



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE SEMENTES E
CULTIVO *IN VITRO* DE BRACATINGA (*Mimosa
scabrella* Benth.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felippe Correa da Rosa

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE SEMENTES E CULTIVO
IN VITRO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.)**

por

Felippe Correa da Rosa

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

Orientadora: Prof^a. Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE SEMENTES E CULTIVO *IN VITRO*
DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.)**

Elaborada por
Felippe Correa da Rosa

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª Lia Rejane Silveira Reiniger, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Leonardo Ferreira Dutra, Dr. (CPACT)

Profª Nerinéia Dalfollo Ribeiro, Dra. (UFSM)

Profª Marlove Fátima Brião Muniz, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 29 de maio de 2009.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pelo apoio, orientação, ensinamentos, atenção, carinho e amor. Saiba que, para mim, sua presença foi fundamental na minha formação profissional e também pessoal, obrigado pela amizade.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS, por oportunizar o desenvolvimento de meu trabalho de mestrado.

À minha mãe Hilda, pelo apoio, amor incondicional e, sobretudo, pelo incentivo, sempre indispensável.

Aos colegas de Laboratório, Aline Curti, Caroline Bevilacqua, Diego Golle, Daniel Waldow, Enrique Leon, Joana Hanauer e Gisele Santiago, pela ajuda e amizade.

A todos os amigos verdadeiros que contribuíram com sua amizade, dando apoio e força em todas as horas, Luiz Antonio Albernard e sua família, Salman, Tiago Perlin, Rael Lissner, Glademir Morin, Francisco Gnocato, Carlos Evandro Ritter, Michele Heberle, Kenia Quadros, Mauricio Bandinelli e Fabio Hamann. Agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para mais esta vitória em minha vida: a obtenção do título de mestre.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE SEMENTES E CULTIVO *IN VITRO* DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.)

AUTOR: Felipe Correa da Rosa
ORIENTADORA: Lia Rejane Silveira Reiniger
Local e data da defesa: Santa Maria, 29 de maio de 2009

A bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) é uma árvore nativa do Brasil, ocorrendo desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. A madeira é usada para energia como lenha e carvão. A madeira roliça é também muito procurada para escoras na construção civil. Além disso, como é uma espécie pioneira agressiva, seu plantio é recomendado para proteger e recuperar solos fracos e erodidos. Os bracatingais brasileiros apresentam reduzida produtividade, que pode ser melhorada pela introdução de árvores com maior diâmetro. O aumento do diâmetro pode ser obtido pela manipulação dos níveis de hormônios vegetais nas células durante a micropropagação. Com a finalidade de contribuir para esse propósito, neste trabalho, o objetivo geral foi estudar a regeneração *in vitro* da bracatinga por meio de explantes isolados a partir de sementes germinadas. A superação de dormência das sementes foi testada por escarificação mecânica, imersão em água à temperatura ambiente por 24 h, imersão em água quente (80°C) por 5 minutos. A desinfestação consistiu da imersão em hipoclorito de sódio a 2% por 5, 10 ou 15 minutos e inoculação das sementes em meio $\frac{1}{2}$ MS ou MS (Murashige & Skoog). Foi avaliada também a germinação sob diferentes concentrações do meio MS ($\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e integral). Segmentos nodais cultivados em meio MS acrescido de benzilaminopurina - BAP (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 μ M) e de ácido alfa naftalenoacético - ANA (0 e 2,2 μ M), na ausência ou presença de estreptomicina, foram avaliados quanto à multiplicação *in vitro*. A escarificação mecânica foi o método de superação de dormência que proporcionou a maior porcentagem de germinação. A desinfestação com hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos resultou em mais de 60% de sementes germinadas. A máxima germinação *in vitro* de sementes de bracatinga foi observada na diluição $\frac{1}{4}$ MS. Na ausência de BAP, houve maior formação de gemas (1,39) e de folhas (1,62) por explante. Não houve contaminação por bactérias na ausência de BAP, independente da presença de estreptomicina. Não foram formados calos na ausência de estreptomicina e de BAP. Com o aumento das concentrações de BAP no meio de cultura, houve uma redução na oxidação fenólica. Para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de bracatinga, não é necessário adicionar ANA e BAP.

Palavras-chave: cultura de tecidos, germinação *in vitro*, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

Master's Thesis
Master's Degree Program in Forestry Engineering
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brazil

BREAKING OF DORMANCY IN SEEDS AND *IN VITRO* CULTURE OF BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.)

AUTHOR: Felipe Correa da Rosa
ADVISER: Lia Rejane Silveira Reiniger
Place and Date of Defense: Santa Maria, RS, Brazil, May 29th, 2009

Mimosa scabrella Benth. is a tree from Brazil, growing from Minas Gerais to Rio Grande do Sul. Its wood is used for energy like firewood and coal. The round wood is also very sought for props in civil architecture. Furthermore, since it is an aggressive pioneering species, its plantation is recommended for protection and recovering of weak and erosive soil. The Brazilian plantations of *Mimosa scabrella* Benth. present reduced productivity, which can be improved by the introduction of trees with larger diameter. The increase of the diameter can be obtained by the manipulation of the levels of vegetable hormones in the cells during the micropropagation. Aiming at contributing for this purpose, the overall goal of this work was to study the *Mimosa scabrella* Benth. *in vitro* regeneration considering isolated explants from germinated seeds. The surpassing of the seeds' quiescence was tested by mechanical scarification, immersion in water at environment temperature during 24 h, immersion in hot water (80°C) during 5 minutes. The disinfestation consisted of the immersion of sodium hypochlorite to 2% during 5, 10 or 15 minutes and inoculation of the seeds in ½ MS or MS agent (Murashige & Skoog). Nodal segments cultivated in MS agent added of benzylaminopurine - BAP (0; 2,5; 5; 7,5 and 10 µM) and of alpha-acetynaphtalene acid - ANA (0 and 2,2 µM), in the absence or in the presence of estreptomycine, were evaluated according to their multiplication *in vitro*. The mechanical scarification was the quiescence surpassing method which provided the largest germination percentage. The disinfestation with sodium hypochlorite at 2% during 10 minutes resulted in more than 60% of germinated seeds. The biggest *in vitro* germination of *Mimosa scabrella* Benth.'s seeds was observed at ¼ MS dilution. In the absence of BAP, there was more formation of buds (1,39) and of leaves (1,62) per explant. There was not any contamination by bacteria in the absence of BAP, independently of the presence of estreptomycine. Calli were not formed in the absence of estreptomycine and of BAP. With the increase of BAP concentrations at the medium of culture, there was a reduction in the fenolic oxidation. For the *in vitro* multiplication of nodal segments of *Mimosa scabrella* Benth., it is not necessary to add either ANA or BAP.

Keywords: tissue culture, *in vitro* germination, growth regulators.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias de germinação (%) aos sete dias, plântulas anormais (%), sementes duras (%) e sementes mortas (%) de bracatinga aos 14 dias, após os tratamentos para a superação da dormência. Santa Maria, RS, 2008.....	29
Tabela 2 – Médias de germinação (%) de sementes de bracatinga cultivadas <i>in vitro</i> submetidas a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2%. Santa Maria, RS, 2008	31
Tabela 3 – Médias de altura (cm) de plântulas de bracatinga, aos 14 dias de cultivo <i>in vitro</i> , após diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2% e cultivo em meio MS ou ½ MS. Santa Maria, RS, 2008.....	32
Tabela 4 – Germinação (%) de sementes de bracatinga em diferentes concentrações de sais de meio MS básico. Santa Maria, RS, 2008	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Número médio de gemas formadas em culturas <i>in vitro</i> de bracinga inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP após 35 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008	35
FIGURA 2 – Porcentagem de calos em culturas <i>in vitro</i> de bracinga inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP (μM) e na ausência de ANA aos 35 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008	36
FIGURA 3 – Número médio de folhas em culturas <i>in vitro</i> de bracinga inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP aos 35 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008	37
FIGURA 4 – Porcentagem de contaminação bacteriana em culturas <i>in vitro</i> de bracinga inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP aos 35 dias do cultivo inicial. Santa Maria, RS, 2008.....	39
FIGURA 5 – Porcentagem de oxidação fenólica em segmentos nodais de bracinga, em multiplicação no meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008	41
FIGURA 6 – Porcentagem de contaminação bacteriana em segmentos nodais de bracinga, em multiplicação no meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.....	42
FIGURA 7 – Porcentagem de calos em segmentos nodais de bracinga, em multiplicação no meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 A espécie <i>Mimosa scabrella</i> Benth.....	12
2.2 Biotecnologia vegetal.....	13
2.3 Micropropagação.....	14
2.4 Superação de dormência em sementes.....	15
2.5 Desinfestação superficial de sementes.....	16
2.6 Desinfecção de explantes em meio de cultura.....	17
2.7 Fases e fatores inerentes à micropropagação.....	18
2.7.1 Seleção de explante.....	19
2.7.2 Meios de cultura.....	19
2.7.3 Reguladores de crescimento.....	20
2.7.4 Contaminação <i>in vitro</i> de plantas.....	21
2.7.5 Oxidação fenólica.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Seleção de métodos para a superação da dormência em sementes de bracatinga.....	23
3.2 Desinfestação superficial e germinação <i>in vitro</i> de sementes de bracatinga.....	24
3.2.1 Efeito do tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio associado à concentração de sais do meio MS na germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	24
3.2.2 Efeito da concentração de sais do meio MS sobre a germinação <i>in vitro</i> de sementes de bracatinga.....	25
3.3 Influência de benzilaminopurina (BAP) e do ácido alfa naftaleno acético (ANA) na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de bracatinga.....	26
3.4 Efeito de BAP e de estreptomicina sobre a multiplicação <i>in vitro</i> de bracatinga.....	26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Métodos para a superação da dormência em sementes de bracatinga..	28
4.2 Desinfestação superficial e germinação <i>in vitro</i> de sementes de bracatinga.....	30
4.2.1 Efeito do tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio associado à concentração de sais do meio MS na germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	30
4.2.2 Efeito da concentração de sais do meio MS sobre a germinação <i>in vitro</i> de sementes de bracatinga.....	33
4.3 Influência de benzilaminopurina (BAP) e do ácido alfa naftalenoacético (ANA) na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de bracatinga.....	34
4.4 Efeito de BAP e de estreptomicina sobre a multiplicação <i>in vitro</i> de bracatinga.....	37
5 CONCLUSÕES.....	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A bracatinga, *Mimosa scabrella* Bentham, é uma árvore da família *Leguminosae*, nativa do Brasil, ocorrendo desde Minas Gerais até a borda da Serra Geral, no Rio Grande do Sul, caracterizando o planalto sul-brasileiro e a Floresta Ombrófila Mista (MARCHIORI, 2007).

