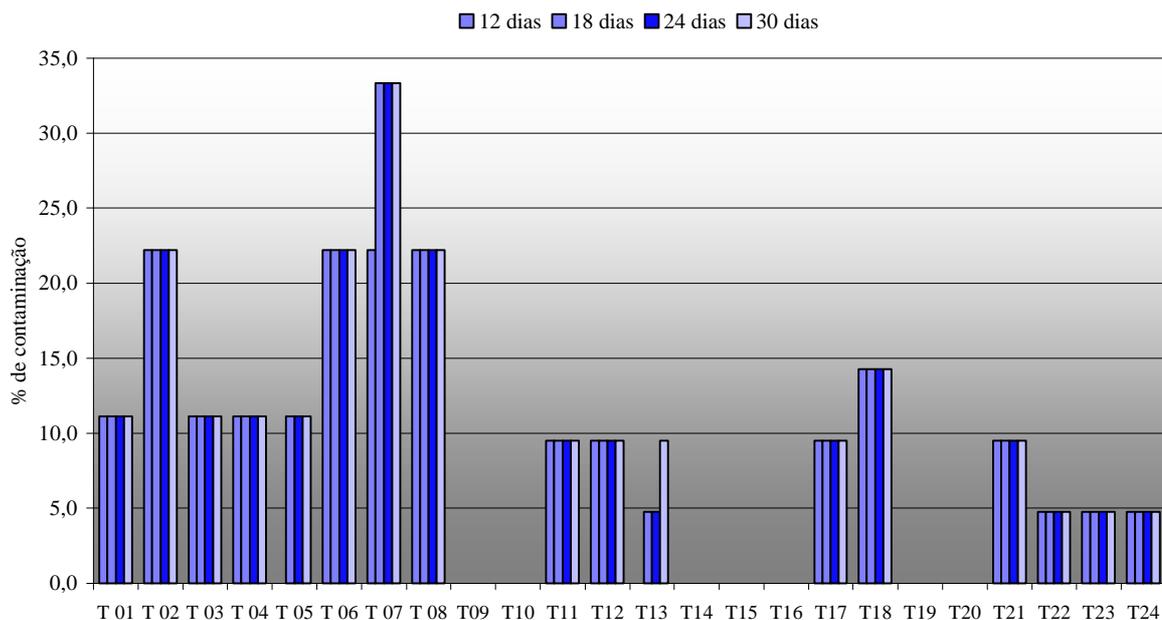


Figura 8. M

édias das porcentagem de contaminação por fungos em sementes de *Swietenia macrophylla* germinadas *in vitro*, aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação.

Os tratamentos que proporcionaram as menores taxas de contaminação, com 9,52% de contaminação por bactéria foram aqueles em que as sementes foram desinfestadas com 2,5% de hipoclorito de sódio, durante 10 e 30 minutos de embebição e inoculadas na posição 2.

Resultados similares foram obtidos com 5,0 % hipoclorito de sódio, durante 20 e 30 minutos de embebição e inoculadas nas posições 1 e 2, respectivamente, seguidos dos tratamentos em que as sementes foram embebidas em 2,5 % hipoclorito de sódio, durante 30 e 40 minutos e inoculadas na posição 2 com 14,29 % de contaminação das sementes infectadas.

O resultado concorda com ANDRADE et al. (2000), que desinfestaram sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All) em álcool 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e lavados 3 vezes com água destilada apresentaram nenhum tipo de contaminante.

CARVALHO (1994), alcançou 65% de germinação de sementes de aroeira germinadas *in vitro* que não passaram por qualquer tratamento envolvendo álcool e hipoclorito de sódio.

Os piores resultados foram obtidos com os tratamentos em que as sementes não receberam a desinfestação com hipoclorito de sódio, apresentando as maiores taxas de contaminação por bactérias com 89 % e 67 %, principalmente quando foram mantidas em embebição por 10 e 40 minutos e inoculadas na posição 1 e 2, respectivamente. A segunda maior taxa de contaminação foi observado para as sementes que não receberam a desinfestação com hipoclorito de sódio e que foram embebidas em água pura por 40 minutos e inoculada na posição 1, com 56 % de contaminação.

No geral ocorreram 18% de contaminação das sementes aos trinta dias após a inoculação para todos os tratamentos que receberam ou não a desinfestação visando o controle fúngico. Parte dessa contaminação fúngica pode ter ocorrido durante a fase de preparo e manipulação dos materiais, ou devido às tampas dos tubos de ensaio não permanecerem hermeticamente fechadas durante o período de avaliação. Além disso, segundo FAIAD et al (1997), os fungos associados às sementes podem deteriorá-las e ocasionar sua morte, considerando ainda que os testes de germinação e a formação de mudas podem ficar comprometidos por causa da ação de agentes patogênicos e saprófitas conduzidos pela semente.

Foi observado, durante o período da germinação, que as sementes contaminadas por fungos e bactérias não eram capazes de germinar. Esse resultado concorda com CORDER & BORGES JÚNIOR (1999), que ao germinar sementes de *Acácia mearnsii* em condições *in vitro* observou que a presença de fungos e bactérias junto às sementes foi o fator principal para a ausência de germinação. Porém, segundo KALIL FILHO et al (2000) a utilização de hipoclorito de sódio associado ao tempo de desinfestação na presença e ausência de luz foi considerado eficiente, obtendo 100% da capacidade de germinação, mesmo quando as sementes apresentavam 11,8% de contaminação por fungos e bactérias.

Analisando os dados do Quadro 3, pode-se observar que não ocorreram efeitos significativos com relação ao uso do hipoclorito de sódio e de diferentes tempos de embebição, para a presença de bactérias ou de fungos, aos 12, 18, 24 e 30 dias após a inoculação.

Quanto à posição de inoculação das sementes, observou-se efeito significativo em relação à presença e desenvolvimento de bactérias aos 18, 24 e 30 dias após inoculação, mostrando que as maiores médias de sementes infestadas ocorreram para as sementes colocadas na posição 1. No entanto, para a presença e desenvolvimento de fungos não se observou diferença significativa entre as posições testadas.

Ocorreram as interações significativas entre o tempo de embebição das sementes e a concentração de hipoclorito de sódio para a presença e desenvolvimento de bactérias aos 24 e 30 dias após a inoculação, enquanto que a interação entre a concentração de hipoclorito de sódio e posição de inoculação das sementes foi significativa apenas para bactérias aos 30 dias após a inoculação (Quadros 4 e 5), respectivamente.

Quadro 4. Médias de sementes de *Swietenia macrophylla* contaminadas por bactérias e fungos, aos 12, 18, 24 e 30 dias, de acordo com os tratamentos utilizados.

