



EMANUELLE TAÍS DA SILVA SOUZA

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MOGNO
(*Khaya senegalensis*)**

LAVRAS – MG

2013

EMANUELLE TAÍS DA SILVA SOUZA

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MOGNO (*Khaya senegalensis*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Edilson Paiva

Coorientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Souza, Emanuelle Taís da Silva.
Multiplicação *in vitro* de mogno (*Khaya senegalensis*) /
Emanuelle Taís da Silva Souza. – Lavras : UFLA, 2013.
102 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Edilson Paiva.
Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Meristemas. 3. Embriogênese. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

EMANUELLE TAÍS DA SILVA SOUZA

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MOGNO (*Khaya senegalensis*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Dra. Andrea Almeida Carneiro EMBRAPA

Prof. Dr. Edilson Paiva
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus pais, Ulisses e Eunice e ao meu irmão Junior, por todo amor e apoio incondicional

Essa vitória não é só minha, pertence a vocês, os maiores torcedores de cada desafio que me disponho a transpor.

Nem o mais elevado esforço seria capaz de dissociar a minha trajetória à presença de vocês.

Obrigada por existirem e fazerem parte da minha vida!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado e me dado força nos momentos difíceis dessa caminhada;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

Ao meu orientador Edilson Paiva, pela orientação e confiança na execução do projeto; Obrigada por acreditar na minha capacidade;

Ao meu coorientador Luciano Vilela Paiva, pela atenção e confiança;

À Empresa BIOCELL, especialmente a Miguel Reis, pela oportunidade e disponibilidade;

Aos colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), especialmente à Flávia, à Marlúcia, à Tânia e à Evânia, por toda experiência e contribuição;

À pesquisadora da EMBRAPA Milho e Sorgo, Andréa Almeida Carneiro, pela atenção e incentivo;

À Flávia, Camila e Leandra, pelo companheirismo e amizade;

À Elaine, Bárbara e Ana Carla, pelo convívio, companheirismo e carinho;

À Natália, pela disponibilidade, auxílio e amizade;

À minha mãe Eunice e meu pai Ulisses, por acreditarem no meu potencial e confiarem em mim; Amo vocês!

Ao meu irmão Junior, pelo incentivo e carinho;

Ao meu noivo Alexandre, pela paciência e companheirismo;

A minha cunhada Mara pela ajuda e carinho;

À Camila e Geovana que, direta ou indiretamente, contribuíram com carinho e amizade;

À minha família, padrinhos, afilhados e amigos que sempre torceram por mim.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

A madeira do Mogno Brasileiro (*Swietenia machophylla* King) é hoje uma das mais valorizadas economicamente, alcançando valores de mercado superiores a outras espécies arbóreas, sendo utilizada para diversos fins. De modo geral, a espécie possui dificuldade de regeneração natural e de estabelecimento em reflorestamentos, tendo como principal praga larvas de *Hypsipyla grandella* Zellar. As espécies do gênero *Khaya* apresentam grande potencial no reflorestamento devido à tolerância a esta praga. A micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecidos vegetal esta se tornando uma alternativa viável e importante na multiplicação de espécies arbóreas, incluindo o gênero *Khaya*. O objetivo com este trabalho foi produzir mudas *in vitro* de Mogno Africano (*Khaya senegalensis*), utilizando e otimizando técnicas de cultura de meristemas provenientes de sementes germinadas *in vitro*, via gemas axilares obtidas de plantas jovens cultivadas em casas de vegetação e via embriogênese somática de calos obtidos por meio de explantes foliares. Para o isolamento dos meristemas provenientes de plantas cultivadas *in vivo*, foram testados meios MS com presença e ausência de reguladores de crescimento (BAP, AIA e AIB). O meio MS com adição de BAP e AIA foi o melhor meio pra realizar o isolamento de meristemas de plantas produzidas em casas de vegetação. Para multiplicação dos meristemas isolados de plantas cultivadas em casas de vegetação e dos provenientes de sementes germinadas *in vitro* foram utilizados meios MS e WPM combinados com BAP em diferentes concentrações. O meio MS contendo $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentou melhor resultado para multiplicação dos explantes meristemáticos. A indução de calos embriogênicos foi obtida com a utilização de segmentos foliares inoculados em meios MS, com diferentes combinações de reguladores de crescimento e variações nutricionais. As massas celulares obtidos foram avaliadas por microscopia óptica. Apenas calos desenvolvidos no meio MS suplementado com caseína, extrato de malte e concentração de 2,4-D, 2-iP e IBA apresentaram características embriogênicas, ou seja, maior potencial para possível regeneração de plantas de Mogno.

Palavras-chave: Mogno. Micropropagação. Multiplicação. Meristemas. Embriogênese.

GENERAL ABSTRACT

The Brazilian Mahogany wood (*Swieteniamachophylla* King.) is currently one of the most economically valued, reaching market values superior to other tree species, and used for various outcomes. Generally, the species presents difficulty in natural regeneration and in establishing in reforestations, with the *Hypsipylagrandella*Zellar larvae as its main pest. The species of the *Khaya* genus present great potential in reforestations due to its tolerance to this pest. The micro propagation using plant tissue cultivating techniques is becoming a viable and important alternative in the multiplication of tree species, including of the *Khaya* genus. The objective of this work was to produce African Mahogany (*Khayasenegalensis*) *in vitro*, using and optimizing techniques for cultivating meristems derived from seeds germinated *in vitro*, via auxiliary buds obtained from young plants cultivated in a greenhouse, and via somatic embryogenesis of calluses obtained from foliar explants. For the isolation of the meristems derived from plants cultivated *in vivo*, we tested MS mediums with the presence and absence of growth regulators (BAP, IAA and IBA). The MS medium with BAP and IAA were best to perform the isolation of meristems from plants cultivated in greenhouse. For multiplying the meristems isolated from plants cultivated in greenhouse and from those derived from seeds germinated *in vitro* we used the MS and WPM mediums combined with BAP in different concentrations. The MS medium containing 0.50 mg.L⁻¹ of BAP presented the best result for multiplying the meristem explants. The induction of embryogenic calluses was obtained with the use of foliar segments inoculated in MS medium, with different combinations of growth regulators and nutritional variations. The cellular masses obtained were evaluated by optic microscopy. Only the calluses developed in the MS medium supplied with casein, malt extract and concentration of 2,4-D, 2-iP and IBA presented embryogenic characteristics, that is, a higher potential for possible Mahogany plant regeneration.