O mais importante uso da madeira de bracatinga é para energia como lenha e, secundariamente, como carvão. A madeira roliça é muito procurada, também, para escoras na construção civil. A espécie é também empregada na recuperação de áreas degradadas como forragem, compensados, laminados, aglomerados, moirões, dentre outros (CARPANEZZI, 1988).

A bracatinga é cultivada, hoje, no sul do Brasil, segundo dois sistemas tradicionais desenvolvidos pelos agricultores e dependentes da demanda por lenha, baseados na regeneração natural por sementes ou induzido pela queima de restos da colheita florestal anterior a partir da segunda rotação, prática insustentável com relação à perda de nutrientes, conservação do solo e poluição ambiental.

A possibilidade de melhoria técnica na condução dos povoamentos de bracatinga e aumento da produtividade de mudas para usos alternativos da madeira como, por exemplo, a madeira serrada, implicaria em um manejo para a produção de árvores com maior diâmetro (WEBER, 2007).

Espécies florestais nativas como a bracatinga, que tem interesse do ponto de vista econômico, para lenha e móveis, e ecológico, para a recuperação de áreas degradadas e presença em sistemas agroflorestais, apresentam problemas de propagação sustentável e melhoramento genético incipiente, o que justifica a realização de estudos e investimentos. Além disso, o estabelecimento de um protocolo de regeneração de plantas de bracatinga reproduzível e de alta eficiência é um pré-requisito para viabilizar a transferência de genes, uma vez que o emprego de técnicas de melhoramento requer que as células ou tecidos transformados sejam regenerados *in vitro*.

Neste trabalho, o objetivo geral foi estudar a regeneração *in vitro* da bracatinga por meio de explantes isolados a partir de plântulas. Os objetivos específicos consistiram em:

- selecionar um método de superação de dormência das sementes;
- determinar uma metodologia de desinfestação superficial de sementes para o controle de fungos e de bactérias na germinação *in vitro*;
- estabelecer a concentração de sais do meio MS básico mais adequada para a germinação *in vitro*;
- avaliar o efeito de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro*; e
- investigar a influência da estreptomicina sobre a contaminação bacteriana na multiplicação *in vitro* de bracatinga.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A espécie *Mimosa scabrella* Benth.

A bracatinga é uma árvore perenifólia, com 4 a 18 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), podendo atingir até 29 m de altura e 50 cm ou mais de DAP, na idade adulta. Possui tronco reto, alto e esbelto quando agrupada em maciços, ou curto e ramificado quando isolada. A copa é alta arredondada e estratificada. A casca tem espessura de até 20 mm, sendo áspera, verrugosa e com separação em fendas na orientação longitudinal. As folhas são compostas, paripinadas, alternas, com três a nove pares de pinas oblongo-lineares (CARVALHO, 2003).

As flores são amarelas, pequenas, agrupadas em capítulos pedunculados, axilares ou terminais, em racemos curtos. O fruto é craspédio articulado deiscente, séssil, pubescente com indumento estrelado, com até 48 mm de comprimento por 9 mm de largura, com duas a quatro sementes. A semente se apresenta de forma irregular, de coloração escura, quase preta, com 6 mm de comprimento e 3 mm de largura (CARVALHO, 2003).

A madeira, moderadamente pesada, possui densidade de $0,67 \text{ g cm}^{-3}$, sendo dura ao corte, com média resistência e baixa durabilidade natural. A madeira serrada é empregada na construção civil, para acabamentos internos e, principalmente, para compensados e caixotaria. É ótima para lenha e carvão (LORENZI, 2002).

A árvore é bastante ornamental, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo, principalmente na arborização de ruas estreitas. Como planta pioneira de rápido crescimento, pode ser utilizada em plantios de áreas degradadas (LORENZI, 2002).

A bracatinga é uma espécie essencialmente heliófila, não sendo totalmente tolerante às geadas. Em bracatingais com menos de um ano, após geadas severas, podem ser observadas plantas total ou parcialmente queimadas, além de plantas

não afetadas. No sul do Brasil, plantios feitos por mudas até março são afetados por geadas precoces (CARVALHO, 2003).

2.2 Biotecnologia vegetal

A biotecnologia compreende a utilização de técnicas de biologia molecular e celular visando à manipulação de organismos superiores, microorganismos e produtos de sua atividade metabólica, para aplicação na agricultura, alimentação, saúde e processos industriais (SANTOS, 2003).

Dentre as ferramentas biotecnológicas, a cultura de tecidos é uma das que tem gerado mais resultados práticos e de impacto para o melhoramento vegetal. De maneira simplificada, a cultura de tecidos é a retirada de qualquer parte da planta (célula, tecido ou órgão), colocando-a em um meio nutritivo que lhe dê condições de regenerar outra planta ou estrutura (SANTOS, 2003).

A origem da biotecnologia vegetal, ou seja, a aplicação de uma gama de técnicas para manipular o potencial genético das plantas, pode ser encontrada a partir de 1850 a 1860 pelos trabalhos dos fisiologistas alemães Julius von Sachs e Wilhelm Knop. Esses pesquisadores demonstraram que muitos tipos de plantas podiam crescer na água com o uso de poucos elementos essenciais tais como sais em solução aquosa. Com isso, as plantas podiam crescer sem fixar suas raízes no solo, técnica conhecida agora como hidroponia. O uso da hidroponia e a necessidade de se entender a nutrição mineral das plantas estimularam os estudos sobre crescimento de partes excisadas como pedaços isolados de ápices caulinares, folhas e embriões, em diversos estágios de desenvolvimento, em solução nutritiva (RAVEN, 2007).

A teoria da totipotência formulada por Schleiden & Schwann, em 1838, um dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro*, afirma que toda célula contém o potencial necessário para originar uma planta completa sob condições de estímulo (CID, 2008). O fisiólogo Haberlandt, baseado nesse princípio, foi o pioneiro na tentativa de cultivar células de tecidos somáticos de diferentes plantas em solução nutritiva. Contudo, o referido pesquisador não alcançou sucesso em seus estudos

pelo fato de não conhecer reguladores de crescimento, que ainda não haviam sido descobertos (SANTOS, 2003).

Os avanços mais expressivos na cultura de tecidos vegetais ocorreram a partir de 1930, tendo sido o trabalho de White, em 1934, um marco nesta área, conseguindo a manutenção do crescimento de ápices radiculares de tomate em meio líquido por tempo indeterminado (SANTOS, 2003).

O sucesso da regeneração *in vitro* para o melhoramento genético de espécies florestais baseia-se na totipotência e no controle da morfogênese, sendo influenciada por vários fatores como tipo de explante, componentes nutricionais, reguladores de crescimento e condições de incubação. Assim, o desenvolvimento de um protocolo de regeneração, associado à escolha de genótipos mais responsivos *in vitro*, constituem fatores determinantes no sucesso da técnica em espécies arbóreas (SARTORETTO et al., 2008).

2.3 Micropropagação

A micropropagação compreende várias técnicas que utilizam o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura como forma de propagação vegetativa (OLIVEIRA, 2007).

A micropropagação tem sido realizada com sucesso em espécies hortícolas (batata e cenoura), ornamentais (orquídea, crisântemo e cravos), frutíferas (abacaxi, morango e banana), medicinais (ipeca e espinheira santa) e, mais recentemente, em espécies florestais (pinus e eucalipto) (CARVALHO et al., 2006).

Para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas se torne viável comercialmente e possa ser usada em associação com os métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia e mergulhia), é necessário reduzir os custos de produção, que se devem, em grande parte, às perdas causadas pela contaminação *in vitro*; por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas; à baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*; à necessidade de mão-de-obra especializada para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas e, sobretudo, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura

controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas (CARVALHO et al., 2006).

As abordagens biotecnológicas em leguminosas têm sido registradas na literatura por meio dos trabalhos com espécies como: *Acacia mangium* Willd. (MONTEUUIS, 2004), *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret (VILLARREAL; ROJAS, 1996), *Acacia seyal* Del. (AL-WASEL, 2000), *Parapiptadenia rigida* Benthham (NASCIMENTO et al., 2007) e *Acacia mearnsii* De wild. (BORGES JÚNIOR et al., 2004).

2.4 Superação de dormência em sementes

A dormência devido à impermeabilidade do tegumento ocorre principalmente em sementes de leguminosas, em muitas espécies florestais e em algumas espécies das famílias Malvaceae, Liliaceae e Solanaceae (BIANCHETTI, 1981). A bracatinga apresenta dormência nas sementes devido à impermeabilidade do tegumento à água. Em um lote de sementes recém-colhidas de bracatinga, ocorrem sementes impermeáveis e permeáveis, sendo estas últimas em menor proporção (aproximadamente 20%). Esse fato está diretamente ligado ao estágio de maturação da semente na ocasião da coleta. A semente deve ser coletada quando atingir o ponto ótimo de maturação (CARPANEZZI et al., 1988).

Entre as leguminosas florestais, Caesalpinoidea e Mimosoidea são as que apresentam maior número de espécies com sementes dormentes. Em muitas espécies dessas subfamílias, o tegumento impermeável impede a absorção de água e impõe uma restrição mecânica ao crescimento do embrião, que retarda o processo germinativo. Em um levantamento de espécies arbóreas da flora brasileira, foi observada uma predominância (aproximadamente 63%) de dormência exógena em relação aos demais tipos, tendendo a ocorrer mais nas espécies pioneiras, citando como exemplo similar à bracatinga, sementes de *Senna multijuga* (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Portanto, são sugeridos alguns métodos para superar esse tipo de dormência tais como o uso de água quente, escarificação com ácido sulfúrico concentrado, escarificação mecânica, entre outros (BIANCHETTI, 1981).