FONTE DE VARIAÇÃO		BACTÉRIAS				FUNGOS			
		12	18	24	30	12	18	24	30
<b>Hipoclorito</b>	0	0,8333	1,0833	1,2083	1,5833	0,4583	0,5417	0,5417	0,5417
	2,5	1,1667	1,6667	1,75	1,8333	0,1667	0,2083	0,2083	0,25
	5,0	0,9583	1,2917	1,7083	1,7917	0,4167	0,4167	0,4167	0,4167
<b>Tempo</b>	10	1,3889	1,6667	1,8333	2,0000	0,2778	0,3889	0,3889	0,4444
	20	0,8333	1,1111	1,2222	1,3333	0,4444	0,4444	0,4444	0,4444
	30	0,9444	1,4444	1,7222	1,8333	0,3333	0,3889	0,3889	0,3889
	40	0,7778	1,1667	1,4444	1,7778	0,3333	0,3333	0,3333	0,3333
<b>Posição<sup>1</sup></b>	1	1,1944	1,6111 a	1,8610 a	2,0278 a	0,3889	0,3889	0,3889	0,3889
	2	0,7778	1,0833 b	1,2500 b	1,4444 b	0,3056	0,3889	0,3889	0,4167
<b>MÉDIA GERAL</b>		0,9861	1,3472	1,5556	1,7361	0,3472	0,3889	0,3889	0,4028
<b>TESTE F</b>									
<b>Hipoclorito</b>	Linear	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Quadrático	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Tempo</b>	Linear	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Quadrático	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Cúbico	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Posição</b>		NS	*	*	*	NS	NS	NS	NS
<b>Tempo X Hipoclorito</b>		NS	NS	*	*	NS	NS	NS	NS
<b>Tempo X Posição</b>		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Hipocl. X Posição</b>		NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
<b>CV (%)</b>		24,65	22,81	21,13	18,79	20,36	20,63	20,63	21,58

\*\* (P < 0,01) \* (P < 0,05)

<sup>1</sup>a > b Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente pelo teste F (P < 0,05)

Observa-se que para a presença e desenvolvimento de bactérias aos 24 e aos 30 dias após a inoculação, os comportamentos das interações entre o tempo de embebição e a concentração de hipoclorito de sódio foram similares.

De acordo com os resultados, pode-se destacar que não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de embebição para as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, porém, quando se avaliou dentro de cada tempo de embebição, foi verificado efeito significativo do hipoclorito de sódio quando as sementes permaneceram embebidas por 20 e 30 minutos, com maiores médias ocorrendo para o tempo de 20 minutos de embebição em hipoclorito de sódio 2,5% e para aquelas mantidas por 30 minutos em hipoclorito de sódio a 5,0%.

Com relação à interação entre a concentração de hipoclorito de sódio e posição de inoculação das sementes observa-se que para a concentração de 2,5% de hipoclorito de sódio, a posição 1 apresentou a maior média infestação de bactérias aos 30 dias após a inoculação.

Quadro 5. Interação significativa para presença de bactérias entre hipoclorito de sódio e tempo de embebição para desinfestação em sementes de *Swietenia macrophylla*, aos 24 e 30 dias após a inoculação.

CARACTERÍSTICAS	BAC24				MÉDIA	BAC30				MÉDIAS	
	TEMPO					HIPOCL	TEMPO				
	10	20	30	40	10		20	30	40	HIPOCL	
HIPOCLORITO	0	2,0000 aA	1,1667 abA	0,8333 bA	0,8333 aA	<b>1,2083</b>	2,1667 aA	1,3333 abA	1,1667 aA	1,3333 aA	<b>1,5833</b>
	2,5	2,1667 aA	1,8333 aA	1,8333 abA	1,1667 aA	<b>1,7500</b>	2,1667 aA	2,0000 aA	1,8333 aA	1,6667 aA	<b>1,8333</b>
	5,0	1,3333 aA	0,6667 bA	2,5000 aA	2,3333 aA	<b>1,7083</b>	1,6667 aA	0,6667 bA	2,5000 aA	2,3333 aA	<b>1,7917</b>
<b>MÉDIA</b>	1,8333	1,2222	1,7222	1,4444		2,0000	1,3333	1,8333	1,7778		

Médias seguidas de letras diferentes (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (P< 0,05)

Quadro 6. Interação significativa para presença de bactérias entre hipoclorito de sódio e posição de semeadura em sementes de *Swietenia macrophylla*, aos 24 e 30 dias após a inoculação.

BACTÉRIA 30 DIAS	POSIÇÃO		MÉDIA HIPOCLORITO	
	1	2		
HIPOCLORITO	0	1,5833 aA	1,5833 aA	<b>1,5833</b>
	2,5	2,5833 aA	1,0833 aB	<b>1,8333</b>
	5,0	1,9167 aA	1,6667 aA	<b>1,7917</b>
<b>MÉDIA POSIÇÃO</b>	<b>2,0278</b>	<b>1,4444</b>		

Médias seguidas de letras diferentes (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (P< 0,05)

## 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais adotadas, os resultados permitem as seguintes conclusões:

- As sementes desinfestadas em 2,5 e 5,0 % hipoclorito de sódio por 30 e 20 minutos respectivamente na posição 2 (com a parte côncava voltada para baixo) tiveram maior porcentagem de germinação;
- Os tratamentos acima tiveram também índices baixos de contaminação por bactérias e fungos;
- A posição das sementes (com a parte côncava voltada para baixo) na inoculação no meio de cultura influenciou positivamente na eficiência de germinação.

## 5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AHUJA, M. R. & LIBBY, W. J. Clonal Forestry I. Springer-Verlag Berlin Heiderberg, 240p. 1993.
- ANDRADE, M.W., LUZ, J.M.Q., LACERDA, A.S. & MELO, P.R.A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**. Lavras –MG. v.24, n.1, p.174-180. 2000.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA/CNPF, 640p. 1994.
- COELHO, M. C. F; PINTO, J. E. B. P; MORAIS, A, R; CID, L. P. B & LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (BENTH.) BENTH) *in vitro* e *ex vitro*. **Revista Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v.1, n.1, p. 38-48. 2001.
- CORDER, M. P. M. & BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, v.9, n.2, p.1-7, 1999.

- FAIAD, M. G. R., SALOMÃO, A. N., CUNHA, R. & PADILHA, L. S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, v.19. n.1. p.14-17, 1997.
- KALIL FILHO, A. N., GRAÇA, M. E. C. & GRIGOLETTI JUNIOR, A. Micropropagação do Mogno (*Swietenia macrophylla*): Desinfestação e Germinação. **In:** VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS - FOREST 2000. **Anais...**Porto Seguro, 2000, p. Bio1013.
- KONDO, T. & OKAMURA, M. Tissue culture of big-leaf mahogany. **Forest Tree Breeding**. p.4-5. 1994.
- LAMB, F. B. **Mahogany of Tropical America: its ecology and Management**. University of Michigan Press, Ann Arbor, 220pp. 1966.
- LEMOS, O. F., LOPES, S. C., MENEZES, I. C., LAMEIRA, O. A., OLIVEIRA, M. S. P. O. Produção de plântulas para micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King) **In:** CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44. Águas de Lindóia – SP. Setembro 1998. **Resumos...**Águas de Lindóia, 1998. p.216.
- LOPES, S. C. **Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla*)**. Pelotas, RS, 2000. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – Rio Grande do Sul.
- MONDALA, C. A. Depth and position of sowing large-leaf Mahogany seeds. **Sylvatrop**, v.2, n.2, p.131-137. 1977.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

- NEIL, P. E. *Swietenia macrophylla* (mahogany) in Vanuatu. **Commonwealth Forest Review**, v.66, n.3, p.255-264. 1987.
- NOLTEE, A. C. *Swietenia mahogany* and *Swietenia macrophylla*. In: **Indonesian Forestry Abstracts** 1982. n. 735. Wageningen, Netherlands. 1982.
- PARRAGUIRRE, C. L. & CAMACHO, M. F. Velocidad de germinación de veintiuno especies forestales tropicales. **Revista Ciência Forestal em México**, v.17, n.72, p.3-26. 1992.
- PRADHAN, C., KAR, S., PATTNAIK, S. CHAND, P. K. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. through in vitro shoot proliferation from cotyledonary nodes. **Plant Cell Reports**, v.18, p.122-126. 1998.
- SKIRVIN, R. M. Fruit culture crops. In: CONGER, B. V. **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 51-139.
- TITO, B.V. & RODRÍGUEZ, M. Estudio silvicultural preliminar de la caoba en la zona de Tingo María. Documentos de Trabajo no.11. **Avances de la Silvicultura en la Amazonia Peruana**. República del Perú Instituto Nacional de Desarrollo, Peru. 1988.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. SAEG (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas – Versão 8.0). Viçosa, Minas Gerais: UFV. 142p. 2000 (Manual do Usuário).

