

Propagação *in vitro* da farinha-seca

Ediana Rossi¹, Laudete Maria Sartoretto¹

Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de Xanxerê, Rua Dirceu Giordani, 696, Jardim Universitário, CEP 89820-000, Xanxerê, SC, Brasil

*Autor correspondente:
edifrirossi@hotmail.com

Termos para indexação:

Desinfestação
Cultura de tecidos
Micropropagação

Index terms:

Disinfestation
Tissue culture
Micropropagation

Histórico do artigo:

Recebido em 31/01/2012
Aprovado em 21/02/2013
Publicado em 31/03/2013

doi: 10.4336/2013.pfb.33.73.361

Resumo - O presente trabalho objetivou o estabelecimento de protocolos de desinfestação e germinação de sementes, bem como a indução da multibrotação *in vitro* da farinha-seca (*Albizia niopoides*) utilizando sementes e segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro*. Para avaliar a desinfestação e a germinação, foram testados os tempos de 0, 10, 20 e 30 minutos de imersão das sementes no hipoclorito de sódio a 8%. As avaliações das contaminações por fungos e/ou bactérias, assim como a germinação de sementes foram realizadas 20 dias após o início do teste. A indução da multibrotação foi realizada em meio de cultura WPM, suplementado com BAP, nas concentrações de 0,0; 0,5; 2,5 e 5,0 μM combinados com ANA na concentração de 0,5 μM . Avaliou-se o número de brotos e formação de calo. O teste F, não revelou diferença significativa, nas porcentagens de desinfestação e germinação, quanto ao tempo de imersão no hipoclorito de sódio. A porcentagem de desinfestação variou entre 93% a 97% e a de germinação de 67% a 73%. A maior taxa de regeneração de brotos axilares (2,6) foi obtida com a combinação de 5,0 μM de BAP + 0,5 μM de ANA, 30 dias após a inoculação. Observou-se também que sem a adição de reguladores de crescimento no meio WPM, plântulas de farinha-seca obtiveram significativas taxas de brotações (2,3 brotos).

Propagation of farinha-seca *in vitro*

Abstract - The present study aimed to establish protocols for disinfestation, germination of seeds, as well as the induction of *in vitro* multi sprouting of farinha-seca (*Albizia niopoides*) using seeds and nodal segments from seedlings germinated *in vitro*. To evaluate the disinfestations and germination intervals of 0,10, 20 and 30 minutes of soaking seeds in sodium hypochlorite 8% were tested. The evaluations of contamination by fungi and/or bacteria, as well as the germination of seeds were performed 20 days after the test started. The induction of multi sprouting was performed in WPM culture medium supplemented with BAP at concentration of 0.0, 0.5, 2.5 and 5.0 μM and ANA at a concentration of 0.5 μM . Number of sprouts and callus formation were evaluated. The F test did not revealed significant difference, in the percentages of disinfestation and germination, considering the intervals of soaking in sodium hypochlorite. The percentage of disinfestation ranged from 93% to 97% and germination of 67% to 73%. The highest rate of regeneration of axillary sprout (2.6) was obtained with the combination of 5.0 μM of BAP + ANA 0.5 μM , 30 days after inoculation. It was also noted that without the addition of growth regulators in WPM medium, seedlings of *Albizia niopoides* achieved good rates of sprouts (2.3 sprouts).

Introdução

A farinha-seca (*Albizia niopoides* (Benth) Burkart) é uma espécie florestal nativa do Brasil, que apresenta uso múltiplo, podendo ser empregada na arborização urbana, na recuperação de áreas degradadas e em sistemas agroflorestais. A propagação dessa espécie ocorre naturalmente via sexuada, porém o uso dessa técnica limita a produção comercial de mudas, uma vez que as sementes sofrem com o ataque de brocas, devendo-se eliminar as sementes atacadas e tratar as que serão armazenadas. Tais eventos tróficos resultam em mudas desuniformes e sujeitas à baixa qualidade, podendo afetar a uniformidade e produtividade dos povoamentos (Carvalho, 2008).