Keywords: Mahogany. Micro propagation. Multiplication. Meristems. Embryogenesis.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1 Desenvolvimento de explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 21 dias pós inoculação, nos diferentes tratamentos

A e E (0 mg.L^{-1} de BAP); **B e F** ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP); **C e G**

($0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP) e **D e H** ($1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP) 62

Figura 2 Características dos explantes meristemáticos de Mogno Africano

aos 21 dias de cultivo **A** Meio MS com $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP

(melhor resultado para MS); **B** Meio MS com 0 mg.L^{-1} de BAP

(pior resultado para MS); **C** Meio WPM com 0,25 mg.L⁻¹ de

BAP (melhor resultado para WPM); **D** WPM com 0 mg.L⁻¹ de

	BAP(pior resultado para WPM).	64
Figura 3	Altura dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para multiplicação meristemática. Eixo vertical com valores em centímetro (cm).....	66
Figura 4	Número de Brotos dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para multiplicação meristemática	67
Figura 5	Características dos explantes meristemáticos de Mogno Africano	

aos 21 de cultivo **A** Meio MS com 20,00 mg.L⁻¹ de GA₃; **B** Meio

MS; **C** Meio MS com 0,50 mg.L⁻¹ de BAP

77

Figura 6	Altura dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para alongamento dos meristemas. Eixo vertical com valores em centímetro (cm).....	78
Figura 7	Número de brotos dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para alongamento dos meristemas	79

ARTIGO 2

Figura 1	Massas foliares produzidas em explantes foliares de Mogno Africano. Imagens experimento MS-08. A Início da formação de calosidades nos bordos dos explantes foliares, B Desenvolvimento das calosidades e C Estruturas calogênicas obtidas ao longo dos subcultivos.....	105
Figura 2	A Células dos calos do experimento MS-01 com características não embriogênicas, ou seja, células irregulares, redondas, grandes e espaço intercelular, B Células dos calos do experimento MS-04 com características não embriogênicas, ou seja, células irregulares, redondas, grandes e espaço intercelular, C Células dos calos do experimento MS-08 com características embriogênicas, isto é, células pequenas e isodiamétricas, densamente coradas, núcleos grandes, vacúolos pequenos e divisão celular com formação de aglomerados (SETAS)	108

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Meios de cultura utilizados nos tratamentos para avaliar a regeneração de meristemas obtidos de plantas jovens de Mogno Africano cultivadas em casa de vegetação	44
Tabela 2	Composição dos meios de cultura utilizados na multiplicação de meristemas obtidos de plântulas oriundas da germinação <i>in vitro</i> de sementes de Mogno Africano	46
Tabela 3	Composição dos meios de cultura utilizados para alongamento de meristemas de Mogno Africano	48
Tabela 4	Efeito contaminação de explantes meristemáticos de Mogno Africano nos diferentes tratamentos testados	51
Tabela 5	Efeito de diferentes concentrações e combinações de BAP, AIB e AIA em meio MS na altura de explantes meristemáticos de Mogno Africano	52
Tabela 6	Efeito de diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS e WPM na altura e número de brotos de explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 21 dias de cultivo.....	58
Tabela 7	Efeito de diferentes concentrações de BAP, ANA e GA3 em meio MS no vigor, altura e número de brotos de explantes meristemáticos de Mogno Africano	72

ARTIGO 2

Tabela 1	Número de subcultivos e meios de cultura MS testados visando a produção de calos embriogênicos em explantes foliares de Mogno Africano	100
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 13
2	REFERENCIAL TEÓRICO 15
2.1	Reflorestamento 15
2.2	Aspectos gerais da planta e cultura do Mogno 18
2.3	Cultura de tecidos 24
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS 29
	REFERÊNCIAS 30
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 35	
ARTIGO 1 Produção de mudas de Mogno (<i>Khaya senegalensis</i>) via cultura de meristemas..... 35	
1	INTRODUÇÃO 37
2	MATERIAL E MÉTODOS 41
2.1	Material Vegetal 41
2.2	Meios de cultura testados 43
2.3	Parâmetros avaliados 49
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
3.1	Isolamento de meristemas de plantas jovens cultivadas <i>in vivo</i> 50
3.2	Multiplicação dos meristemas oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação de sementes <i>in vitro</i> 56
3.3	Alongamento dos meristemas oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação de sementes <i>in vitro</i> 70
4	CONCLUSÃO 82
	REFERÊNCIAS 85
ARTIGO 2 Indução de massas pró-embriogênicas de mogno via embriogênese somática..... 92	
1	INTRODUÇÃO 95
2	MATERIAL E MÉTODOS 98
2.1	Material vegetal 98
2.2	Meios de cultura testados 99
2.3	Avaliação da anatomia dos calos 102
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 103
4	CONCLUSÃO 111
	REFERÊNCIAS 114

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O consumo desmedido de recursos naturais coloca em risco a sobrevivência de diferentes plantas arbóreas. Por essa razão, tem sido crescente a ação de pesquisadores que direcionam estudos no sentido da preservação das espécies, como o Mogno. Dentre as inúmeras ações, se destacam aquelas voltadas para a exploração sustentável dos recursos naturais, como o reflorestamento. É importante ressaltar que o sucesso das ações desenvolvidas depende em grande parte do emprego de técnicas capazes de viabilizar condições de propagação de espécies arbóreas de interesse econômico.

No Brasil, a madeira de Mogno Africano (gênero *Khaya*) tem alcançado valores de mercado cada vez mais elevados, superando, por exemplo, o Cedro, o Pinus e o Eucalipto. A valorização da madeira de *Khaya* em relação à espécie nativa (*Swietenia macrophylla* King), ou Mogno Brasileiro se dá em função da resistência a praga *Hypsipyla grandella* Zellar que ataca à gema terminal da espécie nativa, diminuindo o vigor, crescimento, e proporcionando múltiplas brotações, o que não é favorável para o mercado.

Graças a trabalhos clássicos como o de Murashige e Skoog (1962), a propagação das espécies conta nos dias de hoje com uma ferramenta biotecnológica muito eficiente, a Cultura de Tecidos, capaz de garantir a produção de mudas sadias, em larga escala e curto espaço de tempo.

A utilização da técnica de Cultura de Tecidos, portanto, torna-se uma alternativa para propagação do Mogno Africano. A cultura da espécie é uma atividade altamente lucrativa pela qualidade e alto custo se sua madeira e, além disso, pode ser usada na conservação ambiental, principalmente no que se refere à devastação das áreas de florestas nativas.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a produção e multiplicação *in vitro* de Mogno Africano, utilizando e otimizando técnicas de cultura de tecidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Reflorestamento

Problemas decorrentes de explorações predatórias de espécies vegetais e a não renovação de florestas estão contribuindo significativamente para o aquecimento da Terra, Moutinho et al. (2001) estimam que a temperatura da atmosfera esteja aumentando a uma taxa de 0,2 °C por década como resultado das emissões de gases que retêm calor, tais como o dióxido de carbono (CO₂) e o metano (CH₄).

O Protocolo de Kyoto, de 1997 – acordo por meio do qual os países desenvolvidos se comprometem a reduzir a emissão de gases de efeito estufa –, estabeleceu três gases como os principais responsáveis pelas alterações climáticas do planeta: CO₂, CH₄ e óxido nitroso (N₂O); seguidos de mais três com importância menor: hidrofluorcarbonos (HFCs), perfluorcarbonos (PFCs) e hexafluoreto de enxofre (SF₆). Entre eles, o volume de emissões de CO₂ representa aproximadamente 65% do total de emissões de gases de efeito estufa e o tempo de sua permanência na atmosfera é de cerca de 140 anos (DINIZ, 2011; JUVENAL; MATTOS, 2002).