2.5 Desinfestação superficial de sementes

Diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes e promoverem a formação de plântulas anormais, dentre eles, a presença de microorganismos, especialmente fungos e bactérias (BORGES JUNIOR et al., 2004). Sendo assim, para que a plântula formada a partir da germinação *in vitro* possa ser fonte de explantes, os métodos de desinfestação devem ser eficientes, proporcionando o controle de microorganismos. O etanol e os compostos à base de cloro são as substâncias com ação germicida mais utilizada neste processo. O hipoclorito de sódio ou de cálcio vem mostrando grande eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, assim como a utilização de fungicidas e bactericidas, promovendo aumento no total de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas. A concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição das sementes a esses compostos podem variar de acordo com a espécie, sendo necessária, então, a sua adequação de acordo com a sensibilidade do tecido (NASCIMENTO et al., 2007).

O etanol geralmente é utilizado na concentração de 70%, com tempo de exposição dos tecidos, em geral, variando de dezenas de segundos a alguns minutos. Já as concentrações mais comuns de cloro ativo vão de 0,5% a 2%, com tempo de exposição de 10 a 20 minutos. Concentrações elevadas podem ser utilizadas, como por exemplo, o uso de 5% até 10% de hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes de *Commiphora leptophloeos*, onde foi obtida redução da incidência fúngica, mas com consequente morte das sementes devido às altas concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas (FAIAD et al., 1997).

O processo de desinfestação é realizado em câmara de fluxo laminar, utilizando vidraria previamente esterilizada. Após a desinfestação, são efetuadas lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada, geralmente três, para a remoção dos resíduos dos agentes desinfestantes (WENDLING et al., 2006).

Para a desinfestação de segmentos nodais de *Cordia trichotoma* em câmara de fluxo laminar, foi efetuada a imersão desses explantes em soluções de álcool a 70%, durante 30 segundos, e de hipoclorito de sódio a 10%, durante 5 minutos e,

posteriormente, enxágüe em água destilada e autoclavada (MANTOVANI, 2001). Já a desinfestação de sementes dessa espécie para a obtenção de plântulas em condições assépticas foi realizada pela imersão em solução contendo 2% ou 5% de hipoclorito de sódio durante 0, 5, 10, 15 ou 20 minutos (FICK et al., 2007).

No caso da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All), os frutos-semente tiveram sua superfície limpa com água acrescida de algumas gotas de detergente e foram desinfestados pela imersão em solução de álcool etílico a 70% por 30 segundos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e tríplice lavagem em água destilada (ANDRADE et al., 2000).

A desinfestação de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King), para germinação *in vitro*, foi efetuada pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos (SCHOTTZ et al., 2007). Sementes de *Acacia seyal* Del. foram descontaminadas pela imersão em solução de etanol a 70%, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial na concentração de 20% por 20 minutos (AL-WASEL, 2000). No protocolo descrito por Almeida et al. (2008), a desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunni* foi mais eficiente quando efetuada pela imersão em hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,5% e 2,0%.

2.6 Desinfecção de explantes em meio de cultura

As técnicas de cultivo *in vitro* constituem um método eficiente para a multiplicação de plantas selecionadas em larga escala e em curto espaço de tempo. No entanto, a micropropagação de espécies lenhosas depara-se com alguns problemas, entre eles, os das contaminações das culturas por diferentes microrganismos, com os consequentes prejuízos econômicos. Parte dessas contaminações resulta de falhas no sistema de desinfestação ou na manipulação do material vegetal, mas estudos recentes têm demonstrado que muitas têm origem endógena, devido a microrganismos que residem no interior dos tecidos dos explantes (FERRADOR; MARQUES, 2008).

De um modo geral, as contaminações por bactérias endógenas não se manifestam nas fases iniciais da cultura de tecidos, sendo apenas detectadas ao fim de algum tempo. Quando o meio de cultura apresenta condições apropriadas para o

seu desenvolvimento, as bactérias começam a competir pelos nutrientes, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento das culturas. A deterioração dos explantes está relacionada à produção de produtos fitotóxicos pelas bactérias, como os ácidos acético e láctico, determinados reguladores de crescimento e antibióticos. Embora os microorganismos endógenos fossem descritos já no século XIX, apenas nas últimas décadas têm recebido a atenção devida. O reconhecimento da sua capacidade em estabelecer relações de comensalismo e de mutualismo com o hospedeiro tornou-os valiosos para agricultura como agentes de controle biológico e de promoção do crescimento (FERRADOR; MARQUES, 2004).

A desinfecção dos explantes para eliminação de contaminantes bacterianos endógenos é feita pelo uso de antibióticos adicionados ao meio de cultura. Contudo, mesmo com a utilização de antibióticos, é difícil a eliminação completa de certas bactérias, uma vez que os produtos mais usados na cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida (SANTOS, 2003).

A contaminação por fungos ocorre em virtude da deficiência na manipulação durante o subcultivo e da presença de esporos no ambiente onde o subcultivo é realizado. Para minimizar essas contaminações, é recomendável cultivar a planta, da qual serão coletados os explantes, em condições parcialmente controladas (CARVALHO et al., 2006).

2.7 Fases e fatores inerentes à micropropagação

O primeiro estágio da micropropagação consiste na seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo sob condições assépticas. O segundo estágio é a multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio, e o terceiro estágio é a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.7.1 Seleção de explante

Os tipos de explantes mais utilizados para o estabelecimento *in vitro* são os segmentos nodais de explantes juvenis, as gemas axilares obtidas por rejuvenescimento de plantas adultas, os embriões zigóticos e as plântulas obtidas de sementes de origem sexual (OLMOS et al., 2004).

Segmentos nodais são adequados como fonte de explantes para o processo de preservação de germoplasma *in vitro*. Tal material apresenta as seguintes vantagens: adaptação às condições *in vitro*; alto grau de valor genético da planta matriz; maior garantia de regeneração quando comparados a meristemas ou calos e economia de espaço para o armazenamento (CARVALHO; VIDAL, 2006).

Árvores têm sido tradicionalmente propagadas por sementes. Ainda que a propagação *in vitro*, a partir de sementes e plântulas, seja viável e tenha certas aplicações, principalmente para aumentar o rendimento em espécies que têm baixa produção de sementes, a aplicação mais importante desta técnica é a possibilidade de produção em massa de árvores elites adultas, em um programa de melhoramento (MANTELL, 1994).

Similarmente, brotações laterais mais distantes do ramo central apresentam menores graus de juvenilidade do que aquelas mais próximas, pela hipótese de que a maturação tem uma base celular e é em função de divisões celulares cumulativas (XAVIER et al., 2007).

2.7.2 Meios de cultura

Os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas, quanto aos nutrientes, para seu crescimento e desenvolvimento, com algumas modificações para atender às necessidades específicas das condições *in vitro* (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

A composição dos meios de cultura utilizados para a micropropagação varia de acordo com as espécies e as diferentes etapas do processo, ou seja, estabelecimento, multiplicação e enraizamento. De maneira geral, utiliza-se um meio básico composto de macro e de micronutrientes, vitaminas, inositol, fonte de açúcar (geralmente sacarose) e, eventualmente, outros compostos orgânicos (como aminoácidos), que são suplementados com reguladores de crescimento. A formulação MS de Murashige & Skoog (1962) é a mais utilizada para diferentes processos de cultura de tecidos, incluindo a micropropagação.

Para espécies lenhosas, o meio MS não tem se mostrado satisfatório em alguns casos, tendo-se observado que composições mais diluídas em macronutrientes tiveram melhor desempenho (NERY et al., 2008).

Os meios de cultura utilizados nos estágios de estabelecimento da cultura e multiplicação são similares, pois ambos possuem em suas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, geralmente a sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Entretanto, existem meios de cultura com formulações específicas como o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), as quais apresentam altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio, quando comparados a outras formulações salinas e meios com menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio), como o meio de cultura WPM, que significa Wood Plant Medium (LLOYD; McCOWN, 1981). Este geralmente é utilizado em espécies lenhosas quando o meio MS não for eficiente (ROCHA, 2005).

2.7.3 Reguladores de crescimento

A adição de reguladores de crescimento tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz.

Reguladores de crescimento são análogos sintéticos dos fitohormônios, isto é, têm a mesma função, porém são sintetizados em laboratório e não pela planta. Exemplos incluem ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP) (TERMIGNONI, 2005).

Entre as citocininas, BAP é a mais utilizada e tem sido muito eficiente para promover a multiplicação de partes aéreas, com frequência de uso de 68% nos meios de isolamento para 100 espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A concentração pode variar bastante em função do tipo de explante como, por exemplo, segmentos nodais e apicais são submetidos a concentrações maiores.

A citocinina é indispensável na fase de multiplicação para a quebra da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares. Porém, o uso em excesso desse regulador é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela falta de alongamento das culturas, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, ocasionando sérios problemas na fase de enraizamento (CHAVES et al., 2005).

Auxinas são outras classes de reguladores de crescimento, embora utilizadas com menor frequência e em concentrações inferiores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As auxinas estão quimicamente relacionadas com o ácido 3-indolacético (AIA), que foi o primeiro fitohormônio descoberto e identificado nas primeiras décadas do século XX. O termo auxinas é usado para descrever substâncias naturais e sintéticas que se caracterizam, essencialmente, por favorecer o alongamento celular. Também são definidas como substâncias que produzem modificações na plasticidade das paredes celulares, permitindo o alongamento celular (CID, 2000).

2.7.4 Contaminação *in vitro* de plantas

Um país com as dimensões do Brasil oferece uma diversidade de clima e plantas que estimulam uma ampla gama de interação microorganismo-hospedeiro, por isso, um explante pode alojar uma infinidade de microorganismos localizados externa ou internamente, tais como bactérias, fungos, vírus, viróides e outros, que, se não controlados eficientemente antes de inoculá-lo no meio nutritivo, irão contaminar o material onde se realiza o cultivo, inviabilizando as tentativas de micropropagação. Em função disso, não apenas é imprescindível esterilizar o explante, mas também todo o material e o ambiente em contato com ele na câmara de fluxo laminar (CID; ZIMMERMANN, 2006).