## **CAPÍTULO II**

### **MORFOGÊNESE *in vitro* DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Madeiras nobres, como a do mogno vem sendo utilizadas à quase quinhentos anos. Estas foram levadas ao velho continente, inicialmente, pelos colonizadores espanhóis do século XVI, extraído das florestas do México, e posteriormente pelos ingleses desde a Jamaica, Honduras, Nicarágua e outros países da América Central. Assim, a partir do século XVIII, tornou-se a madeira favorita de decoração e mobiliário da corte europeia e das abastadas famílias dos Estados Unidos, sendo eleita uma das melhores madeiras para uma infinidade de aplicações duradouras, sofisticadas e nobres. A partir das décadas de 60 e 70, a procura pelo mogno intensificou-se no Brasil, devido à grande exportação da madeira principalmente para os Estados Unidos da América, responsável por 85% do total comercializado (GASPARETTO, 1998).

As técnicas de micropropagação são ferramentas desejáveis para a propagação de espécies de interesse econômico, pois possibilitam a produção em massa em condições controladas.

O problema ligado à cultura *in vitro* de espécies lenhosas segundo THOMAS & RAVINDRA (1997) é a ocorrência de compostos fenólicos na iniciação e estabelecimento da espécie em meio de cultura, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento e especialmente com a concentração de auxinas no tecido.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da concentração do picloram em explantes foliares, da combinação de BAP e ANA em segmentos de epicótilo e do BAP em explantes de hipocótilo originados de plântulas provenientes de sementes de *Swietenia macrophylla* germinadas *in vitro*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material experimental**

Foram utilizadas plântulas originadas de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) provenientes de Belém do Pará, doadas pela Empresa Tramontina Belém S.A.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, no período de agosto de 2001 a janeiro de 2002.

### **2.2. Metodologia**

#### **2.2.1. Obtenção de explantes**

As sementes foram germinadas *in vitro* e as plântulas com 5 a 10 dias de idade após a emissão das partes aéreas, foram divididas em três seções,

originando os explantes foliares, segmentos de epicótilo e o epicótilo invertido, conforme mostra a Figura 1.

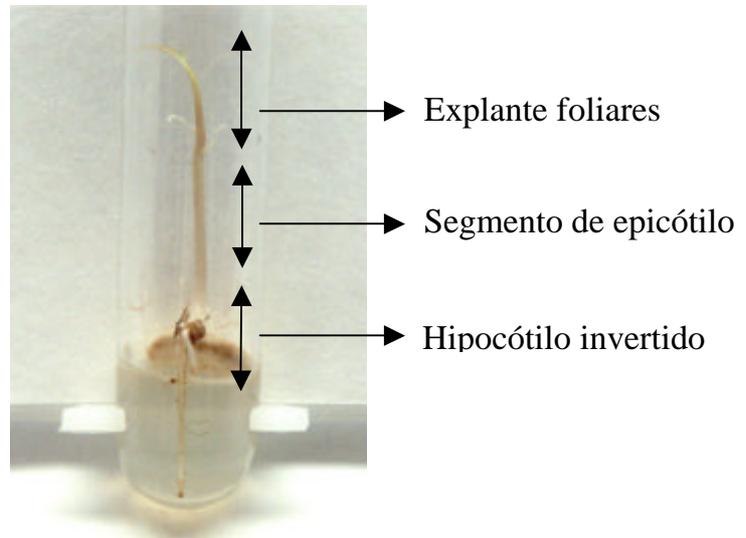


Figura 1. Plântula de mogno (*Swietenia macrophylla*), com as seções dos explantes foliares, segmento de epicótilo e o hipocótilo.

### **2.2.2. Morfogênese *in vitro***

Para o estudo da morfogênese *in vitro* foi utilizada a micropropagação por organogênese indireta composta pela fase de indução de calo para explantes foliares e a organogênese direta composta pela fase de regeneração de gemas para segmentos de epicótilo e hipocótilo.

### **2.2.3. Meio de cultura**

Os diferentes explantes foram submetidos a meios de cultura com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

#### 2.2.4. Explante foliar

O meio de cultura utilizado para induzir a calogênese a partir de explante foliar de mogno foi o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas MS, 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2 mg L<sup>-1</sup>, 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 400 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5% (p/v) ágar, e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) nas concentrações 0, 0,6, 1,2, 2,4 e 4,8 mg L<sup>-1</sup>.

#### 2.2.5. Segmento de epicótilo

Para indução da regeneração de brotação a partir de segmentos de epicótilo utilizou-se o meio de cultura básico MS, suplementado com vitaminas de MS, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3% de sacarose, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP (polivinilpirrolidona), 0,5% (p/v) ágar, variando apenas nas combinações de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético), como mostra o Quadro 1.

Quadro 1. Relação dos tratamentos propostos em função das combinações de ANA e BAP utilizadas para a regeneração de plantas de mogno (*Swietenia macrophylla*) a partir de segmentos de epicótilos.

Tratamentos	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
T01	0,00	0,00
T02	0,25	0,00
T03	0,50	0,00
T04	1,00	0,00
T05	0,00	0,50
T06	0,25	0,50
T07	0,50	0,50
T08	1,00	0,50
T09	0,00	1,00
T10	0,25	1,00
T11	0,50	1,00
T12	1,00	1,00
T13	0,00	2,00
T14	0,25	2,00
T15	0,50	2,00
T16	1,00	2,00
T17	0,00	4,00
T18	0,25	4,00
T19	0,50	4,00
T20	1,00	4,00

### **2.2.6. Epicótilo invertido**

Na indução da brotação a partir de hipocótilos, utilizou-se o mesmo meio de cultura básico empregados nos segmentos de epicótilo, acrescidos do regulador de crescimento BAP nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>.

### **2.2.7. Condução do experimento**

Para os explantes foliares e segmentos de epicótilo, o pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . Os meios foram vertidos após a autoclavagem, em placas de petri (90 x 15 mm) em um total de 25 ml de meio por placa.

Em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, as folhas de mogno foram cortadas e inoculadas nos diferentes meios de cultura, de modo que a parte abaxial ficou em contato com o meio. As placas foram vedadas com filme PVC e conduzidas para a sala de crescimento e mantidas sob temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  e fotoperíodo de 24 horas escuro. Em cada uma das quatro placas foram inoculados três explantes, totalizando-se 12 explantes por tratamento.

Os segmentos de epicótilo foram excisados em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas e inoculados nos diferentes meio de cultura, de modo que toda a extensão dos segmentos permaneceu em contato com o meio. Para indução da brotação, as placas com os explantes foram vedadas com filme PVC e conduzidas para a sala de crescimento, mantidas sob temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  e fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro. Em cada uma das quatro placas foram inoculados dez segmentos de epicótilo.

Para a utilização do explante do epicótilo invertido, o pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . O meio foi vertido em tubos de ensaio de 150 x 25 mm na proporção de aproximadamente 10 ml e, em seguida, levado para autoclavagem. Os meios de cultura foram estabelecidos em função da concentração do regulador de crescimento compondo cinco tratamentos com quatro repetições e quatro explantes por repetição.

Sob condições assépticas as raízes das plântulas foram desbastadas e o hipocótilo foi seccionado a cerca de 3 mm abaixo do nó cotiledonar. Em seguida, foram inoculados com a polaridade invertida nos meios de indução de brotação, e permaneceram nessa posição por aproximadamente 30 dias. Os tubos foram vedados com filme PVC e mantidos sob temperatura de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  e fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro.