Albizia niopoides é uma das espécies nativas que está na lista de plantas ameaçadas de extinção no Paraná e no Mato Grosso do Sul, categoria rara (Carvalho, 2008). A germinação *in vitro* das espécies ameaçadas de extinção mantém a segregação e a variabilidade das espécies e disponibiliza plântulas livres de microrganismos que podem ser mantidas como matrizes e servem como fonte de explantes primários no processo de micropropagação. As plantas obtidas *in vitro*, constituem uma excelente fonte de explantes juvenis, totipotentes e livres de problemas fitossanitários (Thorpe et al., 1991; Assis & Teixeira, 1998).

Na área florestal, técnicas de propagação *in vitro*, como a micropropagação, estão sendo utilizadas com inúmeras aplicações práticas comprovadas (Xavier et al., 2009). A micropropagação possibilita a produção de um elevado número de plantas com genótipo selecionado, num curto espaço de tempo e ocupando uma área física bastante reduzida, se comparada com os métodos convencionais. Além disso, possibilita a obtenção de plantas com maior sanidade, vigor e tamanho padronizado, permitindo um manejo mais adequado do cultivo (Souza et al., 2006a). A micropropagação também pode ser utilizada na manutenção de germoplasmas, bem como, na reversão à juvenilidade de árvores-elite mediante multiplicações sucessivas. Outra vantagem técnica é que a mesma baseia-se na fidelidade genética e fenotípica do material propagado (Sá et al., 2000).

Segundo Xavier et al. (2009), conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida pela proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese e via embriogênese somática. Grattapaglia

& Machado (1998) ressaltaram que a proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada para a micropropagação de plantas lenhosas em larga escala, por ser um sistema com grande facilidade de controle, ser mais simples que os outros métodos e apresentar uma taxa de propagação relativamente rápida e alta fidelidade genética.

Para que a micropropagação tenha êxito, é necessário que as condições de cultivo estejam ajustadas. Fatores externos, químicos e físicos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais são fundamentais na cultura *in vitro* (Vasil, 1987). Dos fatores físicos pode-se destacar a luz e a temperatura como sendo os mais importantes (Souza et al., 2006b). Dos fatores externos e químicos destaca-se a utilização dos reguladores de crescimento como as citocininas, que estimulam a divisão celular (Hartmann et al., 2002) e são fundamentais na etapa de regeneração de calos e na brotação de gemas axilares e apicais (Barrueto Cid, 2000). Além das citocininas, as auxinas desempenham maiores funções no crescimento de órgãos, especialmente as raízes, utilizadas também na indução da divisão celular e na fase de multiplicação para favorecer o crescimento das culturas (Hartmann et al., 2002). Entre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que tem apresentado os melhores resultados no estabelecimento *in vitro* de explantes (Hu & Wang, 1983; Almeida et al., 1997) e entre as auxinas o ácido naftalenoacético (ANA) é uma das mais empregadas, em concentrações que variam conforme a espécie e/ou cultivar (Grattapaglia & Machado, 1998).

Os meios de cultura se baseiam nas exigências nutricionais das plantas, sendo adequados às necessidades de cada espécie e etapas *in vitro* (Santos-Serejo et al., 2006). Meios de cultura não adequados podem causar sintomas de deficiência mineral e até a morte dos propágulos (Monteiro et al., 2000). Os meios de cultura, segundo Torres et al. (1998), além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. No cultivo de espécies lenhosas o meio WPM é o que tem mostrado resultados mais satisfatórios. Grattapaglia & Machado (1998) atribuem esses resultados a composições mais diluídas em macronutrientes.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer um sistema de germinação e multiplicação *in vitro* da farinha-seca (*Albizia niopoides* (Benth) Burkart).

Material e métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente à Área de Ciências Exatas e da Terra da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus I Xanxerê.

Os estudos foram realizados com sementes de plantas matrizes de farinha-seca *Albizia niopoides* (Bentham) Burkart, coletadas em março de 2011 na cidade de Santa Maria, RS e armazenadas em geladeira até a instalação do experimento.