2.7.5 Oxidação fenólica

As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis, os quais exercem importante papel no metabolismo dessas espécies, bem como na defesa contra predadores e microorganismos. Nas condições *in vitro*, a oxidação fenólica constitui um dos principais problemas enfrentados no início do estabelecimento e durante o cultivo de explantes dessas espécies (BASSAN, 2006).

A oxidação fenólica se dá por meio de uma enzima chamada de polifenol oxidase. Essa enzima contém íons cobre para a sua ativação e está presente nos plastídeos. A oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas. Essas substâncias podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula (TEIXEIRA, 2005).

A oxidação fenólica pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, pois algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies. A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado. Explantes jovens, em geral, oxidam menos que os mais velhos (TEIXEIRA, 2005).

A oxidação fenólica pode ser minimizada pela redução de danos mecânicos e químicos nos explantes, pela modificação do ambiente, pelo uso de antioxidantes. A redução da luminosidade na câmara de fluxo laminar, durante a excisão dos explantes e a manutenção da cultura no escuro no início do cultivo, também é considerada benéfica, pois a luz induz à produção de fenóis na planta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de métodos para a superação da dormência em sementes de bracatinga

As sementes foram coletadas, em dezembro de 2006, de árvores matrizes em Itaara, RS, ficando armazenadas em câmara fria até março de 2007, na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO Florestas/RS).

Os testes de superação de dormência foram executados no Laboratório de Análise de Sementes de Produção do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), consistindo nos seguintes tratamentos: 1 – controle (testemunha); 2 – escarificação mecânica do lado oposto ao embrião com lixa Norton 80; 3 – imersão em água por 24 h; e 4 – imersão em água quente (80°C) por 5 minutos.

As sementes foram colocadas sobre três folhas de papel filtro umedecidas com água, em caixas gerbox, colocadas em germinador regulado à temperatura de 25° C. Foram avaliadas, aos sete dias, a porcentagem de germinação (plântulas normais), e, aos 14 dias, as porcentagens de plântulas anormais, de sementes dormentes e mortas.

As avaliações de plântulas foram baseadas nas recomendações presentes nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), considerando plântulas normais, as sementes germinadas com todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas (radícula e cotilédones), demonstrando, assim, sua aptidão para produzirem plantas normais sob condições favoráveis de campo.

Plântulas anormais foram aquelas que não demonstraram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plântulas normais, por apresentarem-se danificadas (sem alguma estrutura), deformadas (desenvolvimento fraco) e deterioradas (atacadas por patógenos). Sementes duras foram aquelas que não absorveram água e apresentaram-se, ao final do teste, com aspecto de sementes

recém-colocadas no papel filtro. Sementes mortas foram aquelas que, ao final do teste, apresentaram-se umedecidas e atacadas por microorganismos (BRASIL, 1992)

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes. Os resultados foram transformados para arco seno $\sqrt{X/100+0,5}$, e submetidos à análise de variância e teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Foi utilizado o programa estatístico SANEST (ZONTA; MACHADO, 1986).

3.2 Desinfestação superficial e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, pertencente ao Departamento de Fitotecnia, UFSM, RS, no período de agosto de 2007 a dezembro de 2008.

Em todos os experimentos envolvendo germinação *in vitro*, as sementes foram, previamente, submetidas à escarificação mecânica com lixa nº 80 para a superação de dormência. O meio de cultura MS foi suplementado com ágar (7 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,7 e os frascos, esterilizados em autoclave por 15 min a 121°C e 1 atm. Após a inoculação das sementes, os frascos foram expostos ao fotoperíodo de 16 horas obtido por lâmpadas fluorescentes brancas frias, com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob temperatura de 25° $\pm$ 3°C.

3.2.1 Efeito do tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio associado à concentração de sais do meio MS na germinação *in vitro* de sementes

As sementes foram inoculadas assepticamente em frascos de vidro de 200 ml, contendo 20 ml de meio nutritivo e três sementes. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (tempos de imersão x

concentração do meio nutritivo MS), com quatro repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de um frasco com três sementes. Os tratamentos consistiram de imersão em hipoclorito de sódio a 2% por 5, 10 ou 15 minutos e inoculação das sementes em meio $\frac{1}{2}$ MS ou MS.

Após sete dias de cultivo, avaliaram-se as variáveis: porcentagem de germinação, de contaminação fúngica e de contaminação bacteriana, e, aos 14 dias, a altura da parte aérea (cm).

Os resultados foram transformados para arco seno $\sqrt{X/100+0,5}$ e submetidos à análise de variância e teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SANEST (ZONTA; MACHADO, 1986).

3.2.2 Efeito da concentração de sais do meio MS sobre a germinação *in vitro* de sementes de bracinga

As sementes foram inoculadas assepticamente em frascos de vidro de 200 ml contendo 20 ml de meio nutritivo e três sementes. A assepsia consistiu de imersão em solução de álcool a 70% durante 1 minuto e imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos, seguidas de três enxágües em água estéril.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 25 repetições por tratamento, cada repetição consistindo de um frasco com três sementes. Os tratamentos foram quatro concentrações de sais do meio MS ($\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e básico).

Aos 25 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de germinação, cujas médias foram transformadas para arco seno $\sqrt{X/100+0,5}$. Os resultados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão polinomial. O programa estatístico utilizado foi o SANEST (ZONTA; MACHADO, 1986).

3.3 Influência de benzilaminopurina (BAP) e de ácido alfa naftalenoacético (ANA) na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de bracinga

Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento, provenientes do cultivo *in vitro* de sementes em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, em arranjo bifatorial relacionado às concentrações de citocinina (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 μM) e de auxina (0 e 2,2 μM). Foram utilizadas oito repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco de 150 ml contendo 20 ml de meio nutritivo e três segmentos nodais.

O meio de cultura MS foi suplementado com ágar (7 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,7, e os frascos foram esterilizados em autoclave por 15 min a 121°C e 1 atm. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram expostos ao fotoperíodo de 16 horas obtido por lâmpadas fluorescentes brancas frias, com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob temperatura de 25° $\pm$ 3°C.

As variáveis analisadas aos 35 dias de cultivo foram porcentagem de contaminação bacteriana, de gemas formadas e de calos e número de folhas. Os dados foram transformados para $\sqrt{X / 100 + 0,5}$. Os resultados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão polinomial. O programa estatístico utilizado foi o SANEST (ZONTA; MACHADO, 1986).

3.4 Efeito de BAP e de estreptomicina sobre a multiplicação *in vitro* de bracinga

Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais com, aproximadamente, 1 cm de comprimento provenientes de cultivo *in vitro* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. Os explantes foram inoculados em frascos de 150 ml contendo 20 ml meio de cultura MS ao qual foram adicionados 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 μM

de BAP na ausência ou na presença de 100 mg L⁻¹ de Estreptomicina, de acordo com o tratamento.

O meio MS foi suplementado com ágar (7 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,7, e os frascos foram esterilizados em autoclave por 15 min a 121°C e 1 atm. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram expostos ao fotoperíodo de 16 horas obtido por lâmpadas fluorescentes brancas frias, com intensidade luminosa de 20 μmol cm⁻² s⁻¹, sob temperatura de 25° ± 3°C.

Foram avaliados o número de folhas e de gemas axilares (meristemas formados entre o ramo e a inserção das folhas), as porcentagens de oxidação fenólica (necrose de cor marrom nos segmentos nodais) e de calos. A primeira avaliação foi realizada aos 35 dias após a inoculação dos explantes e a segunda, 30 dias depois, no primeiro subcultivo que aconteceu nas mesmas condições descritas anteriormente.

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, em arranjo bifatorial (concentrações de BAP x ausência/presença de estreptomicina), com oito repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco com três explantes.

Os resultados foram transformados para $\sqrt{X/100 + 0,5}$, sendo submetidos à análise de variância e análise de regressão polinomial. O programa estatístico utilizado foi o SANEST (ZONTA; MACHADO, 1986).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Métodos para a superação da dormência em sementes de bracatinga

Conforme se pode observar na Tabela 1, dentre os métodos testados para promover a superação de dormência das sementes, a escarificação mecânica foi o mais eficiente, proporcionando a maior porcentagem de germinação, através do atrito das sementes com a superfície abrasiva da lixa, diferindo significativamente dos tratamentos com água quente, testemunha e água por 24 h. O resultado obtido no presente trabalho vem ao encontro daqueles obtidos por Santarém et al. (1995), que, testando tratamentos para superação de dormência em sementes de cássia (*Senna macranthera*), também da família *Leguminosae*, relataram a impermeabilidade do tegumento à água e apontaram o uso da escarificação mecânica como um dos tratamentos pré-germinativos mais eficientes para romper a dormência estrutural em sementes dessa espécie recém-coletadas e com um ano de armazenamento. Resultado semelhante foi observado por Martins et al. (2001), em cujo trabalho a escarificação mecânica, embora com lixa 200, revelou-se o melhor tratamento para superação de dormência em sementes de bracatinga, seguido por imersão em água quente por 4 minutos sob temperatura em torno de 80°C. Em sementes de acácia-negra, foi obtida germinação superior a 90% com o emprego desse método (ROVERSI et al., 2002). A porcentagem de sementes duras, encontrada no final do teste de germinação dos tratamentos que envolveram escarificação mecânica e em água quente, foi nula, diferindo significativamente dos valores observados nos demais tratamentos (Tabela 1).

A escarificação com água por 24 h apresentou uma eficiência muito baixa na quebra da dormência tegumentar em sementes embebidas de barbatimão (*Senna polyphyllum*), em comparação à escarificação mecânica. Isto demonstra a ocorrência de uma restrição física ao crescimento do embrião, pelo fato da impermeabilidade dos tecidos da semente que restringe, total ou parcialmente, a difusão de água no

embrião, o que somente é efetivado com o rompimento mecânico do tegumento (LEMOS FILHO et al., 1997).