O fogo nas florestas brasileiras, por exemplo, é responsável pela emissão de grandes quantidades de gases de efeito estufa por vários processos distintos, incluindo a queimada de floresta nas áreas que estão sendo desmatadas para agricultura e pecuária, incêndios florestais e queimada de capoeiras, pastagens, e diferentes tipos de savanas (FEARNSIDE, 2002).

O acúmulo líquido de carbono (C) na atmosfera, oriundas das emissões de CO₂, chega a três bilhões de toneladas por ano e não há perspectivas, há curto prazo, de que esta situação seja revertida. Neste cenário, a Amazônia tem papel fundamental. Em suas florestas está armazenado uma quantidade de C

equivalente àquela que é emitida pela população humana durante mais de uma década. Representa, portanto, um grande “armazém de carbono” (MOUTINHO et al., 2001).

Segundo Serviço Florestal Brasileiro (2010), o Brasil é um país florestal, com aproximadamente 516 milhões de hectares (60,7% do seu território) de florestas naturais e plantadas. Destes, cerca de 6,8 milhões de hectares são de florestas plantadas, principalmente com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, que representam 93% do total, correspondendo a apenas 0,8% da área do país e 1,3% do total das florestas – o que representa a segunda maior área de florestas do mundo, atrás apenas da Rússia. No entanto, estamos vivenciando na primeira década do século XXI, uma escassez de madeira oriunda de reflorestamento, que se reflete em altas dos seus preços acima da inflação e prejudica de maneira diferente os seus diversos segmentos consumidores (BACHA, 2008).

Na concepção de Juvenal e Mattos (2002), o Brasil apresenta grande competitividade no mercado de produtos florestais, em razão de suas características edafoclimáticas e do desenvolvimento tecnológico obtido na área de silvicultura. Outros produtos como carvão vegetal, painéis de madeira e madeiras serradas contribuem para fazer do Brasil um país importante no mercado mundial de produtos florestais, seja como produtor, consumidor ou exportador.

A madeira foi um dos primeiros materiais usados pelo homem por meio dos tempos, na construção de sua habitação e de seus primeiros equipamentos de transporte. Atualmente, no mundo, ela tem extrema importância, pois tem uso para diferentes fins, como o da construção civil, geração de energia, produção de polpa celulósica e papel, fabricação de móveis etc. Na indústria moveleira, as madeiras provenientes de reflorestamento se revelam promissoras e o futuro reside no uso crescente das mesmas, uma vez que a antiga vantagem

comparativa representada pelo uso da madeira de florestas nativas torna-se cada vez mais ineficiente (SILVA, 2010).

A troca de posições de importância entre florestas nativas e plantadas na composição da produção brasileira de madeira deveu-se: 1) à redução das matas nativas mais próximas aos grandes centros consumidores e à maior rigorosidade na fiscalização de sua exploração; 2) ao incremento do reflorestamento no Brasil; e 3) ao maior interesse de alguns setores pelo uso de madeira de reflorestamento, preterindo as oriundas de florestas nativas, devido às pressões ambientais. É válido ressaltar que esses três fatores se inter-relacionam (BACHA, 2008).

Para tal, o reflorestamento é uma prática muito importante, pois além de promover a agregação e alteração microclima do solo, contribui para o aumento da atividade microbiológica e o estabelecimento da funcionalidade do sistema solo-planta-organismo, além da conservação ambiental (SILVA; SIQUEIRA; COSTA, 2004).

A maior parte da área reflorestada existente no País formou-se nas décadas de 1970 e 1980, quando da vigência do Fundo de Investimentos Setoriais - Fiset - Florestamento e Reflorestamento. Esse instrumento tornou possível às empresas plantios de florestas em larga escala, contando com um incentivo financeiro, uma vez que poderiam abater integralmente do Imposto de Renda as importâncias comprovadamente aplicadas em reflorestamento, respeitado o limite de 50% do imposto devido (JUVENAL; MATOS, 2002).

No Brasil, em substituição às áreas originais, encontra-se atualmente uma variada gama de ambientes antropogênicos como zonas urbanas, áreas de cultura, pastagens e reflorestamentos com espécies exóticas (eucaliptos ou pinus) (MACHADO; LAMAS, 1996).

Além das espécies de eucalipto e pinus, já concretizadas no cenário nacional como madeiras fornecedoras de matéria-prima para inúmeros fins,

existem iniciativas da introdução de novas espécies com potencial madeireiro, uma delas é o Mogno (SILVA, 2010).

2.2 Aspectos gerais da planta e cultura do Mogno

A madeira do Mogno é moderadamente pesada variando de 0,55 a 0,70 g cm³, possuindo cerne castanho avermelhado a castanho escuro uniforme. O alburno é amarelo ou levemente pálido, de pouca espessura, grã-direita e textura média. Possui cheiro característico, gosto amargo, superfície lustrosa e geralmente lisa ao tato. É fácil de trabalhar, sendo utilizada na confecção de móveis finos, nos trabalhos arquitetônicos e paredes ornamentais, botes e barcos, molduras, cofres, esculturas torneadas ou entalhadas e instrumentos musicais, particularmente pianos (COUTO, 2002).

O Mogno é uma espécie de crescimento rápido e tronco ereto, sendo uma árvore adaptada às condições edafoclimáticas da região amazônica, no qual é bastante explorada por indústrias do setor madeireiro que utilizam a madeira desta espécie visando a obtenção de sub-produtos como os já mencionados (MENDES et al., 2007).

A espécie é uma árvore de copa dominante e uma altura variando entre 25 e 30 m, podendo atingir de 40 a 45 metros de altura e de 100 a 200 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), que cresce sobre uma grande variedade de solos (COUTO, 2002; RASCON et al., 2007; VERÍSSIMO et al., 2002). Segundo autores, a espécie possui folhas compostas que são paripenadas alternas, sendo compostas por 3 a 4 pares de folíolos opostos. As pequenas flores de coloração creme-amarelada estão inseridas em panículas de 15 a 25 cm de comprimento. O fruto é lenhoso, ovóide, de coloração castanho-clara, com cerca de 12 a 18 cm de comprimento, que se abre em 5 partes, com 10 a 14 sementes aladas com comprimento de 8 a 11 cm cada uma. As folhas são

perenes, com curto período de desfolha, ocorre por ocasião da maturação das sementes.

Cordeiro (2012) afirma que em condições favoráveis, o Mogno inicia seu ciclo reprodutivo a partir dos 12-15 anos de idade. Segundo o autor, a floração do Mogno varia espacialmente e temporalmente, em termos estacionais, ocorrendo em estação seca na extensa área de distribuição natural. A estação seca favorece abertura dos frutos maduros de Mogno e a dispersão de suas sementes aladas.

O fruto do Mogno é uma baga ovulada, e constitui uma cápsula lenhosa, contendo de 12 a 14 sementes. As sementes são aladas, com 6 a 13 cm de comprimento por 1,0 a 2,5 cm de largura, e são dispersas pelo vento (CORDEIRO, 2012).