Características da espécie

Albizia niopoides (Fabaceae) conhecida popularmente como farinha-seca ocorre naturalmente nas áreas tropicais e subtropicais do Brasil, e em inúmeros outros países da América Latina. No grupo sucessional a espécie é classificada como pioneira a secundária inicial ou secundária tardia. É uma árvore decídua, normalmente atinge 35 de altura e 40-60 cm de DAP. Apresenta tronco reto, de seção cilíndrica. Apresenta ramificação dicotômica, o que constitui um elemento dendrológico tipificador em árvores de crescimento livre. A copa é aplanada e em forma de “V”. Geralmente, a copa apresenta folhagem verde-escura, agrupada nas terminações dos ramos. Sua casca é relativamente fina, com espessuras de até 11 mm. A casca externa é amarelada, lisa e pulverulenta. A casca interna é de coloração amarela-suave, a textura é arenosa, com odor desagradável (Carvalho, 2008).

As folhas são alternas espiraladas, bipinadas, medindo de 10 cm a 20 cm de comprimento, com 8 a 14 pares de pinas. As flores são branco-amareladas, com até 5 mm de comprimento. A inflorescência é uma panícula terminal ou lateral com numerosos capítulos brancos, medindo 1 cm de diâmetro. O fruto é uma vagem achatada de coloração castanho-clara, deiscente, com sementes duras. Mede de 5 a 10 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura, com 5 a 10 sementes cada. As sementes são ovaladas, de coloração castanha e medem 5 mm de comprimento (Carvalho, 2008).

Desinfestação das sementes e germinação *in vitro*

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a uma sequência de pré-tratamentos: a) lavagem com água destilada autoclavada e três gotas de Tween 20 (surfactante que auxilia na desinfestação de tecidos) durante 5 minutos sob agitação; b) três enxágues com água destilada autoclavada para remoção do Tween; c) imersão em hipoclorito de sódio 8% durante 0, 10, 20 e 30 minutos,

sendo T1, T2, T3 e T4, respectivamente; d) imersão em álcool etílico 70% por um minuto. Em seguida, as sementes foram submetidas a três enxágues com água destilada autoclavada, sendo secas em papel filtro autoclavado.

Após a desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo aproximadamente 15 mL do meio nutritivo WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd & McCown, 1980), acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 0,5 (p/v) de ágar e o pH ajustado antes da autoclavagem para $\pm 5,8$. As culturas foram mantidas em sala de germinação sob fotoperíodo de 16 horas e à temperatura de 25 °C (± 2 °C). As avaliações das contaminações, assim como da germinação das sementes ocorreram 20 dias após o início do teste, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram emergência do epicótilo e contaminadas as que apresentaram fungos e/ou bactérias.

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas. Os resultados obtidos foram analisados comparando-se a porcentagem de germinação e contaminação das sementes nos diferentes tempos de desinfestação testados.

As análises estatísticas foram realizadas através do software Assistat versão 7.6 beta. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e três repetições, com 10 tubos em cada repetição, totalizando 120 tubos no experimento. Em cada tubo foi inoculada apenas uma semente. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguidos do teste de separação de médias de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Indução de multibrotação em segmentos nodais

Para a indução de multibrotações *in vitro*, foram utilizados como explantes segmentos nodais isolados de plântulas de farinha-seca germinadas *in vitro*, com 20 dias de idade. O meio nutritivo utilizado foi o WPM suplementado com os reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) nas concentrações de 0,5; 2,5; 5,0 μ M e 0,5 μ M ANA (ácido naftaleno acético), com a adição de 3% (p/v) de sacarose, 0,5 (p/v) de ágar e o pH ajustado antes da autoclavagem para $\pm 5,8$. Em seguida, os meios foram distribuídos em tubos de ensaio e autoclavados durante 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas. As variáveis avaliadas foram: número de brotos (obtida através da contagem do número de brotações formadas ao final do período de cultivo) e formação de calo.

Após a inoculação em meios nutritivos, as culturas foram mantidas em salas de crescimento com temperatura de 25 °C (± 2 °C), umidade relativa do ar de 70% e fotoperíodo de 16 horas.