## **2.2.8. Parâmetros avaliados**

### **2.2.8.1. Explantes foliares e segmentos de epicótilo**

Os explantes foliares e segmentos de epicótilo foram avaliados aos 20, 30 e 40 dias quanto ao número de explantes que formaram calos, intensidade de calejamento, textura do calo e oxidação no explante.

A intensidade de calejamento foi dividida em três classes: pouco, moderado e intenso. Com relação à textura dividiu-se em três tipos de calos: a) compactos, com células firmemente ligadas; b) semicompacto, com células moderadamente ligadas e c) friáveis, com células frouxamente ligadas.

A avaliação da oxidação dos explantes foliares foi feita por meio de visualização da presença ou ausência de manchas no explante, classificando-se em: nenhuma oxidação, pouca oxidação (com ocorrência nas bordas do limbo), ou totalmente oxidado.

### **2.2.8.2. Epicótilo invertido**

Aos 30 e 40 dias após a inoculação foram avaliadas a regeneração, indução da brotação e a presença de oxidação nos explantes, os quais foram classificados em oxidação no corte, oxidação em todo explante em contato com o meio, oxidação no corte e pintas pretas na parte do explante em contato com o meio, oxidação e pintas pretas da parte do explante em contato com o meio, oxidação e rompimento da epiderme da parte do explante em contato com o

meio, oxidação no corte com rompimento da epiderme e pintas pretas na parte explante em contato com o meio. Também foram avaliados o número e local de brotação no nó cotiledonar e nas gemas pré-existentes dos explantes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Avaliação de formação de calo em explantes foliares

Os resultados obtidos na formação de calo em explantes foliares de mogno (*Swietenia macrophylla*) quanto à intensidade de calejamento e textura dos calos podem ser vistos nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

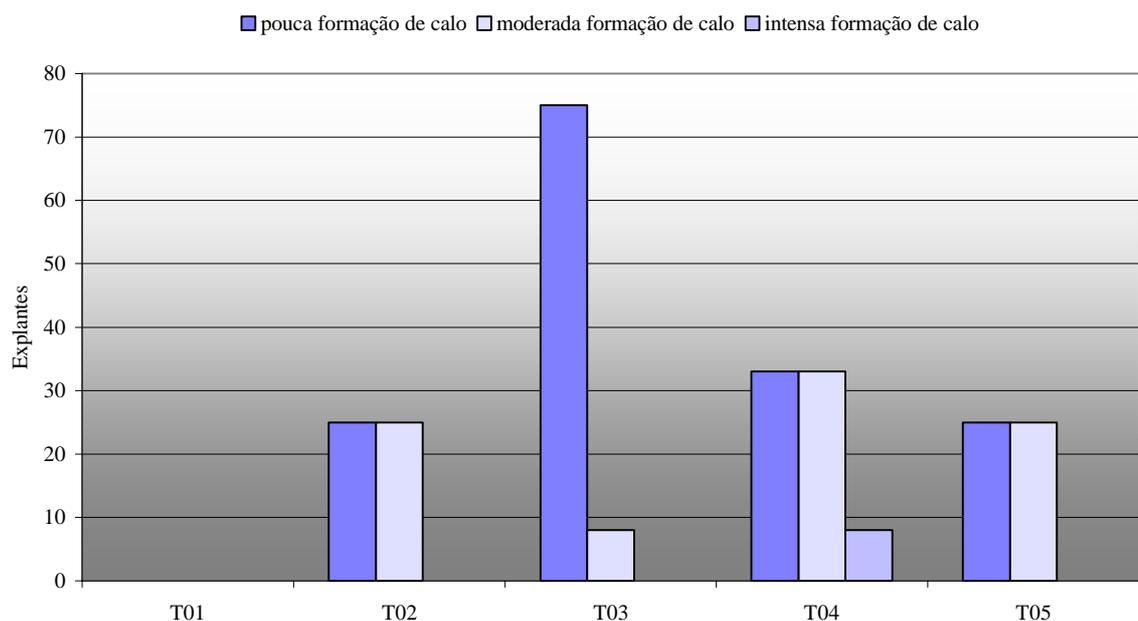


Figura 2. Média das porcentagens de explantes foliares de mogno (*Swietenia macrophylla*), de acordo com a intensidade de formação de calos em meio de cultura com diferentes concentrações do regulador de crescimento picloram (T1 – 0 mg L<sup>-1</sup>; T2 – 0,6 mg L<sup>-1</sup>; T3–1,2 mg L<sup>-1</sup>; T4 – 2,4 mg L<sup>-1</sup> e T5 – 4,8 mg L<sup>-1</sup> )

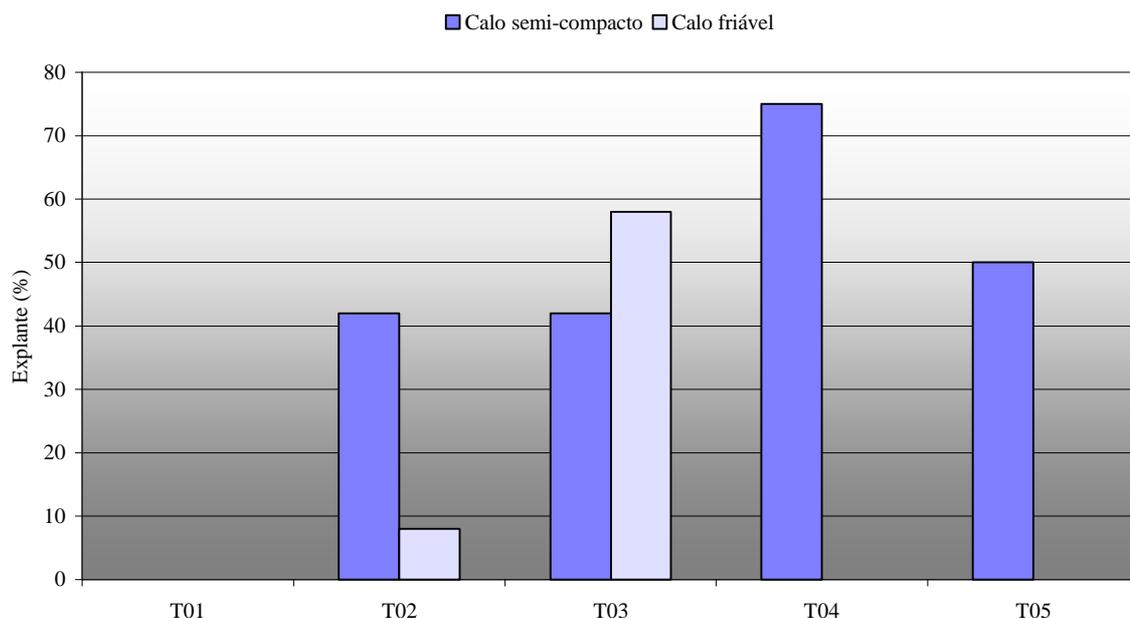


Figura 3. Médias das porcentagens de explantes foliares de mogno (*Swietenia macrophylla*), de acordo com a textura dos calos formados em meio de cultura com diferentes concentrações do regulador de crescimento picloram (T1 – 0 mg L<sup>-1</sup>; T2 – 0,6 mg L<sup>-1</sup>; T3 – 1,2 mg L<sup>-1</sup>; T4 – 2,4 mg L<sup>-1</sup> e T5 – 4,8 mg L<sup>-1</sup>)

Pode-se observar que a fase de indução de calo em explantes foliares foi atingida, porém não ocorreu a rediferenciação destes, por conseguinte não resultando em embriogênese ou organogênese.