Tabela 1 – Médias de germinação (%) aos sete dias, plântulas anormais (%), sementes duras (%) e sementes mortas (%) de bracatinga aos 14 dias, após os tratamentos para a superação da dormência. Santa Maria, RS, 2008.

Tratamentos		Germinação (%)	Plântulas anormais (%)	Sementes Duras (%)	Sementes Mortas (%)
Testemunha		36,0*b	2,5 ab	32,5 b	15,0 b
Escarificação mecânica		88,0 a	5,0 bc	0,0 a	7,0 a
Escarificação água	em	34,5 b	6,0 bc	29,0 b	26,5 c
Escarificação água quente	em	65,0 b	4,5 bc	0,0 a	28,0 c
Médias		55,9	4,5	15,8	19,1
CV		21,8	12,7	16,8	18,5

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A escarificação mecânica mostrou-se superior também no que diz respeito às sementes mortas (Tabela 1), apresentando o menor percentual observado dentre os diferentes métodos testados.

Não houve efeito dos métodos avaliados sobre as plântulas anormais, não se verificando diferença significativa em relação à testemunha (Tabela 1). Pode-se

depreender disto que a escarificação das sementes não acarretou aumento na formação de anormalidades, o que torna possível seu emprego na superação de dormência em sementes de bracatinga.

4.2 Desinfestação superficial e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga

4.2.1 - Efeito do tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio associado à concentração de sais do meio MS na germinação *in vitro* de sementes

Não houve interação significativa entre os fatores tempo de imersão e concentração do meio MS para nenhuma das variáveis estudadas.

Em relação à variável germinação, não foi observado efeito significativo para as concentrações de sais do meio MS básico avaliadas, apenas para o tempo de imersão. A desinfestação com hipoclorito de sódio a 2%, durante 10 minutos, resultou em mais de 65% de sementes germinadas (Tabela 2), diferindo significativamente dos valores observados com os tempos de exposição de 5 e de 15 minutos.

A exposição por 5 minutos parece ter sido insuficiente para ter efeito na germinação e o período de 15 minutos, provavelmente excessivo, provocando danos às sementes.

A maior porcentagem de germinação em sementes de canjerana (*Cabralea canjerana*) ocorreu após a desinfestação em hipoclorito de sódio a 2,5% (ROCHA, 2005). Esse autor relatou que o hipoclorito de sódio é um potente oxidante e sua ação pode ser resultante de modificações nas propriedades das membranas celulares do tegumento ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente, aumentando, dessa forma, a porcentagem de germinação.

Diversos tratamentos têm sido utilizados em espécies florestais para maximizar a germinação das sementes. Em canafístula (*Peltophorum dubium*), o emprego de hipoclorito de sódio a 2% e água quente (95° C) promoveu uma germinação de 95%, resultado também obtido quando foi utilizada somente água quente (OLIVEIRA et al., 2003). Sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii*)

tratadas com hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos e álcool a 70% por 40 segundos apresentaram 100% de germinação (MARTINS-CORDER; BORGES JUNIOR, 1999). Em mogno (*Swietenia macrophylla*), foi detectada interação entre a concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de imersão, porém não ocorreu diferença significativa entre os resultados obtidos com álcool a 70% e hipoclorito de sódio (COUTO et al., 2004).

Tabela 2 – Médias de germinação (%) de sementes de bracatinga cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2%. Santa Maria, RS, 2008.

Tempos de imersão (minutos)	Germinação (%)
5	39,0b
10	65,0a
15	22,0b
Média	42
CV	13,1

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A duração do tratamento é um ponto crítico no estabelecimento de sementes para germinação *in vitro*, uma vez que os tratamentos de assepsia podem ser ineficientes ou danosos, quando muito suaves ou muito agressivos, respectivamente. A desinfestação superficial dos explantes deve permitir a eliminação dos microrganismos com o menor dano possível ao explante. A desinfestação em hipoclorito de sódio por 5 minutos de sementes de *Parkinsonia aculeata* não contribuiu para sua máxima germinação (GOMES, 2007). O longo tempo de exposição pode também comprometer o processo de germinação (MARTINS-CORDER e BORGES JUNIOR, 1999).

Em relação à contaminação bacteriana e fúngica nas sementes, não foi observado efeito significativo dos fatores principais, sendo observados valores médios de contaminação bacteriana (25,5%) e de contaminação fúngica (21%).

A altura das plântulas de bracatinga foi influenciada pela concentração de sais do meio MS, sendo observados os maiores valores, em centímetros, nos tratamentos que incluíram 5 e 10 minutos de imersão e inoculação em meio $\frac{1}{2}$ MS, que não diferiram entre si (Tabela 3). Em sementes de *Byrsonima intermedia*, o meio MS utilizado com a metade das concentrações de sais acarretou um aumento na taxa de germinação (NOGUEIRA et al., 2004). Brotos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) apresentaram maior crescimento com as reduções de sais $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ MS (MROGINSKI et al., 1999).

Tabela 3 – Médias de altura (cm) de plântulas de bracatinga, aos 14 dias de cultivo in vitro, após diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2% e cultivo em meio MS ou $\frac{1}{2}$ MS. Santa Maria, RS, 2008.

Tratamentos	Altura (cm)
5 minutos, em meio MS	2,91*a
5 minutos, em meio $\frac{1}{2}$ MS	6,50a
10 minutos, em meio MS	4,29a
10 minutos, em meio $\frac{1}{2}$ MS	6,17a
15 minutos, em meio MS	4,33a
15 minutos, em meio $\frac{1}{2}$ MS	0,89 b
Média	4,18
CV (%)	17,10

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.2.2 - Efeito da concentração de sais do meio MS sobre a germinação *in vitro* de sementes de bracatinga

A máxima germinação *in vitro* de sementes de bracatinga foi observada na concentração de sais $\frac{1}{4}$ MS (Figura 1), que, em conjunto com $\frac{1}{8}$ MS, forneceu mais água para promover esse processo. A partir de $\frac{1}{2}$ MS, iniciou-se um decréscimo na germinação, atingindo o valor mínimo no meio MS, com concentração básica de sais. O emprego da concentração básica dos sais, do meio MS, juntamente com a sacarose, pode ter afetado o balanço osmótico, prejudicando o processo germinativo.

O meio MS utilizado com a metade das concentrações de sais e na presença de sacarose acarretou um aumento na taxa de germinação de sementes de *Byrsonima intermedia*. A redução da concentração dos sais parece ter compensado a adição de sacarose, não afetando, assim, o balanço osmótico e sendo favorável à germinação (NOGUEIRA et al., 2004).

Esses resultados estão de acordo com os observados por Mroginski et al. (1999), que obtiveram melhores respostas de crescimento de brotos em segmentos nodais de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) utilizando combinações menos concentradas de sais com os meios $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ MS. A diminuição de sais nos meios de cultura é uma tendência mundial, e muitas pesquisas estão sendo realizadas com esta finalidade. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS, suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para as diversas espécies (CHAVES et al., 2005).

Tabela 4 – Médias de germinação (%) de sementes de bracatinga em diferentes concentrações de sais de meio MS básico. Santa Maria, RS, 2008.

Tratamentos	Germinação (%)
1/8 MS	54,0a
1/4 MS	57,0a
1/2 MS	52,0a
MS básico	24,0 b
Média	46,7
CV	24,9

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.3 Influência de benzilaminopurina (BAP) e de ácido alfa naftalenoacético (ANA) na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de bracatinga

Não foi observado efeito significativo de ANA para nenhuma das variáveis respostas analisadas, o que indica que os níveis endógenos de auxina foram suficientes para assegurar a multiplicação *in vitro* em bracatinga. Foram observadas gemas em todos os tratamentos testados, entretanto, na ausência de BAP, houve maior formação, sendo produzidas 1,39 gemas por explante (Figura 1). Isto sugere que a concentração endógena de citocininas é suficiente para que ocorra a diferenciação de novas gemas e que a suplementação exógena provoca certa inibição do processo. Em acácia (*Acacia mearnsii*), por outro lado, o uso de 2 mg L⁻¹ de BAP possibilitou a maior taxa de multiplicação de gema, 3,5 brotos por explante (BORGES JUNIOR et al., 2004).

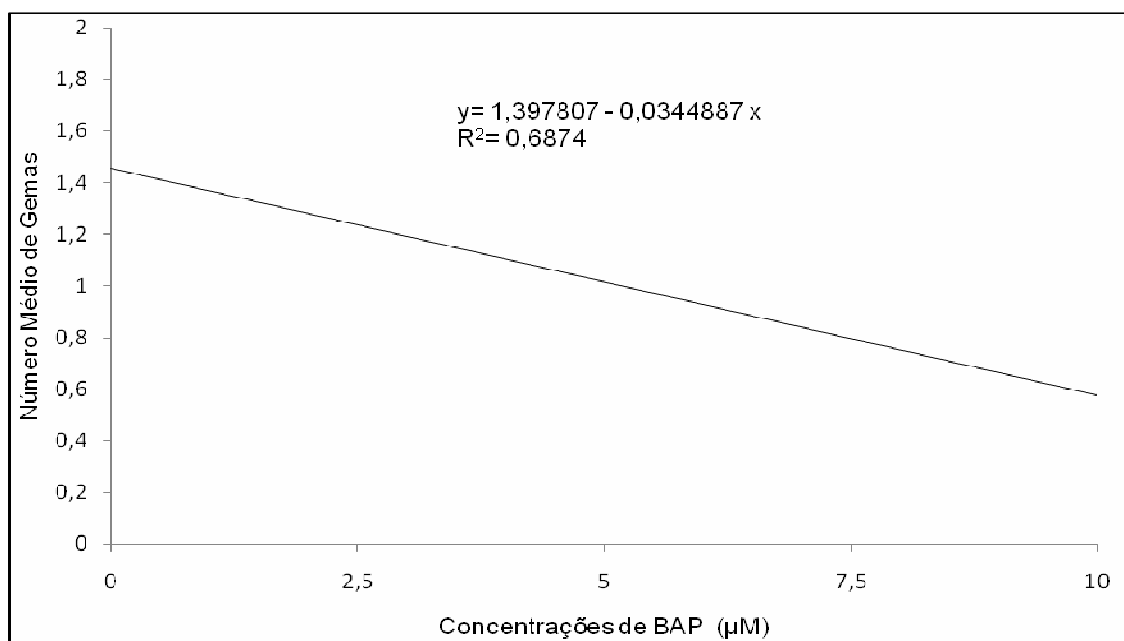


Figura 1 - Número médio de gemas formadas em culturas *in vitro* de bracatinga inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP após 35 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

Houve baixa frequência de aparecimento de calos no meio de cultura sem citocinina, porém, com a suplementação de BAP e à medida que foi aumentada a concentração desse regulador de crescimento, houve um aumento na calosidade (Figura 2). Provavelmente, isto foi ocasionado por um desbalanceamento nos níveis endógenos de fitohormônios nos explantes, em que elevadas concentrações de citocinina parecem interagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos e provoca certa inibição no surgimento dos brotos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos para *Swietenia macrophylla* King (BRUNETTA et al., 2006).