Resultados e discussão

Desinfestação e germinação

Não foi constatada diferença significativa dos tratamentos para a porcentagem de contaminação aos vinte dias (Tabela 1), que variou de 3 a 7%. Notou-se que mesmo sem o uso do hipoclorito de sódio (T1) a média de contaminação foi idêntica ao T3, quando as sementes foram expostas a 8% de hipoclorito por 20 minutos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho (1994) o qual verificou 65% de germinação de sementes de aroeira germinadas *in vitro* que não passaram por qualquer tratamento envolvendo hipoclorito de sódio.

Nascimento et al. (2007) trabalhando com sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenam), observaram que a maior porcentagem de contaminação (100%), ocorreu quando as sementes foram expostas a 0% de hipoclorito de sódio por 15 minutos (controle), diferente do observado neste trabalho. Já a menor porcentagem de contaminação nas sementes foi verificada quando estas foram expostas a concentração de 2,5% de hipoclorito durante 30 minutos, obtendo 60% de desinfestação.

Tabela 1. Porcentagem média de contaminação em sementes de *A. niopoides* germinadas *in vitro* em meio de cultivo WPM.

Tratamento	Hipoclorito de Sódio (%)	Tempo de imersão (minutos)	Média de contaminação
T1		0	7 a
T2	8%	10	5 a
T3		20	7 a
T4		30	3 a

valor p >0,05 - ns a 95% pelo teste Tuckey.

Couto et al. (2004) testando a desinfestação de sementes de *Swietenia macrophylla* King, obtiveram 89% de contaminação quando as sementes não foram submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio.

As sementes de *A. niopoides* foram capazes de germinar mesmo na presença de fungos e/ou bactérias, constatando que estes microorganismos não atuaram como fator limitante no processo de germinação.

Diferentemente do observado por Corder & Borges Júnior (1999), que ao germinarem sementes de *Acacia mearnsii* De Wild em condições *in vitro*, observaram que a presença de fungos e bactérias nas sementes foi o fator principal da ausência de germinação. Fato também notado por Couto et al. (2004) durante o período da germinação *Swietenia macrophylla* King, sendo que as sementes contaminadas por fungos e bactérias não foram capazes de germinar.

De modo geral, um dos maiores problemas da produção em escala comercial *in vitro*, é a contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias durante as etapas de propagação (Oda et al., 2003). Os microorganismos se estabelecem no meio de cultura ou material vegetal, competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o desenvolvimento do explante e, ocasionalmente, levando à perda do material vegetal em estudo (Sousa et al., 2007).

A germinação das sementes para todos os tratamentos teve início entre 3 a 5 dias após a inoculação, ocorrendo o rompimento do tegumento das sementes e a emissão da radícula. Pode-se observar que o uso dos agentes desinfestantes não promoveu efeito significativo sobre os valores de germinação aos 20 dias após a inoculação das sementes (Tabela 2). Tais resultados são inferiores aos obtidos por Kalil Filho et al. (2000), que conseguiram até 100% de germinação das sementes de mogno quando desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% por cinco minutos e germinadas *in vitro*, na ausência de luz.

Tabela 2. Porcentagem média de sementes de *A. niopoides* germinadas *in vitro* e, submetidas a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio 8%.

Tratamento	Tempo de imersão (minutos)	Média de Germinação	Coefficiente de Variação
T1	0	67 a	22,91
T2	10	70 a	28,57
T3	20	73 a	23,94
T4	30	73 a	15,75

valor p >0,05 - ns a 95% pelo teste Tuckey.

Diferentes tratamentos têm sido utilizados em espécies florestais visando minimizar os problemas de contaminação e maximizar a germinação das sementes. Corder & Borges Junior (1999), após desinfestarem sementes de *A. mearnsii* em água quente a 80 °C por três

minutos e tratá-las com hipoclorito de sódio comercial 10% por 10 minutos, após a imersão em álcool por 40 segundos, seguida de três lavagens com água destilada, obtiveram 100% de germinação e elevado índice de desinfestação. Couto et al. (2004) em trabalho com mogno (*S. macrophylla*) detectaram interação entre a concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de imersão, porém não ocorreu diferença significativa entre os resultados obtidos com álcool 70% e hipoclorito, resultado semelhante aos obtidos nesse trabalho.