Os explantes foliares responderam de forma diferenciada aos tratamentos com reguladores de crescimento, com os maiores números de calos ocorrendo para o tratamento T04, contendo 2,4 mg L<sup>-1</sup> de picloram.

Não houve resposta morfogênica dos explantes foliares ao meio sem adição do regulador de crescimento (T01), ocorrendo oxidação na maioria dos explantes utilizados.

Dentre os 50% dos explantes que responderam à concentração 0,6 mg L<sup>-1</sup> de picloram (T02), alguns apresentaram proliferação de células aquosas transparentes na nervura dos explantes e nos outros, houve a proliferação de células semi compactas de coloração branca ao longo das folhas.

Para a concentração de 1,2 mg L<sup>-1</sup> de picloram (T03), observaram-se respostas diferenciadas dos explantes, nas quais os calos produzidos apresentaram coloração creme escuro ao longo do explante, calos transparentes na nervura, calos compactos translúcidos ou de coloração branca.

Já para a concentração 2,4 mg L<sup>-1</sup> de picloram (T04) os explantes apresentaram calos compactos de coloração creme escuro ao longo do explante e algumas células semicompactas de coloração branca. Finalmente, na concentração 4,8 mg L<sup>-1</sup> de picloram (T05) os explantes apresentaram calos compactos de coloração bege no limbo e na nervura, dando um aspecto de rompimento da epiderme (Figura 4).

Os resultados obtidos neste trabalho foram similares aos encontrados por ALBARRÁN et al. (1997), uma vez que os autores obtiveram calos em discos foliares de mogno formados na nervura central, os quais responderam de forma diferenciada em função da concentração e da combinação de TDZ e 2,4-D.

No entanto, CASTILLO et al (1999) regeneraram plantas provenientes de calos e suspensão de células de *Valeriana edulis* ssp. *procera* via organogênese e embriogênese somática, utilizando picloram, 2,4-D, e ANA, sozinhos ou combinados com cinetina. Destacam ainda, que não observaram a formação de calos em explantes foliares, pecíolos e gemas apicais na presença e ausência do picloram ou quando combinado com cinetina.

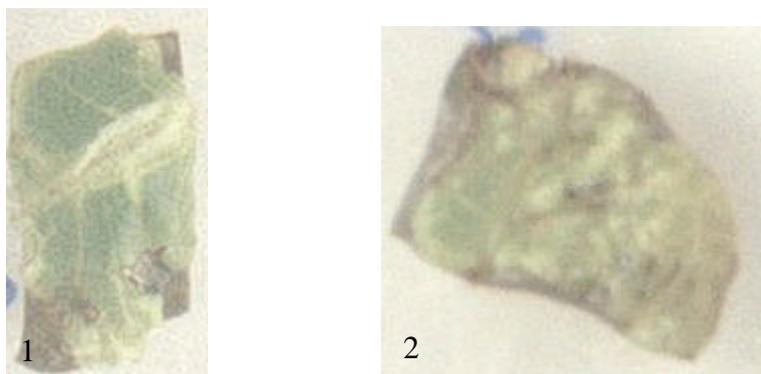


Figura 4. Calejamento em explantes foliares de mogno (*Swietenia macrophylla*), com proliferação de células na nervura do explante foliar com aspecto de rompimento da epiderme (1) e proliferação de células compactas no limbo de explante foliar (2), desenvolvidos em meio de cultura com 1,2 e 4,8 mg L<sup>-1</sup> de picloram, respectivamente.

Já para o clone do *Eucalyptus gunnii*, segundo HERVÉ et al (2001) a organogênese foi obtida com sucesso para diferentes órgãos, como folhas, internós e nós, utilizando meio de regeneração constituído de 0,04 µM de picloram e 2,25 µM de BAP.

Também MIZUHIRO et al (2001) observaram a indução de brotação a partir de calos de *Primula malacoides* e *Primula obconica* utilizando a combinação de 2 mg L<sup>-1</sup> de zeatina com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de picloram.

Segundo SILVA (1989), a constância na diversidade das respostas dos diferentes explantes em relação à produção de calo, pode estar associada às características próprias de cada tipo de explante e de sua origem.

### **3.2. Avaliação de regeneração em segmento de epicótilo**

#### **3.2.1. Brotação em segmentos de epicótilo**

Não foi observada a resposta quanto a organogênese direta nos explantes, porém ocorreu brotação de gemas adventícias pré-existentes nos segmentos de epicótilo (Figura 5). As diferenças de brotações ocorridas nos diferentes tratamentos podem ser explicadas pela presença das gemas nos explantes de forma aleatória e não devido à adição de reguladores de crescimento.

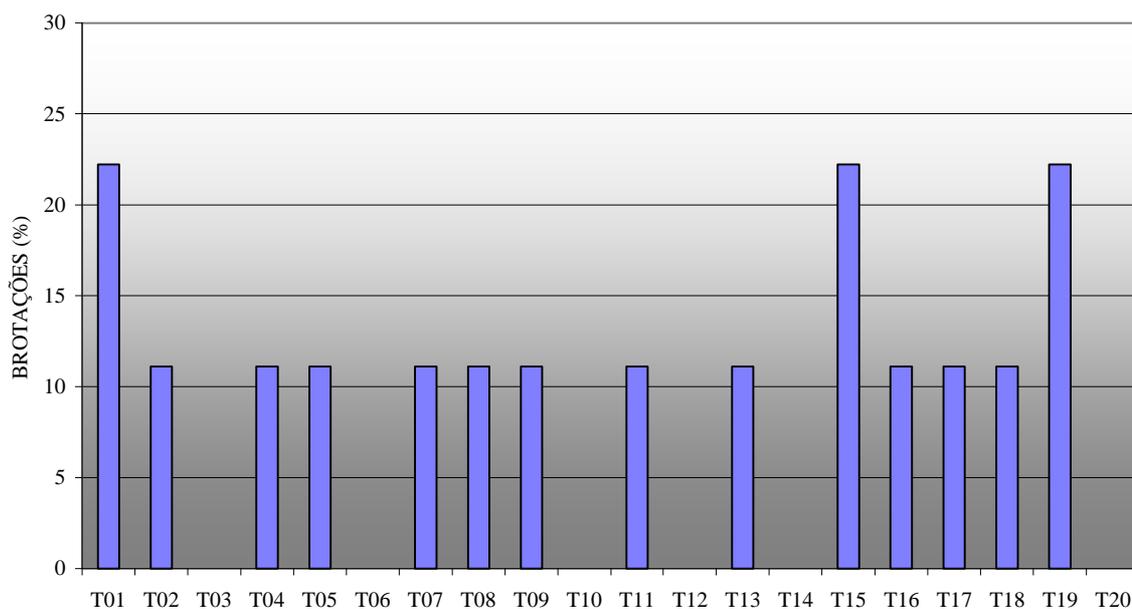


Figura 5. Médias das porcentagens de brotações de gemas adventícias preexistentes nos segmentos de epicótilo de plântulas de mogno (*Swietenia macrophylla*), desenvolvidas em meio de cultura básico MS acrescido de reguladores de crescimento ANA e BAP em diferentes combinações, aos 40 dias após a inoculação.

### 3.2.2. Intensidade e textura de calos formados

Observou-se aos 40 dias após a inoculação, a formação de calos nas extremidades dos segmentos de epicótilo desenvolvidos em meios de cultura contendo diferentes combinações entre os reguladores de crescimento BAP e ANA e os dados das porcentagens de explantes calejados podem ser observados na Figura 6.