A casca do Mogno é amplamente utilizada como um remédio contra febre para tratar a malária, repelir e matar mosquitos, para tratamento de gripes e resfriados, diarreias, problemas em mucosas e doenças venéreas. Além disso, utiliza-se a casca como vermífugo e agente antimicrobiano. Estas qualidades desejáveis podem colocar excesso de demanda sobre o Mogno, resultando em diminuição da base de recursos naturais do mesmo. Seus extratos e constituintes químicos vêm objetos de extensos estudos quanto as propriedades fitoquímicas e farmacológicas, desde 1960 (ADEMOLA; FAGBEMI; IDOWU, 2004; FRIMPONG-OPUNI et al., 2008; ZHANG et al., 2007).

Veríssimo, Barreto e Tarifa (2002) mencionam que o Mogno representa apenas uma pequena fração (aproximadamente 0,3%) do valor das exportações brasileiras. Entretanto, no Pará, fornecedor de 64% de todo o Mogno exportado pelo Brasil, o comércio de Mogno com o exterior representa 5% do valor total das exportações (Associação dos Exportadores de Madeira do Pará e Amapá - Aimex, dados internos).

Devido à cor da madeira, estabilidade dimensional e características organolépticas, que proporcionam diversidade de uso e fácil acabamento, essa espécie está entre as de maior valor econômico, tanto no mercado interno como externo (LAMEIRA et al., 2006).

A madeira do Mogno é hoje a mais valorizada no mercado internacional, alcançando valores bastante elevados, sendo a mais importante espécie florestal explorada na região Amazônica (MIRANDA; MIRANDA, 2000). No auge de sua comercialização o seu metro cúbico serrado alcançou preços superiores a US\$ 1.200 (ALMEIDA et al., 2007). Esses valores têm contribuído de forma bastante acelerada para sua exploração nas áreas de ocorrência natural, visto que todo o Mogno comercializado no mercado internacional provém de árvores extraídas de florestas primárias (LAMEIRA et al., 2006).

Calcula-se que entre 1971 e 1990 pelo menos 3,1 milhões de metros cúbicos de Mogno foram retirados da floresta amazônica para exportação. Segundo dados oficiais do governo brasileiro, o País exportou em 1993, 174 mil metros cúbicos de Mogno. Cerca de 80% dessa madeira foi enviada aos estados Unidos e à Inglaterra. Considerando-se o valor cotado para o Mogno no mercado internacional, isso representa algo em torno de 150 milhões de dólares (MIRANDA; MIRANDA, 2000). No período de 1980 a 1998, a participação do Mogno representou 33,61% do valor das exportações de madeira serrada tropical (ALMEIDA et al., 2007).

Sob a denominação de “Mogno” encontra-se no mercado aproximadamente uma centena de madeiras pertencentes às mais diversas famílias e gêneros. Considera-se madeira genuinamente de Mogno apenas a pertencente ao gênero *Swietenia* (COUTO, 2002). O gênero *Swietenia* foi estabelecido em 1760, por Jacquin, com a espécie *Swietenia mahagoni*. Trata-se de um gênero americano de poucas espécies, tendo afinidade com as “coabas” africanas *Kahya* e *Entandrophragma* (ALVARADO, 2009). Em um sentido

amplo, podem designar-se ainda os outros gêneros e espécies da família Meliaceae, entre os quais se destacam *Khaya ivorensis* e *K. senegalensis*. Dentro do gênero *Khaya*, ocorrem as espécies como *K. grandifolia* e *K. anthotheca*, que são conhecidas sob a designação de “Mogno Africano”, não havendo distinção substancial do “verdadeiro Mogno” no aspecto fisionômico, nem na qualidade da madeira (COUTO, 2002).

O Mogno Brasileiro (*Swietenia macrophylla* king) é uma espécie do trópico americano com larga distribuição, desde a Península de Yucatán, no sul do México, passando pela América Central, Colômbia e Venezuela até as zonas de baixa altitude da Amazônia Ocidental do Equador, Peru, Brasil e Bolívia (BRUNETTA et al., 2006; COUTO, 2002; MIRANDA; MIRANDA, 2000). Mais precisamente a área de ocorrência natural do Mogno situa-se a latitude 20°N e 18°S (COUTO, 2002).

Na Amazônia Brasileira, o Mogno ocorre em manchas dispersas, com distribuição que vai do Rio Araguaia, ultrapassando as fronteiras brasileiras com Bolívia e Peru (COUTO, 2002; VERÍSSIMO; BARRETO; TARIFA, 2002). Ocorre também em pequenas áreas dos estados do Maranhão e Tocantins, seguindo pelo Pará, Mato Grosso, Rondônia, Acre e parte sul do Amazonas. Os estados do Acre (100%) Rondônia (97,2%) têm seus territórios quase que integralmente dentro da área de ocorrência do Mogno. A menor ocorrência é observada em Tocantins (0,27%) e no Maranhão (0,85%). Por outro lado, o estado do Pará participa em 46,7% do seu território na zona de ocorrência natural do Mogno (COUTO, 2002).

A espécie *Swietenia macrophylla* King apresenta inúmeros nomes vulgares, dentre os quais podem ser citados, por exemplo: Aguano, Mogno, Araputanga e Cedro-rana no Brasil; Coaba das Honduras em Porto Rico na Guatemala; Coaba no Peru; Coaba Americana, Aedro carmesí, Cedro Espinoso e Granadillo na Colômbia; Crura na Bolívia; Caobo, Oruro, Caoba Negra e

Caoburo na Venezuela; Caoba no México, no Panamá, em Cuba, na Costa Rica, em Honduras e em outros países da América Central, entre outras tantas denominações populares citadas por diferentes autores (ALVARADO, 2009).

O Mogno Brasileiro vem sofrendo excessiva exploração ilegal, colocando-a entre as espécies em risco de extinção. Além disso, possui dificuldade de regeneração natural e de estabelecimento em reflorestamentos, sendo atacado por larvas de *Hypsipyla grandella* Zellar (Lepidoptera, Pyralidae) (BRUNETTA et al., 2006; SCHOTTZ et al., 2007).

Programas de reflorestamento e condução de regeneração natural com Mogno visando à comercialização não têm obtido sucesso devido, principalmente ao problema da broca-das-meliáceas, *Hypsipyla grandella* Zeller, que destroem a gema terminal das plantas jovens, acarretando a redução do vigor e podendo ocasionar a ramificação do tronco, inutilizando o fuste ou diminuindo o seu valor comercial (COUTO, 2002; WALLAU et al., 2008).

O ataque dessas larvas já resultou em problemas econômicos para o Brasil que é o produtor líder de quatro madeiras em todo o mundo. Em uma tentativa de evitar tais consequências no futuro, centros de pesquisa, como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - tem avaliado a substituição de cultivares de *S. macrophylla* para as árvores do gênero *Khaya*, ou seja, o Mogno Africano, que não são afetadas pela broca *H. grandella* (RECHE et al., 2009).