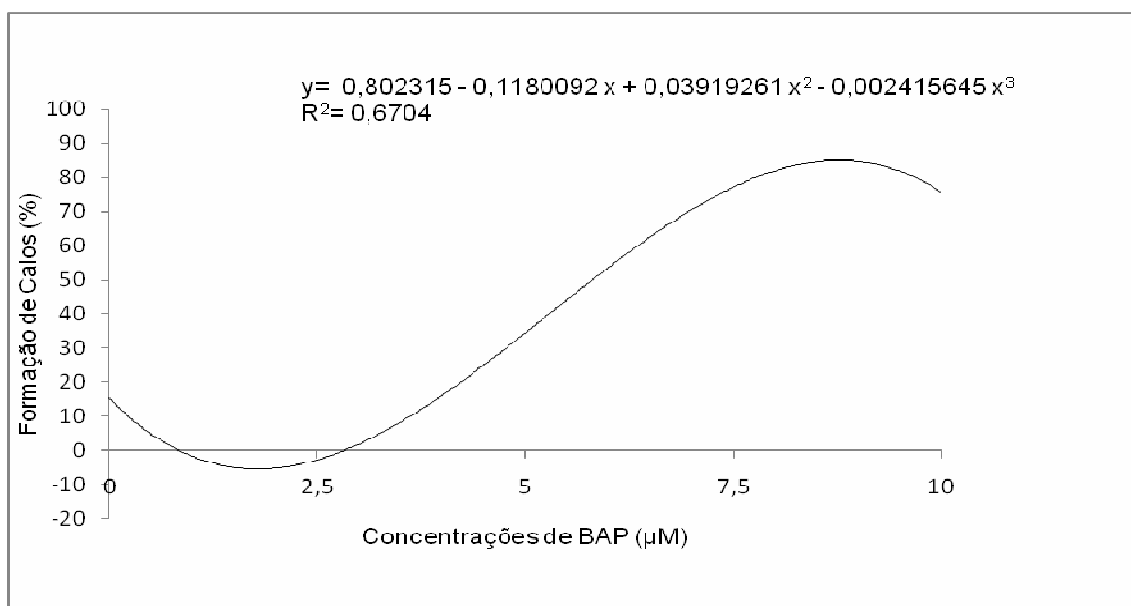


Figura 2 – Porcentagem de calos em culturas *in vitro* de bracinga inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP (µM) e na ausência de ANA aos 35 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

O número de folhas atingiu seu valor máximo, 1,62, na ausência de BAP (Figura 3). A partir da concentração inicial, 2,5 µM, houve uma redução linear nessa variável. Esse resultado indica que a adição de citocininas é prejudicial na multiplicação *in vitro* de bracinga.

Em explantes caulinares de *Inga vera* Willd., também houve uma diminuição no número de folhas com o aumento da concentração de BAP, sendo observada maior formação de brotações na ausência desse regulador de crescimento (STEIN, 2007).

Ao contrário do que foi observado, alguns tecidos necessitam de suplementação de citocinina no início, mas, depois de subcultivos prolongados, perdem esse requerimento e continuam seu crescimento sem a adição do regulador de crescimento no meio de cultivo (FOSKET, 1994).

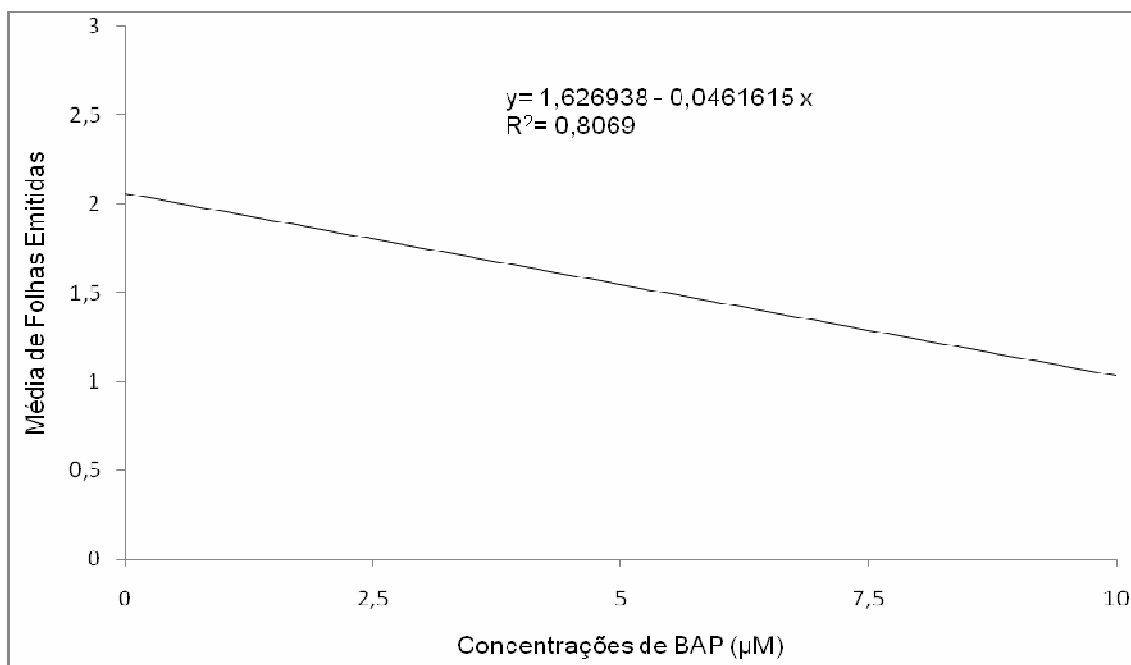


Figura 3 - Número médio de folhas em culturas *in vitro* de bracinga inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP aos 35 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

4.4 Efeito de BAP e de estreptomicina sobre a multiplicação *in vitro* de bracinga

No cultivo inicial, não houve efeito de BAP nem interação entre BAP e estreptomicina significativos para o número de folhas formadas. Estreptomicina (100 mg L⁻¹) apresentou efeito negativo sobre essa variável, resultando na média de 1,80 folhas na presença do antibiótico *versus* 2,52 na sua ausência.

Muitos antibióticos apresentam efeito fitotóxico para as plantas, alterando-lhes o crescimento *in vitro*. Entretanto, essa influência sobre a regeneração vegetal depende da concentração à qual o tecido foi exposto. Uma concentração de 50 mg L⁻¹ de estreptomicina reduziu em 11,4% a formação de folhas em segmentos nodais de marmeleiro (*Cydonia oblonga*) em relação à testemunha (BIASI, 1996).

Na ausência de BAP, independente da presença de estreptomicina, não houve contaminação por bactérias na cultura *in vitro* de bracatinga. A suplementação de BAP, a partir de 5 μM , na ausência do antibiótico, acarretou contaminação por bactérias, atingindo valor superior a 90% quando foram acrescentados 10 μM . Quando foram adicionados 100 mg L^{-1} de estreptomicina, contudo, apenas a partir de 7,5 μM foi possível observar a presença de bactérias, em um percentual que se manteve em torno de 60% de explantes contaminados (Figura 4). Esses resultados sugerem que BAP, a partir de certas concentrações, possui um papel na multiplicação desses microorganismos.

Concentrações mínimas de bactericidas devem ser determinadas para cada isolado contaminante, levando-se em consideração também o grau de fitotoxidez do princípio ativo. A estreptomicina, adicionada ao meio de micropropagação, não eliminou as bactérias endofíticas e reduziu o crescimento de *Heliconia psittacorum*, induzindo altos níveis de clorose (SANTOS et al., 2005).

Mesmo que se utilizem antibióticos de amplo espectro, o controle bacteriano na cultura de tecidos é problemático. Na maioria dos trabalhos *in vitro*, a frequência de descontaminação não é total, pois os tecidos vegetais podem interferir no controle por meio da destoxificação dessas substâncias ou servindo como habitat para os contaminantes que se translocam por seus tecidos. É comum que as concentrações de antibióticos devam ser elevadas quando estes são adicionados ao meio nutritivo juntamente com o explante, mas a fitotoxicidade dessas substâncias é fator limitante dessas concentrações (PEREIRA; FORTES, 2003).