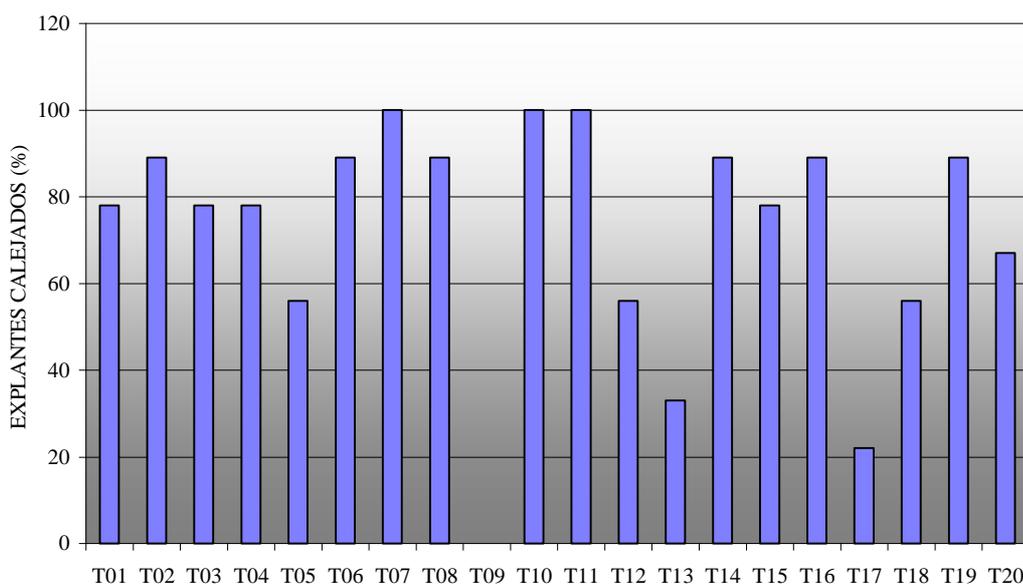


Figura 6. Médias das porcentagens de explantes calejados em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla*) desenvolvidos em meios de cultura contendo diferentes combinações entre os reguladores de crescimento BAP e ANA, aos 40 dias após a inoculação.

Com relação à formação dos calos nos segmentos de epicótilo pode-se observar que ocorreu calejamento em 100% dos explantes para os tratamentos T07, T10 e T11, com variação nas suas intensidades e textura de calejamento.

Nos tratamentos T01, T03 e T07 observou-se pouca formação de calos compactos de coloração verde nas extremidades dos explantes. No entanto, a textura dos calos nos explantes inoculados nos tratamentos T06, T08, T10, T11, T14, T15, T16, T18, T19 e T20 apresentaram em suas extremidades na maioria das vezes calos do tipo semcompacto de coloração creme. Já com relação à intensidade de calejamento, os explantes inoculados nos tratamentos T06, T08, T11, T15 e T20 apresentaram pouca formação deste tipo de calejamento, enquanto que nos tratamentos (T14, T19) e (T10, T16) apresentaram intensidade de calejamento do tipo moderada e alta, respectivamente. Contudo, para os explantes inoculados no tratamento T18 a intensidade de calejamento foi igual entre moderada e alta.

Na totalidade dos explantes inoculados no tratamento T09 não foi observada reação para combinação de regulador de crescimento e para os inoculados no T13 e T17 pouca formação de calos, os quais apresentou textura semicompacta de coloração creme.

A intensidade dos calos observados nos segmentos de epicótilo contendo calejamento, variou em função da combinação dos reguladores de crescimento (ANA e BAP), com alta formação de calo nos tratamentos T10 e T16 (Figura 7).

Para textura também foi observada variação em função dos tipos reguladores de crescimento (Figura 7). O tipo de textura para os calos semicompactos de coloração creme e compacto de coloração verde são melhores visualizados nas fotos da Figura 8.

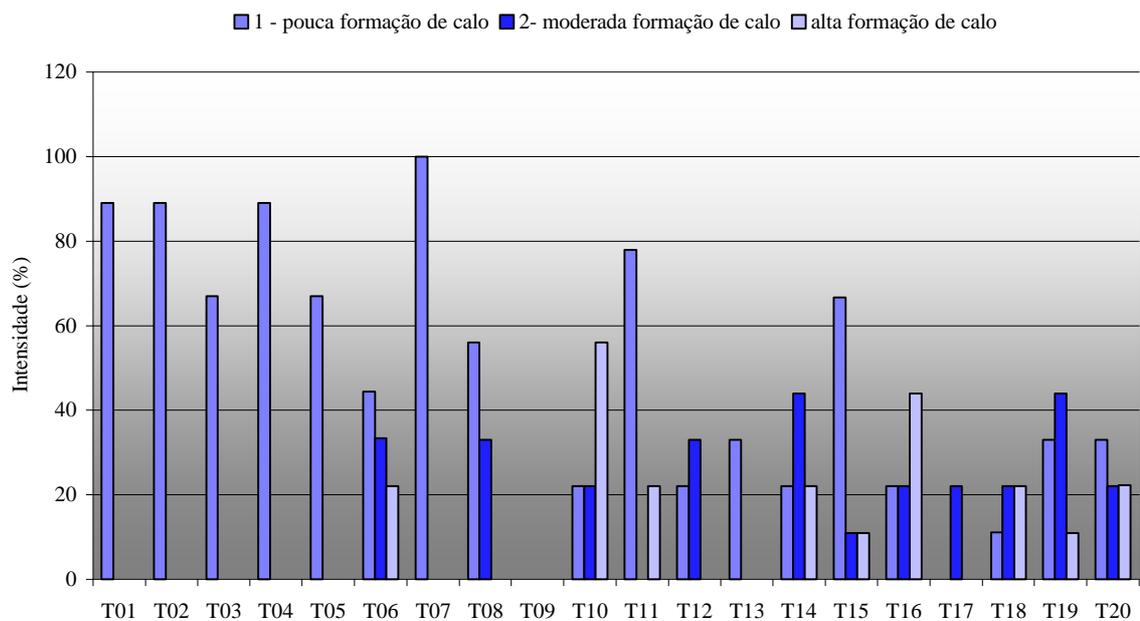


Figura 7. Média das porcentagens de explantes com calejamento (%) em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla*) desenvolvidos em meios de cultura contendo diferentes combinações entre os reguladores de crescimento BAP e ANA, aos 40 dias após a inoculação.

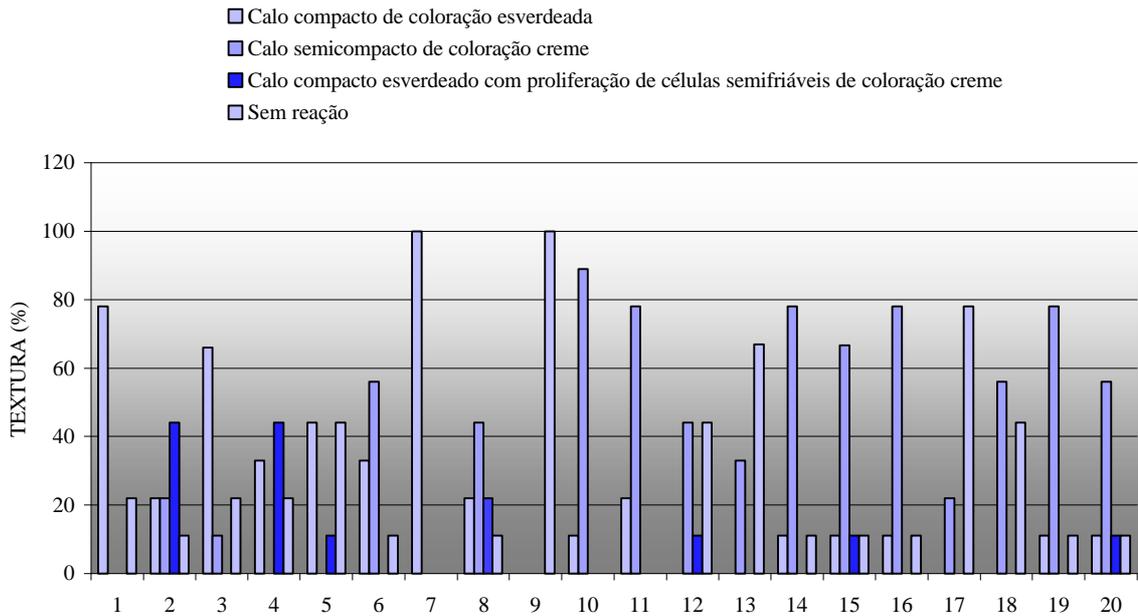


Figura 8. Médias de porcentagens de explantes em função do tipo de textura de calos (%) em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla*) desenvolvidos em meios de cultura contendo diferentes combinações entre os reguladores de crescimento BAP e ANA, aos 40 dias após a inoculação.