No entanto, recentemente, árvores de *Khaya* foram encontrada em Salvador, Bahia, Brasil, infectadas por um novo patógeno microbiano. O provável microorganismo envolvido foi identificado como *Botryosphaeria rhodina*, com base em morfologia, seqüências de DNA e dados patológicos. A infecção ocorre por meio de feridas ou diretamente por meio dos estômatos e outras aberturas. Esses fungos podem então persistir no tecido saudável seguido pela infecção da planta que geralmente resultada no desenvolvimento de ramos

laterais numerosas e, conseqüentemente, em árvores mal formadas, impróprias para a produção de madeira, e, em alguns casos a morte da árvore (RECHE et al., 2009).

A demanda pela madeira do Mogno e o conseqüente extrativismo cresceram significativamente nos anos mais recentes. Enquanto os estoques permaneceram limitados à população natural e a sua regeneração. Mais recentemente, devido ao incremento da demanda, aos problemas ambientais decorrentes do extrativismo desordenado e ao valor comercial da madeira, o cultivo dessa espécie tem aumentado significativamente (TUCCI; LIMA; LESSA, 2009).

De acordo com Couto et al. (2004), a falta de uma política ambiental mais severa, de conhecimentos técnicos e de consciência ecológica pode levar à exploração desordenada das florestas da Amazônia, com conseqüente diminuição da biodiversidade e perdas de recursos genéticos de espécies com elevados valores econômicos, além de acarretar problemas ambientais, como a redução da cobertura florestal e a destruição dos mananciais hídricos, prejudicando a fauna e a flora, principalmente as espécies com risco de extinção. Como a exploração é realizada de forma indiscriminada, buscando espécies de alto valor econômico, alterações drásticas dos ecossistemas dessa formação florestal têm ocorrido, colocando em perigo de extinção várias espécies como, por exemplo, o Mogno (ROCHA; QUOIRIN, 2004).

O Mogno é, ainda, uma das espécies mais exploradas no país, portanto, ameaçada de extinção por não estar havendo renovação na mesma proporção da exploração da árvore nativa. A necessidade de se investir esforços no desenvolvimento de pesquisas sobre a produção de mudas de Mogno para fins de reflorestamento é essencial. O êxito dos projetos de florestamento e reflorestamento depende de vários fatores, mas a qualidade das mudas levadas ao campo é de extrema relevância. Isto exige informações sobre a silvicultura

das espécies nos diversos campos do conhecimento. Grande parte dos cultivos isolados ou consorciados fracassou por problemas relativos às condições de cultivo, entre os quais a qualidade das mudas (BARBOSA et al., 2010).

A propagação dessa espécie por meio de sementes, por exemplo, esbarra na difícil execução de coletas devido ao porte da árvore e à perda da viabilidade em um curto espaço de tempo. Para as espécies que apresentam esses problemas, que impedem uma rápida reposição natural, a micropropagação *in vitro* aparece como ferramenta importante para suprir essas dificuldades (LAMEIRA et al., 2006).

Os pesquisadores têm encontrado dificuldades em estabelecer procedimentos para a propagação *in vitro* do Mogno, considerando-se, em parte, a escassez de trabalhos publicados nessa linha de pesquisa. No entanto, a falta de conhecimentos dos principais processos básicos da germinação que ocorrem nas sementes de espécies nativas tem dificultado a realização das metas dos programas de reflorestamento, devido às dificuldades encontradas durante o processo de produção de mudas em viveiro ou laboratório. As espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente se for utilizado material vegetal proveniente de plantas adultas, pois podem apresentar infestação interna ou externa por microrganismos (COUTO et al., 2004).

2.3 Cultura de tecidos

A busca de alternativas para a produção de mudas de Mogno tem sido um grande desafio para os pesquisadores florestais. A cultura de tecidos é uma dessas alternativas técnicas, pois pode ser usada como ferramenta para propagar espécies vegetais arbóreas que apresentam problemas que vão da produção, armazenamento, germinação até a patologia das sementes (COUTO, 2002).

Entre as técnicas biotecnológicas, a micropropagação é a mais difundida e a que possibilita obter plantas do mesmo genótipo em larga escala e em um curto espaço de tempo, preservando a identidade do material genético e favorecendo o melhoramento da espécie (LAMEIRA et al., 2006). Com a utilização da multiplicação *in vitro*, existe a possibilidade de facilitar a propagação do Mogno e, conseqüentemente, viabilizar a produção de mudas em larga escala e curto espaço de tempo (ROCHA; QUOIRIN, 2004).

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) (ROSA, 2009). Como exemplo de trabalhos envolvendo a micropropagação de plantas lenhosas pode-se citar trabalhos com pau-brasil por Pessotti et al. (2007) e Werner et al. (2007). Entretanto, no que se refere ao cultivo *in vitro* do Mogno, pouco se sabe a respeito da metodologia para regeneração de plantas (ROCHA; QUOIRIN, 2004).

Em associação com outras técnicas da cultura de tecidos de plantas a micropropagação permite a obtenção, em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, de grande número de plantas com boa qualidade fitossanitária e autenticidade varietal. O sucesso da multiplicação depende não só dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos) como, também, das condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida e do meio de cultura apropriado que permite a indução, a multiplicação e o crescimento das brotações adventícias. As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* variam de espécie para espécie, e de variedades, até mesmo dentro da própria planta, o que torna necessária a otimização dos meios de cultura (NAGAO; PASQUAL; RAMOS, 1994).

Nos tecidos vegetais utilizados como explantes, a desdiferenciação celular pode resultar na formação de calos com células ou grupos de células competentes. Quando estas são transferidas para meios indutores, tornam-se determinadas, podendo regenerar muitos indivíduos por meio de processos fisiológicos envolvendo embriogênese e organogênese (ANDRADE, 2002; PERES, 2002; ROCHA; QUOIRIN, 2004).

Organogênese é uma via de desenvolvimento na qual órgãos vegetais (brotos, raízes) ou ambos são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células. A organogênese pode ser direta ou indireta. Na direta, também chamada adventícia, o órgão vegetal é induzido e desenvolve diretamente de um explante, isto é, sem passar por uma fase inicial de calo. Na indireta, há uma fase inicial de proliferação e crescimento de calo seguida por indução de brotos ou raízes e desenvolvimento desses tecidos. Calo é um grupo ou massa de células, com crescimento desordenado que pode apresentar certo grau de diferenciação (ANDRADE, 2002).

Os calos podem conter células ou grupos de células que possuem centros ativos de divisão celular. Em condições adequadas, esses centros são induzidos e se capacitam para produção de órgãos; em alguns casos, os centros são apenas estimulados. As células que são capazes de responder a determinados estímulos são denominadas competentes; nelas podem ocorrer a diferenciação celular e a formação de brotos ou raízes. A competência é o primeiro passo para a diferenciação celular; o segundo é a indução da transformação em células competentes (ROCHA; QUOIRIN, 2004).