Não se observou diferença significativa, pelo teste F, nas porcentagens de desinfestação e germinação, quanto ao tempo de imersão no hipoclorito de sódio. A porcentagem de desinfestação variou entre 93% a 97% e a de germinação de 67% a 73%. O tempo médio de germinação foi similar entre os diferentes tratamentos. Esses resultados mostram que a lavagem das sementes com água destilada autoclavada e três gotas de Tween e a imersão das mesmas em solução de álcool etílico 70% por 1 minuto foram suficientes para uma efetiva desinfestação, visando o estabelecimento *in vitro* de plântulas de farinha seca.

Indução de multibrotações em segmentos nodais

Na indução da multibrotação (Figura 1), a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura WPM, mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). Observou-se que o T1 (controle) com 0,0 μM de ANA e BAP e o T4 com 0,5 μM de ANA e 5,0 μM de BAP, apresentaram resultados semelhantes para a variável número de brotos, com formação média de 2,3 e 2,6 brotos, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudo sobre a regeneração *in vitro* de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel, onde Mantovani et al. (2001) verificaram que a multiplicação da espécie foi favorecida

quando a cultura se desenvolveu em meio WPM sem adição de reguladores de crescimento, proporcionando maior estímulo no desenvolvimento de gemas axilares.

A formação de brotos obtidos nos explantes inoculados em meio desprovido de fitorreguladores indica que não há necessidade de uma fonte exógena de citocininas para estimular a brotação em segmentos nodais da farinha-seca, embora tenha sido verificado que a adição de BAP ao meio favoreceu a formação de brotos nos segmentos nodais. Porém, isso não quer dizer que aumentando a concentração de BAP no meio, aumentará também o número de brotos.

Pode-se observar na Tabela 3 a resposta dos explantes às concentrações dos reguladores de crescimento, com uma média de 2,1 brotos por explantes. A produção de brotos, no presente trabalho, foi relativamente maior que a verificada por Flores et al. (2009), que registrou uma média de 1,06 brotos. Nascimento et al. (2008), em segmentos caulinares de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L^{-1}), não verificaram diferenças significativas para o número médio de brotos, número de gemas, comprimento de brotações e número de folhas.

É interessante ressaltar que os níveis de reguladores de crescimento adequados para proporcionar a maior quantidade de brotos emitidos variam de acordo com o genótipo da planta, e que devem ser determinadas caso a caso. Conforme reportado por Cordeiro et al. (2004) em trabalhos com *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá) alcançaram um efeito benéfico com o uso de BAP na concentração de 3 mg L^{-1} na proliferação de brotos em segmentos nodais, alcançando uma média no comprimento dos brotos de 2,0 e 2,5 cm por explante. Por outro lado, Schottz (2003) obteve em média até 7,22 brotos por explante em segmento caulinar nodal de *Swietenia macrophylla* quando utilizou 10 mg L^{-1} de BAP.

Tabela 3. Porcentagem média de número de brotos obtida em segmentos nodais de *Albizia niopoides* germinadas *in vitro* e submetidos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

Tratamento	Concentração ANA (μM)	Concentração BAP (μM)	Média N° de Brotos	Coefficiente de Variação
T1	0,0	0,0	2,3 ab	11,10
T2	0,5	0,5	1,4 c	12,37
T3	0,5	2,5	1,9 bc	8,18
T4	0,5	5,0	2,6 a	16,76

* Médias com mesmas letras não diferem significativamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ** Valor $p > 0,01$ -significativo ao nível de 1% de probabilidade