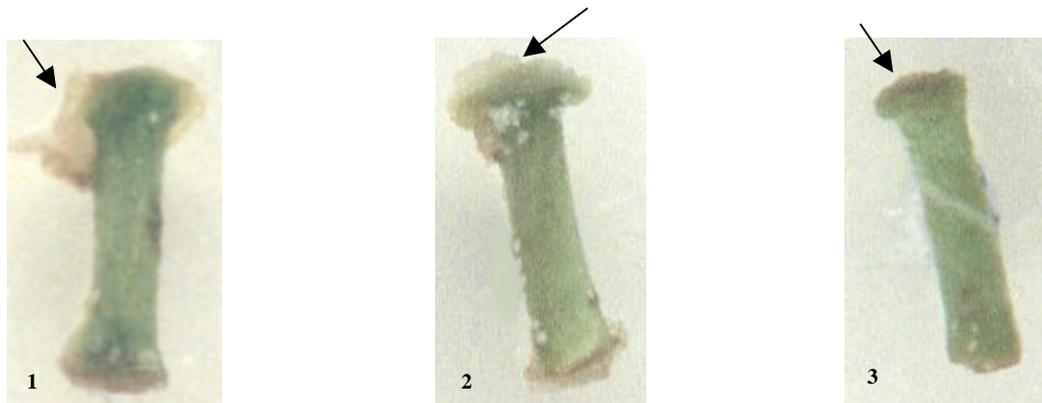


Figura 9. Detalhe da textura de calos em segmento de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla*) para os calos semicompactos de coloração creme (1 e 2) e compacto de coloração verde (3).

GAMBORG (1982) e GEORGE (1996) afirmam que é possível o estabelecimento de uma cultura de calo de praticamente qualquer planta e da maioria de suas partes, empregando um meio nutritivo simples, acrescido de auxinas e citocininas e, que a textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nas constituintes do meio nutritivo, produzindo calos macios, friáveis e úmidos, em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto secos e com células pequenas.

Segundo MARUYAMA et al (1989) foi possível à obtenção da indução de brotações múltiplas de segmentos nodais do mogno em meio BTM suplementado com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, o mesmo ocorrendo com ALBARRÁN et al (1997) que obtiveram o desenvolvimento de gemas axilares para o mogno em meio suplementado com BAP e AIA, ambos a  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ . E por fim, LEE et al. (1988) ao estudar a micropropagação de mogno com a utilização de segmentos nodais, em meio suplementado com BAP a  $0,1$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  obtiveram a indução de brotações múltiplas.

### **3.3. Avaliação de regeneração em epicótilo invertido**

Não foi observado o surgimento de brotações a partir de organogênese direta nos tecidos dos explantes de epicótilo invertido de mogno cultivados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações dos reguladores BAP. Porém, foi observada a indução e desenvolvimento de brotações provenientes dos nós cotiledonares (Figura 10) e em gemas pré-existentes.

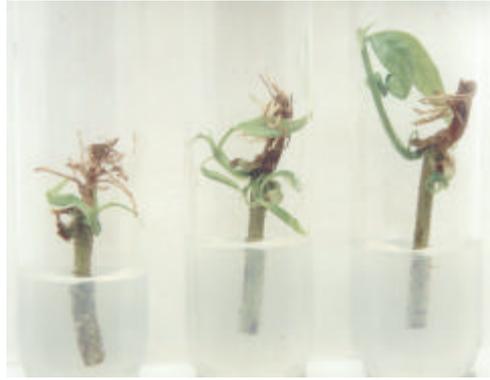


Figura 10. Indução e desenvolvimento de brotações provenientes dos nós cotiledonares em epicótilo invertido de mogno (*Swietenia macrophylla*) em meio MS sem regulador de crescimento.

Na Figura 11 observa-se a porcentagem de brotação originada de nós cotiledonares e gemas pré-existentes. Os explantes inoculados com polaridade invertida no tratamento sem a adição do regulador de crescimento (T01) foram os que apresentaram as maiores porcentagens da emissão de brotação, seguidos dos inoculados nos tratamentos T03 e T05, contendo as concentrações de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, respectivamente.

Na maioria das vezes houve brotação nos dois lados do nó cotiledonar e essas brotações apresentavam aspecto saudável, podendo-se inferir que os nós podem ser utilizados como fonte de explante para futuros programas de micropropagação.

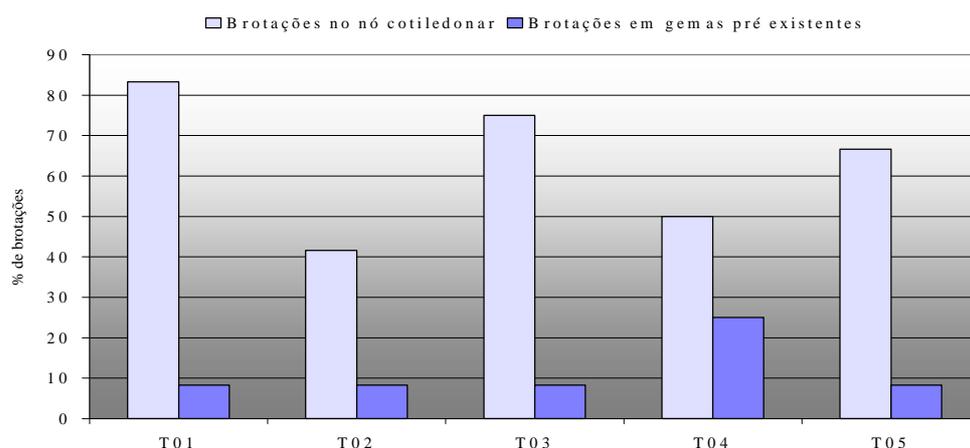


Figura 11. Média de porcentagens de brotações em nós cotiledonares e em gemas preexistentes provenientes de hipocótilo de mogno (*Swietenia macrophylla*) inoculados com a polaridade invertida em meio contendo diferentes concentrações de BAP (T1 –  $0 \text{ mg L}^{-1}$ ; T2 –  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ; T3 –  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; T4 –  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  e T5 –  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP).

Ao contrário dos resultados obtidos nesse trabalho, CARVALHO (2000) observou que o primeiro sinal visível de brotações adventícias na base dos explantes de epicótilo invertido de urucum (*Bixa orellana* L.) foi observado nos primeiros dez dias de cultivo. O autor observou uma grande expansão da extremidade distal dos hipocótilos em contato com os meios de cultura, originando-se posteriormente brotações diretamente a partir do tecido do explante (organogênese direta), não passando pela fase intermediária de calo.