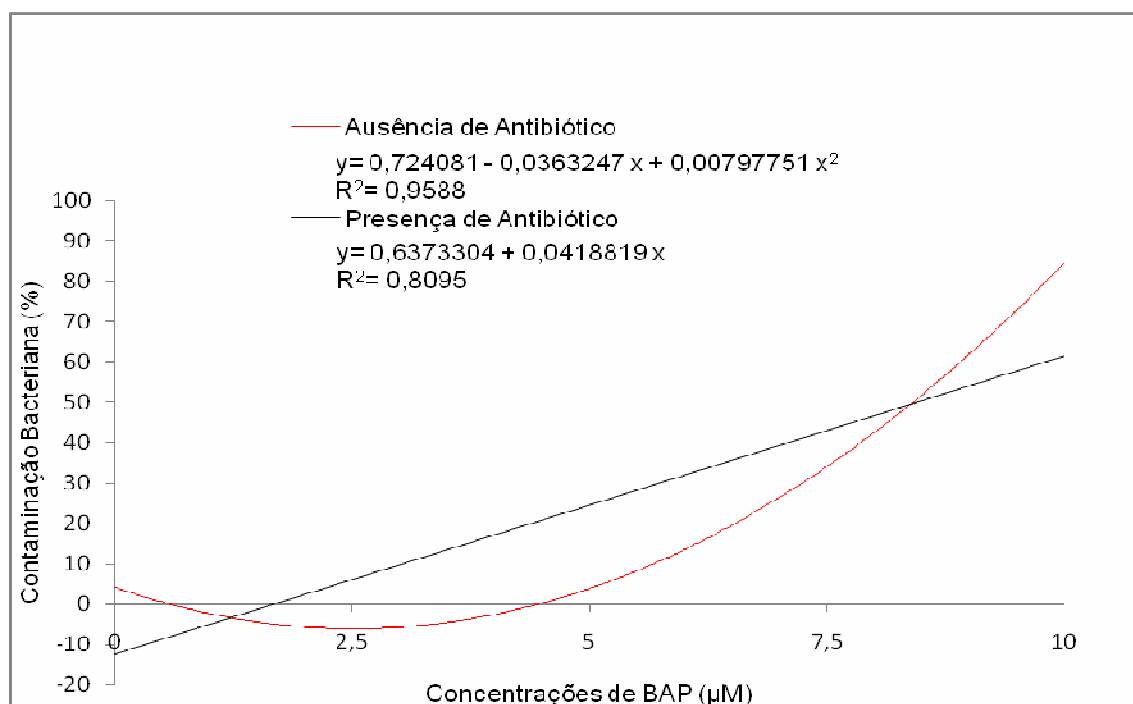


Figura 4 – Porcentagem de contaminação bacteriana em culturas *in vitro* de bractíngia inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP aos 35 dias do cultivo inicial. Santa Maria, RS, 2008.

Não foram formados calos na ausência de estreptomicina e de BAP, mas, a partir da concentração inicial de 2,5 µM da citocinina, foram observados calos em cerca de 70% dos explantes, porcentagem inalterada até o máximo de BAP administrado. Entretanto, com a adição do antibiótico, e mesmo na ausência do fitorregulador, formaram-se em torno de 70% de calos. Com o acréscimo de BAP, foram formados calos na mesma proporção relatada anteriormente, independente da concentração da citocinina. Apesar de a análise de variância ter revelado interação significativa entre os fatores analisados, não foi possível o ajuste significativo de curvas de regressão. Borges Júnior et al. (2004) encontraram calos em *Acacia mearnsii* na presença de citocininas (benziladenina, BAP e cinetina). A formação de calos em explantes cultivados em meio contendo 100 mg L⁻¹ de estreptomicina e na

ausência de BAP também foi observada em abacateiro (*Persea americana*), com o dobro dessa concentração, inibindo completamente a calogênese (BIASI, 1995).

A formação de calos na base dos explantes é muito comum em espécies lenhosas, mas é indesejada na micropropagação, pois pode comprometer a rizogênese e o desenvolvimento da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

No primeiro subcultivo, não houve efeito significativo dos fatores principais da interação entre BAP e antibiótico para o número de folhas, sendo formadas apenas 0,80 folhas por explante, em média. A baixa taxa de propagação dos segmentos nodais, mesmo na presença de BAP, pode ser decorrência da elevada oxidação fenólica observada nos explantes. A ausência de resposta a 2,4-D e BAP pelos ápices caulinares e segmentos nodais de *Mimosa caesalpiniaefolia* foi atribuída a uma intensa oxidação dos explantes, cujo crescimento teria sido inibido pelas substâncias tóxicas liberadas pelos polifenóis (OLIVEIRA et al, 2007).

Em relação à oxidação fenólica, não se observou interação significativa entre os fatores principais. Com o aumento das concentrações de BAP no meio de cultura, houve uma redução na oxidação fenólica (Figura 5).

O escurecimento de explantes é considerado consequência de oxidações, provavelmente, em decorrência da liberação de compostos fenólicos (precursores da síntese de lignina) pelos tecidos em resposta a danos físicos, altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultivo e pela oxidação de polifenóis e quinonas (OLIVEIRA et al., 2007). No presente trabalho, apesar de não terem sido determinados os fatores que acarretaram oxidação fenólica, concentrações elevadas de BAP podem ser descartadas, uma vez que se observou redução nessa variável com o aumento dessa citocinina.

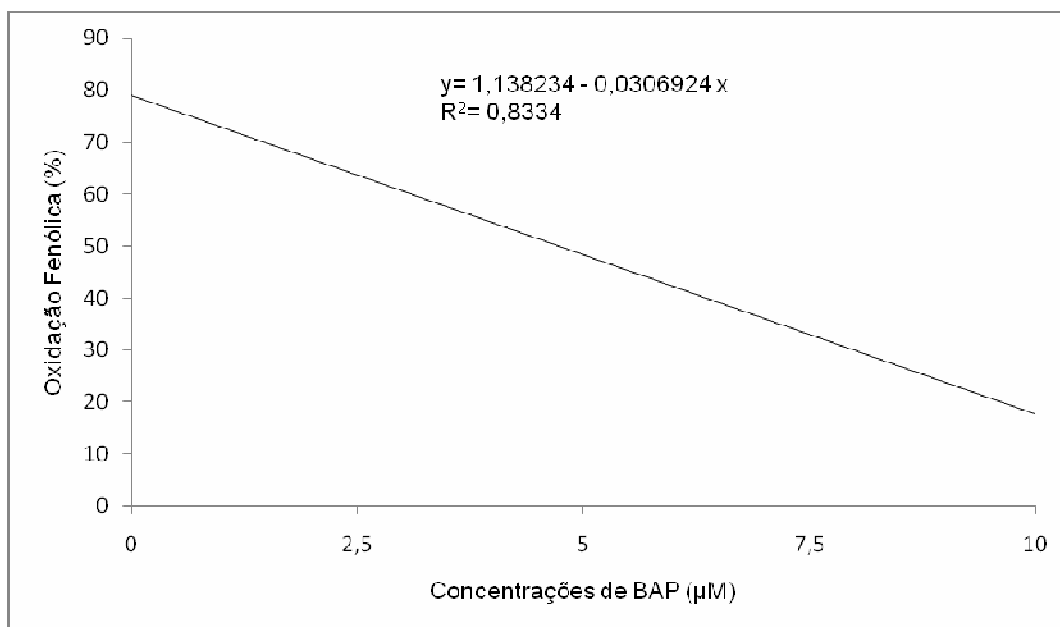


Figura 5 - Porcentagem de oxidação fenólica em segmentos nodais de bracatinga, em multiplicação no meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

A contaminação por bactérias não foi controlada pela estreptomicina, e esse efeito não foi significativo, ao contrário do que ocorreu no cultivo inicial, em que houve interação entre BAP e o antibiótico. A citocinina BAP, entretanto, afetou a multiplicação desses microrganismos, os quais foram observados apenas com a adição de 5 µM, aumentando linearmente a partir dessa concentração (Figura 6). Esse resultado reforça a hipótese de que esse regulador de crescimento favorece a multiplicação de bactérias a partir de determinadas concentrações. Em marmeleiro japonês (*Chaenomelis japonica*), ao contrário, BAP associado a hipoclorito de sódio ocasionou menos contaminação bacteriana que as outras duas citocininas testadas (isopentenil adenina e zeatina), todas na mesma concentração de 5 µM (FIGUEIREDO et al., 2008).

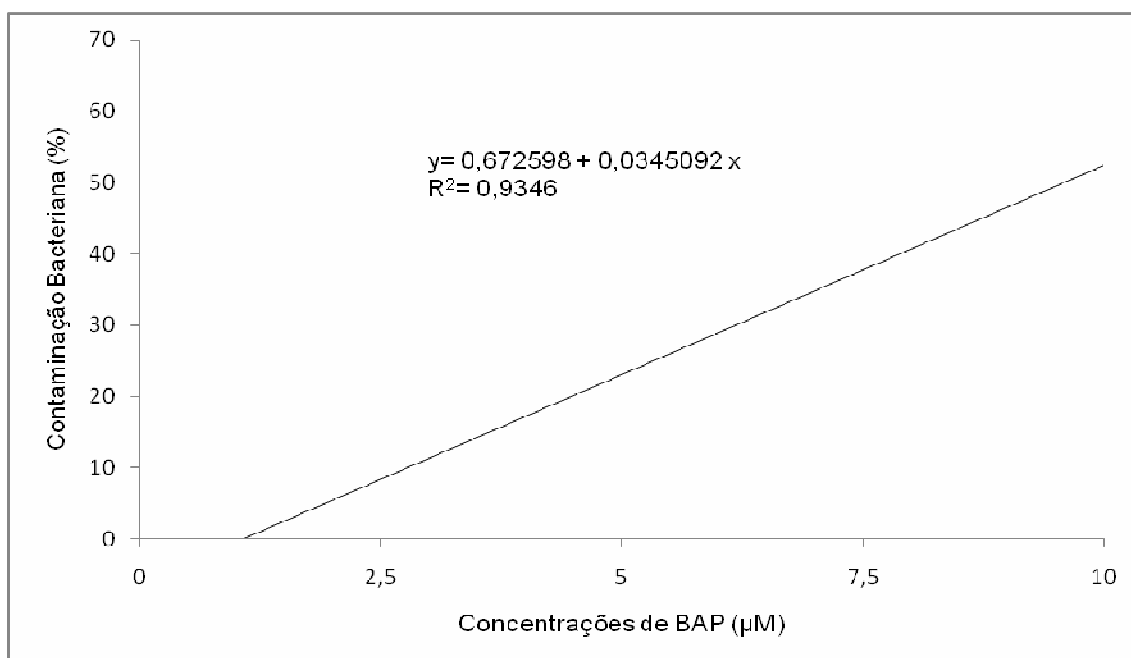


Figura 6 – Porcentagem de contaminação bacteriana em segmentos nodais de bracatinga, em multiplicação no meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

Na ausência de estreptomicina e de BAP, foi observada uma reduzida formação de calos (Figura 7). Com a administração da citocinina, contudo, houve um aumento na calosidade na base dos segmentos nodais que atingiu um máximo em 5 µM e diminuiu a partir dessa concentração. Comportamento contrário foi verificado na presença do antibiótico, observando-se elevada calosidade na ausência da citocinina, a qual reduziu quando BAP foi adicionado, atingindo o menor percentual também em 5 µM e tornando a aumentar novamente a partir de 7,5 µM.