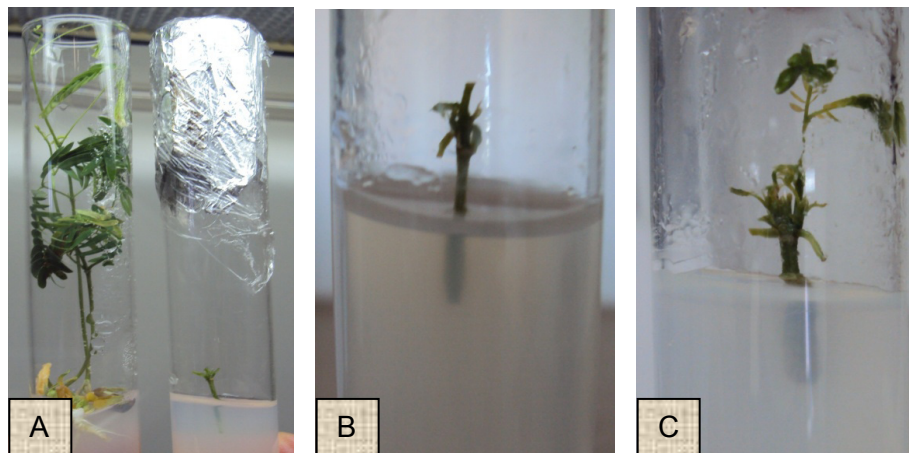


Figura 1. A) Plântulas de *Albizia niopoides* germinadas *in vitro*; B) Segmentos nodais inoculados em meio de cultura WPM contendo reguladores de crescimento no início da inoculação; C) Brotos obtidos 30 dias após a inoculação.

Em explantes de *Acacia mearnsii*, Borges Júnior et al. (2004), verificaram maior taxa de multiplicação de gemas com 3,5 brotos por explante, utilizando 2 mg L^{-1} de BAP. No entanto, Rosa (2009), testando o efeito de concentrações de BAP (0 a $10 \text{ } \mu\text{M}$) e ANA (0,0 e $2,2 \text{ } \mu\text{M}$) em meio MS sobre os segmentos nodais de *Mimosa scabrella* Benthham, provenientes de cultivo *in vitro*, registrou que a utilização de ANA não apresentou efeito nos explantes, e, na ausência de BAP, obteve a maior produção de gemas por explante.

Em segmentos de nó cotiledonar de plantas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) germinadas *in vitro*, Amaral (2006), testou concentrações de 0 e $5 \text{ } \mu\text{M}$ da citocinina BAP,

registrando uma produção média de 2,7 brotos por explante.

No presente estudo, a formação de calos foi notada em todos os tratamentos, não sendo observada contaminação em nenhum dos tratamentos. Porém, o T2 além de proporcionar a menor quantidade de brotos, média de 1,4 por explante, apresentou a maior formação de calos. Observou-se em alguns explantes que a formação de calos não dificultou o processo de crescimento dos brotos, como pode ser analisado na Figura 2. A formação de calos em 95% dos explantes (nós cotiledonares), foi igualmente notada por Amaral (2006) em calos de *Cedrela fissilis*, cultivados em meio WPM com adição de $5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP.

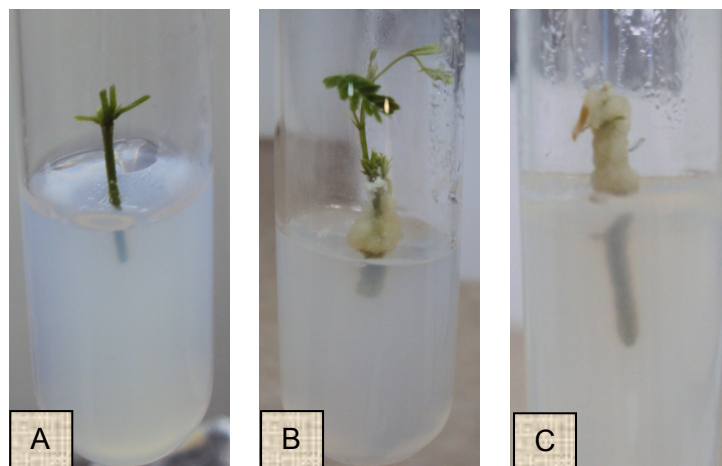


Figura 2. A) Explante de *Albizia niopoides* sem formação de calo; (B) Explante de *Albizia niopoides* com formação de calos e brotos; (C) Explante de *Albizia niopoides* apresentando apenas formação de calos.