A oxidação nos explantes de epicótilo invertido foi intensa, ocorrendo na parte do explante que estava em contato com o meio de cultura. Observou-se ainda, a oxidação no local do corte, oxidação total do explante na parte em contato com o meio de cultura, formação de pintas pretas na parte do explante em contato com o meio e rompimento da epiderme do explante em contato com o meio. As porcentagens de explantes oxidados estão representados na Figura 12.

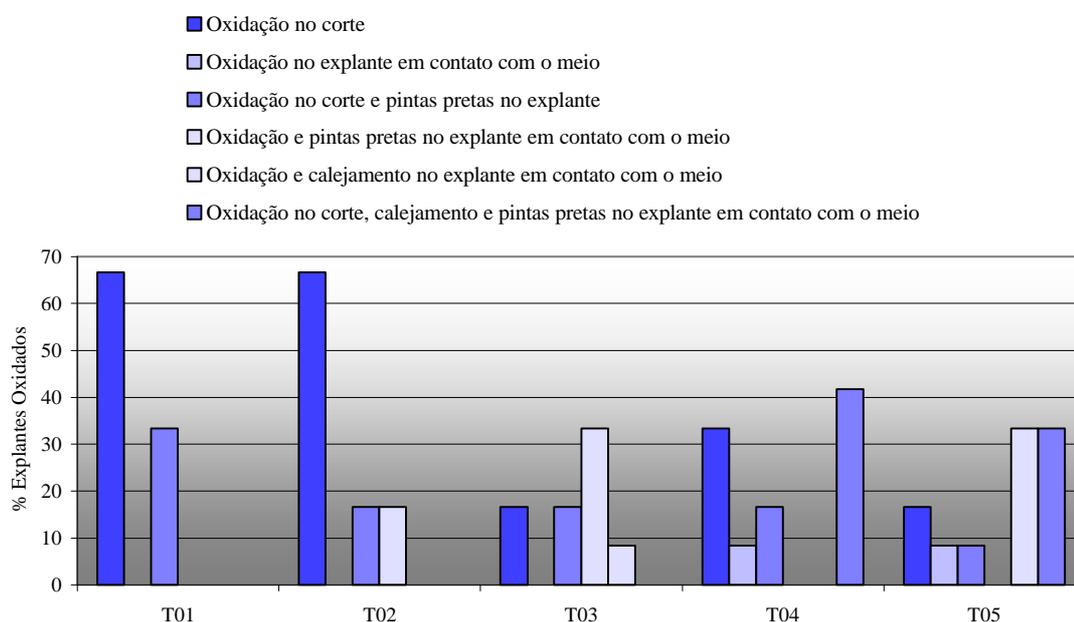


Figura 12. Oxidação dos explantes de epicótilo invertido de mogno (*Swietenia macrophylla*) inoculados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP, aos 40 dias após inoculação.

A oxidação dos explantes de epicótilo invertido pode ter ocorrido devido à grande quantidade de fenóis liberados pelo material vegetal no momento do corte e segundo ALBARRÁN et al (1997), as substâncias fenólicas são produzidas pelo metabolismo secundário da planta como uma resposta à ferida. A produção de fenóis por tecidos de plantas arbóreas é comum, causando escurecimento do meio de cultura, toxicidade ao explante podendo causar até a sua morte antes do seu estabelecimento no cultivo. Para minimizar esses efeitos o autor recomenda que seja adicionados agentes antioxidantes ao meio de cultura.

Segundo THOMAS & RAVINDRA (1997), a ocorrência de compostos fenólicos podem estar ligados a processos de regulação de crescimento, especialmente com as auxinas que dependendo da concentração endógena no tecido, resulta na indução desses compostos. Nas plantas lenhosas, principalmente, os polifenóis e produtos de oxidação, como suberina, lignina, cutina e calose, se acumulam em torno da superfície excisada, modificando a composição do meio de cultura e absorção dos metabólitos.

## 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais adotadas, os resultados permitem as seguintes conclusões:

- As concentrações dos reguladores para explantes foliares e segmentos de epicótilo foram eficientes para a formação de calos, mas não para o desenvolvimento em destes em órgãos.
- Explantes de epicótilo invertido apresentam oxidação ao serem inoculados em meio de cultura, tanto na ausência quanto na presença de reguladores de crescimento.
- A ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura foi mais eficiente para a formação de brotação em nó cotiledonar em explantes de epicótilo invertido, podendo estes ser usados como fonte de explantes.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M.W., LUZ, J.M.Q., LACERDA, A.S. & MELO, P.R.A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ALBARRÁN, J.G., VIELMA, M. & CONTRERAS, G.I. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla*: Estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Forestal Venezuela** v.41, n.2, p.111-118. 1997.
- CARVALHO, J. F. R. P. **Análise cariotípica e indução *in vitro* de poliploidia em urucum (*Bixa orellana* L.)** Viçosa, MG, 2000. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – Minas Gerais.
- CASTILLO, P., MARQUEZ, J., RUBLUO, A., HERNÁNDEZ, G. & LARA, M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. Procera via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.151. p 115-119, 2000.

- FRANCO, E. T. H., MANTOVANI, N. C., STEFANELLO, S., ANGONESI, L. G. & VESTENA, S. **Regeneração *in vitro* de espécies lenhosas**. Reunião Estadual de Biotecnologia Vegetal. Resumo. 1 e 2 de agosto 1996. Porto Alegre – RS.
- GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. In: WETTER, L. R. & CONSTABEL, F. **Culture methods**. Ottawa, Saskatoon, 1982. p. 1-9.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. Parte 2. Exegetics Limited, Reino Unido, 1996. 1361pp.
- GASPARETTO, O. **Síntese da situação do Mogno, a nível internacional**. Relatório Informativo nº 1-98-Português. Brasília – DF. 1998.
- HERVÉ, P., JAUNEAU, A., PAQUES, M., MARIEN, J.N., BOUDET, A.M. & TEULIERES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v.161. p.645-653, 2001.
- LEE, S.K., RAO, A.N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* through tissue culture. **Garden Bulletin Singapore**. v.41, p.11-18. 1988.
- MARUYAMA, E. & ISHII, K. Tissue culture studies on big-leaf mahogany *Swietenia macrophylla*. In: WORKSHOP BIO-REFOR, Brisbane, p.116-118, 1997.
- MARUYAMA, J.E., ISHII, K., SAITO, A. & MIGITA, K. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species. **FOREST PRODUCT RESEARCH INSTITUTE**. 1989.
- MIZUHIRO, M., KENICHI, Y., ITO, K., KADOWAKI, S., OHASHI, H. & MII, M. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplast of *Primula malacoides* and *Primula obconica*. **Plant Science**, v.160, p1221-1228, 2001.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum** v.15, p.473-497. 1962.

SILVA, A. A. **Morfogênese *in vitro* de diferentes tipos de explantes em progênies de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golfari.** Piracicaba, SP, 1989. 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade de São Paulo. Piracicaba – São Paulo.

THOMAS, P. & RAVINDRA, M. B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. **Journal of Horticultural Science**, v.72, n.5, p.713-722, 1997.

## CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que foi realizado o trabalho, pode-se concluir que:

- O tempo de desinfestação, a concentração de hipoclorito e a posição da semente influenciam a germinação das sementes de mogno;
- Os explantes foliares e segmentos de epicótilo responderam aos reguladores de crescimento quanto à calogênese;
- Os mesmos explantes não formaram órgãos a partir dos calos formados;
- As brotações provenientes de nós cotiledonares, inoculados em posição invertida no meio de cultura, podem ser utilizados como fontes de explantes;
- Ainda existe grande dificuldade no manuseio e estabelecimento do mogno in vitro devido à grande recalcitrância da espécie e escassa literatura;