A embriogênese somática é uma via de desenvolvimento na qual a formação de embriões é induzida de células somáticas. Como a organogênese, a embriogênese somática pode ocorrer diretamente de um explante sem o aparecimento de calos. Entretanto, a via de embriogênese indireta, na qual embriões somáticos são induzidos e desenvolvidos de proliferações de calos é

mais comum. Assim, como ocorre na organogênese, certo período de tempo é necessário para desdiferenciar e obter competência para a via embriogênica, iniciada de uma cultura celular (ANDRADE, 2002).

Além disso, a embriogênese somática pode ser usada para regeneração de plantas em alta escala, principalmente nas plantas com longo período juvenil, elevado porte e com baixa produção de sementes por ano, sendo estas características observadas em pau-brasil. Embriogênese somática pode ser definida como um processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão de gametas (PESSOTTI et al., 2007).

A determinação dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura é o fator mais importante no desenvolvimento de embriões. Os reguladores de crescimento exercem grande influência durante todo processo de embriogênese somática, principalmente nas etapas de proliferação, manutenção e diferenciação dos calos (PÁDUA, 2012). As auxinas, principalmente 2,4-D, estão envolvidas com a indução e a iniciação de embriões somáticos, são necessárias para a formação de agregados embriogênicos, a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (KOMAMINE et al., 1992).

Para Andrade (2002), outra via de regeneração é a micropropagação tomando-se como base explantes meristemáticos. Essa via tem a vantagem de as plantas regenerarem diretamente de um tecido organizado sem a necessidade do estágio de calo. Desse modo, tem-se uma economia de tempo, bem como se elimina a variação somaclonal, que é associada a longos períodos de cultura de calos.

Na manutenção e multiplicação *in vitro* de segmentos nodais a escolha dos meios e cultura e combinações de reguladores de crescimento são

fundamentais, visto que é o meio de cultura que supre as necessidades nutricionais para o crescimento da planta.

Para espécies lenhosas, entre os principais meios de cultura básicos mais utilizados nas diferentes fases da propagação *in vitro* estão o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (WOOD PLANT MEDIA) (LLOYD; MCCOWN, 1980) com redução nas concentrações de sais. Pinto (2012) afirma que as soluções de sais que compõem o meio de cultura não exercem somente um efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas.

Além dos componentes básicos utilizados nos meios de cultura, o uso de reguladores de crescimento propicia modificações nos padrões de desenvolvimento do explante vegetal. Na multiplicação meristemática a utilização das citocininas, como BAP, é indispensável à divisão celular, superação da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (PINTO, 2012). Além das citocininas, o uso de auxinas é importante na indução da divisão e diferenciação celular, pois atuam na expansão e alongamento das células, contribuindo também na formação de raízes.

As técnicas de cultura de tecido vegetal constituem-se, portanto, em ferramentas alternativas importantes que podem ser utilizadas para a produção em larga escala e em curto espaço de tempo de mudas de espécies arbóreas, como o Mogno.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Atualmente o Mogno vem se destacando no mercado pela alta valorização da madeira, sendo seu uso destinado para confecções de móveis finos, instrumentos musicais, embarcações marítimas entre outros fins. Entretanto, no aspecto comercial necessita-se de estudos que aperfeiçoem a produção em larga escala da espécie, devido sua dificuldade de propagação e regeneração.

Para diversas espécies florestais têm-se obtido resultados que indicam a possibilidade de produção, em altas taxas de multiplicação e tempo reduzido, por meio da Cultura de Tecidos Vegetal. A técnica biotecnológica de propagação *in vitro* permite a produção em massa de indivíduos com características genéticas desejáveis e com alto padrão de sanidade das mudas.

Dentre os métodos que podem ser empregados na micropropagação, destacam-se a embriogênese somática e a multiplicação meristemática *in vitro*.

Apesar de alguns estudos já realizados e em andamento estarem sendo feitos e de muitos autores já terem proposto uso de meios de cultivo com combinações nutricionais e de reguladores de crescimento para clonagem do Mogno, dificuldades ainda são encontradas, uma vez que as condições variam amplamente entre os genótipos das plantas e sistemas de cultura. Com o intuito de produzir mudas de Mogno, comerciais, em larga escala, é consenso que há uma necessidade de aperfeiçoar metodologias e estudos envolvendo a micropropagação *in vitro* que maximizem a produção de Mogno.

REFERÊNCIAS

ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 122, n. 2, p. 151-164, June 2004.

ALMEIDA, A. N. et al. Madeiras tropicais: substituição do Mogno no mercado internacional. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIEDADE RURAL, 45., 2007, Londrina. **Anais...** Londrina: UEL, 2007. 1 CD-ROM.

ALVARADO, J. R. **Dendrocronologia de árvores de Mogno, *Swietenia macrophylla* King., Meliaceae, ocorrentes na floresta tropical Amazônica de Departamento de Madre de Dios, Peru**. 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2002. 16 p.

BACHA, C. J. C. Análise da evolução do reflorestamento no Brasil. **Revista de Economia Agrícola**, São Paulo, v. 55, n. 2, p. 5-24, jul./dez. 2008.

BARBOSA, M. de C. R. et al. **Revisão de literatura do cultivo e usos da madeira do Mogno (*Swietenia macrophylla* King.)**. Disponível em: <<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/Mogno%20Cultivo%20e%20uso%20da%20madeira.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

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 α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 19-24, ago. 2006.

CORDEIRO, Y. E. M. **Potencial de uso em recuperação de áreas degradadas: um estudo três espécies nativas da Amazônia Oriental sob dois regimes hídricos**. Belém: UFAM, 2012. 89 p.

COUTO, J. M. F. **Germinação e morfogênese *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2002. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e Germinação *in vitro* de sementes de Mogno (*Swietenia macrophylla* king). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 5, p. 633-642, set./out. 2004.

DINIZ, E. M. Brasil, a mudança do clima e o período pós-Quito. **Economia & Tecnologia**, Campinas, ano 7, n. 24, p. 159-165, jan./mar. 2011.

FEARNSIDE, P. M. Fogo e emissão de gases de efeito estufa dos ecossistemas florestais da Amazônia brasileira. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 16, n. 44, p. 99-123, 2002.

FRIMPONG-OPUNI, E. et al. Key roles of leaves, stockplant age, and auxin concentration in vegetative propagation of two African mahoganies: *Khaya anthothesca* Welw. and *Khaya ivorensis* A. Chev. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 115-123, Sept. 2008.

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, set. 2002.

KOMAMINE, A. et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cell & Development Biology Plant**, Wallingford, v. 28, p. 11-14, Jan. 1992.

LAMEIRA, O. et al. Efeito de substratos na germinação *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* KING). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 15-19, 2006.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-427, 1980.

MACHADO, R. B.; LAMAS, I. R. Avifauna associada a um reflorestamento de eucalipto no município de Antônio Dias, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ornitologia**, Ararajuba, v. 4, n. 1, p. 15-22, jun. 1996.

MENDES, F. et al. Níveis de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de mogno (*Swietenia macrophylla* King R.A) induzidas ao estresse hídrico e a reidratação. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 939-941, jul. 2007. Suplemento.