Segmentos nodais são explantes muito utilizados no cultivo *in vitro*. Esses segmentos apresentaram eficiência no estabelecimento de diversas espécies lenhosas, tais como café (Ribeiro et al., 2002), porta-enxertos do gênero *Prunus* (Silveira et al., 2001), macieira (*Malus domestica*) (Erig et al., 2004) e louro-pardo (*Cordia trichotoma*) (Mantovani et al., 2001). Para a farinha-seca, acredita-se que o baixo número de brotos obtidos ocorreu devido ao pouco tempo de exposição dos explantes aos agentes indutores do crescimento, necessários para o processo de diferenciação celular.

Conclusões

O uso do hipoclorito de sódio não mostrou diferença significativa para os parâmetros desinfestação e germinação. Desta forma recomenda-se apenas a lavagem das sementes com água destilada autoclavada e três gotas de Tween e a imersão das mesmas em solução de álcool etílico 70% por 1 minuto.

Plântulas de farinha-seca apresentaram taxas de multiplicação semelhantes em meio de cultura WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA e sem a adição dos mesmos, sendo necessário para conhecimento da concentração e tempos ótimos a realização de novos testes com maiores concentrações e maior tempo de exposição dos explantes aos agentes indutores de crescimento.

Referências

- ALMEIDA, W. A. B. de; MATOS, A. P. de; SOUZA, A. da S. Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 425, p. 235-250, 1997.
- AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1. p. 261-296.
- BARRUETO CID, L. P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L. P. (Org.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.
- BORGES JUNIOR, N.; SOBOSA, R. C.; MARTINS-CORDER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 4, jul./ago. 2004.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Colombo: EMBRAPA-CNPq, 1994. 640 p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 3.
- CORDEIRO, I. M. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 118-124, 2004.
- CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.
- COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da. Multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Galaxy: meio de cultura e agentes solidificantes alternativos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 297-302, jul./set. 2004.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopuri na (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, v. 11, n. 3, 2009.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v. 1. p. 183-260.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p. 177-227.
- KALIL FILHO, A. N.; GRAÇA, M. E. C.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. A micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSISTEMAS FLORESTAIS, 6., 2000. Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: [s.n.], 2000. p. Bio1013.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, v.30, p.421-427, 1980.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.
- MONTEIRO, A. C. B. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **In vitro Cellular e Developmental Biology-plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000.

- NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde**, Mossoró, v. 3, n. 2, p. 20-26, abr./jun. 2008.
- NASCIMENTO, P. K. V. do; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rígida* Benth (Brenam). **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.
- ODA, M. L.; FARIA, R. T. de; FONSECA, I. C. B.; SILVA, G. L. Avaliação da fitotoxicidade de fungicidas e germicida na propagação *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae) para o controle de microorganismos. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 273-276, jul./dez. 2003.
- RIBEIRO, L. S.; PASQUAL, M.; MARCIEL, A. L. R.; ARANTES, E. S.; CHAGAS, E. A. Fontes de nitrogênio na micropropagação de *Coffea arabica*. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 3, n. 1-2, p. 07-112, 2002.
- ROSA, F. C. da. Superação da dormência de sementes e cultivo *in vitro* de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.). 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- SÁ, M. E. L.; CANÇADO, G. M. A.; SOUZA, C. M. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 116-123, 2000.
- SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPME, 2006. p. 79-98.
- SCHOTTZ, E. S. **Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de material juvenil**. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; FORTES, G. R. L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A. C.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 3, p. 488-492, dez. 2001.
- SOUZA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crista*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 405-407, jul. 2007.
- SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F.V.D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPME, 2006a. p. 11-37.
- SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPME, 2006b. p. 38-52.
- THORPE, T. A.; HARRI, I. S.; KUMAR, P. P. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Application of micropropagation to forestry**: micropropagation technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. 987 p.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPB, 1998. v. 2. 854 p.
- VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grape crops. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 1987.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Minas Gerais: UFV, 2009. 272 p.