Verificou-se que a utilização de BAP (exceto na ausência e em presença de 10 µM) promoveu o desenvolvimento de calo na base do explante. Tais resultados estão de acordo com os relatos de Borges et al. (2004), que constatarem formação de calos em *Acacia mearnsii*. Estes autores afirmaram, ainda, que houve formação de calo em explantes de *Acacia saligna*, que não foram submetidos à ação de fitoreguladores.

A formação de calosidade na base do segmento nodal, devido ao acúmulo de carboidratos, não é desejável nessa fase de multiplicação, porque pode comprometer a proliferação de gemas axilares, afetando o enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

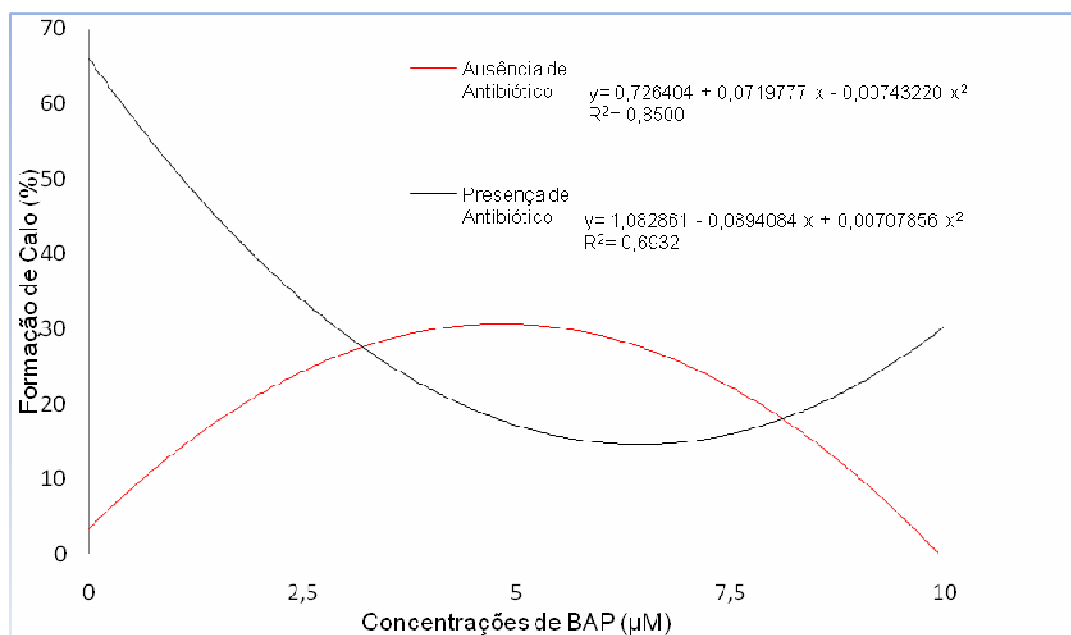


Figura 7 – Porcentagem de calos em segmentos nodais de brácatina, em multiplicação no meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

5 CONCLUSÕES

A escarificação mecânica, efetuada com o auxílio de lixa é um método eficiente para a superação da dormência em sementes de bracatinga, devido a maior porcentagem de germinação e à diminuição do número de sementes duras e de sementes mortas.

A imersão em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), por 10 minutos, é adequada para o controle de microorganismos, assegurando uma germinação *in vitro* satisfatória das sementes de bracatinga.

A germinação *in vitro* de sementes de bracatinga é otimizada pelo cultivo em meio MS básico reduzido a $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da concentração de sais.

Para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de bracatinga, oriundos de plântulas germinadas por sementes, não é necessário adicionar ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP).

O emprego de estreptomicina (100 mg L^{-1}) não foi eficiente no controle da contaminação bacteriana na multiplicação *in vitro* de bracatinga.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-WASEL, A. S. Micropropagation of *Acacia seyal* Del. *in vitro*. Journal of Arid Environments. 46: 425-431, 2000.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

BASSAN, J. S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)]**. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.

BIANCHETTI, A. **Comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth)**. Colombo: 1981, p. 57-68. (Boletim de Pesquisa Florestal).

BIANCHI, V.J.; CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; FACHINELLO, J.C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.

BIASI, L. A. Propagação do Abacateiro. **Agropecuária Catarinense**. Florianópolis, v.8, n.3, p. 29-31, 1995.

BIASI, L. A. Emprego do estiolamento na propagação de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.2, p.309-315, 1996.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Willd.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 004, p. 493-497, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

BRUNETTA, J. M. F. C. et al. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia Macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido alfa-naftalenoacético. **Scientia forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 19-24, 2006.

CARPANEZZI, A. A. **Manual Técnico da Bracatinga**. Colombo: Embrapa – CNPF, 1988. 70p. (Documentos, 20).

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Colombo, PR: Embrapa Florestas, v. 1, 2003. 1039p.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Embrapa Algodão, Campina Grande. 39p. 2006. (Documentos, 116).

CARVALHO, J. M. F.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Embrapa Algodão, Campina Grande. 28p. 2006. (Documentos 148).

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais – uma ferramenta no estudo da biologia moderna de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: jun. de 2008.

CID, L. P. B.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 20p. 2006 (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 122).

CID, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.15-48, 2000.

CORDER, M. P. M.; BORGES JR., N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acácia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

FAIAD, M. G. R. et al. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica de sementes de *Commiphora leptophloes* (Mart.) J. B. Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.1, p.14-17, 1997.

FERRADOR, S.; MARQUES, G. **Contaminações Endógenas na Micropropagação de *Castanea sativa* Mill.** Disponível em: <<http://www.esac.pt/cernas/cfn5/docs/T3-12.pdf>>. Acesso em: nov. de 2008.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Dormência: estabelecimento do processo. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 95-108.

FICK, T. A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel.** 2007. 61f. Dissertação (Mestrado em Silvicultura) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

FIGUEIREDO, G.; SCHUCH, M.W.; DAMIANI, C.R.; CHISTÉ, E. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês (*Chaenomelis japonica*) cultivar Andramig I. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura....**Anais**. Vitória, 2008.

FOSKET, D. E. **Plant growth development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press. 580p, 1994.

GOMES, M. L. O. **Germinação *in vitro* de *Parkinsonia aculeata* L.: uma espécie de uso múltiplo ocorrente nas matas ciliares da caatinga.** 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. p. 183-260.

LEMO FILHO, J. P. et al. Germinação de sementes de *Senna macranthera*, *Senna multijuga* e *Stryphnodendron polyphyllum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.4, p. 357- 361, 1997.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially Feasible Micropropagation of Montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot Tip Culture. **Combinet Proceedings International Plant Propagators Society**. v. 30, p. 421-427, 1981.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. São Paulo: Odessa/Instituto Plantarum, 2002. 368p. v. 1.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.

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.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das leguminosas**. 2. ed. Editora da UFSM: Santa Maria: 2007. p. 40.

MARTINS, C. C. et al. Métodos de superação de dormência em sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella*). **Informativo ABRATES**. v. 11, n. 2, p. 250, 2001.

MONTEUUIS, O. *In vitro* Micropropagation and Rooting of *acacia mangium* and Microshoots from Juvenile and Mature Origins. **In Vitro Cellular Development Biology Plant**. Heidelberg, v. 40, n.1, p. 102–107, 2004.

MROGINSKI, L. A. et al. Effect of Medium Composition and Light Supply on *in vitro* Shoot Proliferation in *Ilex paraguariensis* (*Aquifoloaceae*). **Journal of Plant Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 359-368, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n.1, p. 437-496, 1962.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G.; Desinfestação e Germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, 2007.

NOGUEIRA, R. C. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NERY, et al. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Revista Cerne**, Lavras, v. 14, n.1, p. 1-8, 2008.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.5, p. 597- 603, 2003.

OLIVEIRA, F. F. M. et al. Micropropagação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, Mossoró, RS, v. 20, n. 3, p. 152-159, 2007.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. Micropropagación. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biología y Mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires: Ed. INTA, p. 163-172, 2004.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. L. R. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, 7 ed., 2007. 856 p.

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

ROVERSI, T.; MATTEI, V. L.; SILVEIRA JÚNIOR, P.; FALCK, G. L. Superação da dormência em sementes de acácia negra (*Acacia mearnsii* Willd.). **Revista Brasileira Agrociência**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 161-163, 2002.

SANTARÉM, E. R.; AQUILA, M. E. A. Influência de métodos de superação de dormência e do armazenamento na germinação de sementes de *Senna macranthera* (COLLADON) IRWIN & BARNERY (LEGUMINOSAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 2, p. 205-209, 1995.

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (orgs.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, p. 415-444, 2003.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G.; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**. 32(2): p. 1-8, 2005.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SCHOTTZ, E. S. et al. *In vitro* Multiplication of *swietenia macrophylla* KING (MELIACEAE) from Juvenile Shoots. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 109-117, 2007.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

STEIN, V. C. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 2, p. 128-133, 2007.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em: www.def.ufla.br/cerne/revistav7n22001/11%20artigo%20002.pdf Acesso em: 19.out. 2007.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182p.

VILLARREAL, L.; ROJAS, G. *In vitro* Propagation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, a Mexican Medicinal Tree. **Plant Cell Reports**, n. 16, p. 80-82, 1996.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, p. 55-74, 2007.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores – SANEST**. Pelotas: Instituto de Física e Matemática, UFPel, 1986.

WEBER, K. S. **Manejo da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) baseado no crescimento diamétrico de árvores individuais.** 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Manejo Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas.** Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 55p.