MIRANDA, E. M.; MIRANDA, K. R. **Propagação vegetativa do Mogno (*Swietenia macrophylla* king) por enraizamento de estacas semilenhosas em câmara úmida**. Rio Branco: EMBRAPA Acre, 2000. 15 p. (Circular Técnica, 32).

MOUTINHO, P. et al. **As oportunidades para a Amazônia com a redução das emissões de gases do efeito estufa**. Belém: IPAM, 2001. 8 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “*in vitro*” de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.

PÁDUA, M. S. **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendêzeiro (*Elais guineensis* Jacq.)**. 2012. 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PERES, L. E. P. Regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 25, p. 44-48, mar./abr. 2002.

PESSOTTI, K. V. et al. Indução e expressão da embriogenese somática em *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1056-1058, jul. 2007.

PINTO, F. **Calogênese e indução de gemas axilares em Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2012. 88 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

RASCON, N. et al. Atividade da redutase do nitrato em folhas de plantas jovens de mogno (*Swietenia macrophylla* King R.A) submetidas ao estresse hídrico e à reidratação. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 930-932, jul. 2007. Suplemento

RECHE, K. V. G. et al. Methyl angolensate changes in *Khaya ivorensis* after fungal infection. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n. 17/18, p. 2027-2033, Dec. 2009.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de Mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 91-101, 2004.

ROSA, F. C. **Superação da dormência de sementes e cultivo *in vitro* de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. 2009. 51 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SCHOTTZ, E. et al. Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* KING (Meliaceae) a partir de material juvenil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 109-117, abr./jun. 2007.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. **Florestas do Brasil em resumo 2010: dados de 2005-2010**. Brasília, 2010. 152 p.

SILVA, B. T. B. **Avaliação da usinagem e caracterização das propriedades físicas da madeira de Mogno Africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.)**. 2010. 20 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

SILVA, M.; SIQUEIRA, E. R.; COSTA, J. L. da S. Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiana de um solo submetido a reflorestamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1493-1496, set./out. 2004.

TUCCI, C. A. F.; LIMA, H. N.; LESSA, J. F. Adubação nitrogenada na produção de mudas de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 289-294, 2009.

VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R. **A exploração de um recurso florestal amazônico de alto valor: o caso do mogno**. 2. ed. Belém: C. Uhl, 2002. 166 p.

WALLAU, R. L. R. et al. Sintomas de deficiências nutricionais em mudas de Mogno cultivadas em solução nutritiva. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 4, p. 304-310, out./dez. 2008.

WERNER, E. T. et al. Indução da calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1053-1055, jul. 2007. Suplemento

ZHANG, H. et al. Anticancer activity of limonoid from *Khaya senegalensis*. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 8, p. 731-734, Aug. 2007.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Produção de mudas de Mogno (*Khaya senegalensis*) via cultura de meristemas

EMANUELLE TAÍS DA SILVA SOUZA¹

ARTIGO normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003)

¹ Email : manutsouza@yahoo.com.br.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter a micropropagação *in vitro* de meristemas de Mogno Africano. Para obtenção de explantes meristemáticos, sementes de Mogno Africano foram esterilizadas e germinadas em meio MS. As sementes permaneceram por 30 dias nas condições do tratamento e após este período as plântulas obtidas pela germinação *in vitro* foram incisadas, e os segmentos nodais utilizados para multiplicação de Mogno. Segmentos nodais jovens selecionados de plantas cultivadas em casas de vegetação também foram usados como fonte de explantes meristemáticos. Estes foram desinfetados e inoculados em meio MS com alterações nas condições nutritivas do meio original, com presença e ausência de reguladores de crescimento (BAP, AIA e AIB) em diferentes concentrações. Os segmentos isolados foram avaliados quanto ao crescimento e sobrevivência nos meios utilizados. Resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos, no entanto os explantes com crescimento médio superior ocorreu no meio MS com adição de BAP e AIA. Para multiplicação de meristemas obtidos via sementes, foram testados dois meios, MS e WPM com ausência e presença de BAP em diferentes concentrações. Para promover o alongamento dos meristemas de Mogno, foi utilizado o meio MS com combinações e variações de BAP, ANA e GA3. Para a multiplicação e alongamento dos meristemas, avaliou-se a altura das plântulas, vigor e número de gemas axilares. De acordo com os parâmetros avaliados, os melhores índices de multiplicação dos meristemas foram obtidos quando utilizado meio MS com BAP na concentração de $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$. O meio MS com adição de GA3 foi melhor em relação aos demais tratamentos para o alongamento dos explantes meristemáticos.

Palavras-chave: Meristemas. Sementes. Multiplicação. Alongamento.

1 INTRODUÇÃO

A madeira Mogno é hoje uma das mais valorizadas no mercado nacional e internacional, devido as suas qualidades comerciais, como, coloração da madeira, estabilidade dimensional e características que facilitam o acabamento proporcionam diversidade de uso, na confecção de móveis finos, nos trabalhos arquitetônicos e paredes ornamentais, botes e barcos, molduras, cofres, esculturas torneadas ou entalhadas e instrumentos musicais, particularmente piano, entre outras finalidades (LAMEIRA et al., 2006; COUTO (2002).

A elevada importância comercial do Mogno e sua vulnerabilidade ecológica têm sido objetivos de intensa polêmica sobre como garantir a conservação e o uso sustentável dessa espécie. Assim, Merkle et al. (2005), afirmam que a biotecnologia florestal empregada para espécies arbóreas poderá aumentar a disponibilidade de madeiras nas áreas manejadas, reduzindo a pressão de degradação nas florestas nativas.

As modernas técnicas biotecnologias, em particular a Cultura de Tecidos tem causado um forte impacto sobre a produção de plantas em larga escala e inúmeros protocolos foram estabelecidos visando à produção comercial, bem como viabilização, recuperação e preservação de espécies que se encontram ameaçadas de extinção (SOUZA et al., 2007).

Segundo Pinto (2012), a técnica está embutida nos programas de melhoramento que, na maioria das vezes, objetivam a manutenção ou a maximização do valor genético do clone a ser propagado, permitindo acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa. Ainda na

concepção da autora, por meio da Cultura de Tecidos é possível obter plantas idênticas geneticamente à planta-mãe utilizada como material vegetal, livre de pragas e doenças, a técnica permitindo a produção de mudas saudáveis em espaço físico reduzido, além de ser altamente conveniente na manutenção de coleção de plantas de genótipos diferentes.

Nos últimos anos, vários trabalhos vêm sendo feitos com diversas espécies arbóreas, na tentativa de otimização dos protocolos de micropropagação *in vitro*. Uma das maneiras de obter material vegetal de origem para propagação de Mogno seria o uso de meristemas de plantas adultas de Mogno Africano. Mas espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente quando utilizado material vegetal de plantas adultas, pois podem apresentar infestação interna ou externa por microrganismos (COUTO, 2002). Além disso, é um desafio determinar qual melhor meio e concentração de auxinas que, combinada ou não com a citocinina BAP proporciona melhores resultados na clonagem *in vitro* de Mogno. Dentre as auxinas mais usadas nos meios para isolamento e multiplicação meristemática de diversas espécies vegetais, destacam-se ANA, AIB e AIA (Hu et al., 1983).

Outra maneira de se obter o material vegetal para a multiplicação *in vitro* do Mogno seria o uso de sementes. No entanto, o processo de germinação é um mecanismo que depende de fatores, como a segregação, viabilidade das sementes e a composição ideal do meio de cultura utilizado, devido aos componentes minerais, vitaminas e reguladores de crescimento vegetal necessários para germinação (RAMAGE et al., 2002; BEWLEY et al., 1984; GUI-FERREIRA et al., 2004).

Segundo Junior et al. (2012), durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares, que compõem os meios de cultura, não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas. Para eles, em se tratando da germinação de sementes *in vitro*, a concentração de sais no meio de cultura influencia na passagem de água durante a fase inicial de embebição.

Além das necessidades nutricionais para germinação das sementes, cuidados também são fundamentais para manutenção e multiplicação de plântulas de Mogno cultivadas *in vitro*. Existem alguns trabalhos que relatam a necessidade de modificações na composição do meio de cultivo ou a utilização de meios alternativos ao meio base MS.

Grattapaglia et al. (1998), afirmam que em espécies lenhosas, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos, e que composições mais diluídas dos sais apresentam melhor desempenho. Pinto (2012) coloca como exemplos, Maruyama et al. (1997) que utilizaram o meio WPM na multiplicação de meristemas e Valverde-Cerdas et al. (1998), que usaram o meio MS mas com a concentração de sais reduzida à metade. O meio nutritivo WPM, por exemplo, apresenta 25% das concentrações dos íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, tendo sido amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas PASQUAL (2001).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo comparar meios de cultura, com diferentes combinações de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de explantes de Mogno Africano obtidos por meio

da germinação de sementes e de segmentos nodais obtidos de plantas jovens cultivadas em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) localizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras – MG, e no laboratório da empresa privada BIOCELL, especializada em multiplicação *in vitro* de espécies vegetais, localizada em Sete Lagoas – MG.

2.1 Material Vegetal

Para realização do trabalho foram utilizados como material vegetal plântulas obtidas via germinação de sementes de Mogno Africano (*Khaya senegalensis*) adquiridas no mercado, e segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento seccionados de plantas jovens de Mogno Africano (*Khaya senegalensis*) cultivadas em casa de vegetação.

Para a germinação asséptica das sementes Mogno foi utilizado tratamento de esterilização segundo Couto et al. (2004) e Filho et al. (1998), submetendo-se as sementes com tegumentos à imersão em água corrente durante 15 minutos. Dentro de Câmara de Fluxo Laminar as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial 50% por 20 minutos, em seguida os tegumentos foram retirados, e as sementes foram imersas em álcool 70 % (v/v) por 1 minuto. Posteriormente as sementes foram mergulhadas em hipoclorito de sódio com gotas de Tween 20 durante 30 minutos, e, por último, após o procedimento de desinfestação, as sementes foram submetidas a um triplo enxágüe com

água estéril, antes das suas transferências ao meio de cultivo, para a remoção de resíduos das soluções desinfestantes.

As sementes foram transferidas para frascos contendo 50 mL de meio de cultura com a parte côncava voltada para baixo de acordo com Couto (2002) em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962). Os meios foram solidificados com 0,6% de Agar e o pH ajustado pra 5.8 antes da autoclavagem a 121⁰C por 20 minutos. Após a transferência das sementes para os meios, os frascos foram mantidas sob condições controladas de luminosidade em fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 26±2°C.

Após 30 dias da germinação *in vitro* das sementes de Mogno Africano, os segmentos nodais foram incisados e utilizados como fonte de explantes.

Para isolamento de segmentos nodais seccionados de plantas jovens de Mogno Africano cultivadas *in vivo* foi realizado processo de esterilização. O material vegetal foi exposto a solução de 50% hipoclorito de sódio comercial, 50% de água e 5 gotas de detergente a cada 500mL, por 15 minutos sob agitação. Posteriormente, os segmentos nodais foram colocados por 10 minutos em água destilada autoclavada sob agitação e após esse período, transferidos para solução 75% de água destilada autoclavada e 25% de hipoclorito comercial por 10 minutos sob agitação. Foram realizados tríplexes enxágues em água destilada autoclavada, por 10 minutos em agitação, para remoção de resíduos desinfetantes.

2.2 Meios de cultura testados

Os explantes meristemáticos esterilizados, obtidos de plantas cultivadas em casas de vegetação, foram inoculados em frascos com 50mL de meio de cultura MS, contendo ausência e combinações de reguladores de crescimento, BAP (6-benziladenina), AIA (Ácido indolacético) e AIB (Ácido indolbutírico) em diferentes concentrações, de acordo com a Tabela 1. Os meios foram solidificados com 0,6% de Agar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121⁰C por 20 minutos. Os frascos com o material vegetal foram mantidos sob condições controladas de luminosidade e temperatura. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

Tabela 1 Meios de cultura utilizados nos tratamentos para avaliar a regeneração de meristemas obtidos de plantas jovens de Mogno Africano cultivadas em casa de vegetação

Meios de cultura	Tratamento	Concentração BAP (mg.L⁻¹)	Concentração AIB (mg.L⁻¹)	Concentração AIA (mg.L⁻¹)
MS	T1	0	0	0
	T2	0,50	0	0
	T3	1,00	0	0
	T4	0,50	0,25	0
	T5	0,50	0	0,25
MS (1/2 força)	T6	0	0,25	0

Para obter um melhor meio para multiplicação *in vitro* de Mogno Africano, os segmentos meristemáticos obtidos via germinação de sementes foram inoculados em meios de cultura para multiplicação, MS e WPM (Wood Plant Media, 1980) com ausência e combinações do regulador de crescimento (BAP) em escalada gradativa de concentração como apresentado na Tabela 2, de acordo adaptações de metodologias utilizadas por Schottz et al. (2007) e Couto (2002). Os meios foram solidificados com 0,6% de Agar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121⁰C por 20 minutos. Os explantes foram mantidos sob condições controladas de luminosidade e temperatura. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

Tabela 2 Composição dos meios de cultura utilizados na multiplicação de meristemas obtidos de plântulas oriundas da germinação *in vitro* de sementes de Mogno Africano

Meios de cultura	Tratamentos	Concentrações BAP (mg.L ⁻¹)
MS	T1	0
	T2	0,25
	T3	0,50
	T4	1,00
WPM	T5	0
	T6	0,25
	T7	0,50
	T8	1,00

Os explantes vegetais obtidos pela micropropagação *in vitro* de Mogno Africano foram inoculados no meio de cultura MS para estimular o alongamento do tecido, contendo a ausência e combinações de reguladores de crescimento, BAP, GA₃ (Ácido giberélico) e ANA (Ácido naftalenoacético), em diferentes concentrações como apresentado na Tabela 3. Os meios de cultivo foram solidificados com 0,6% de Agar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121⁰C por 20 minutos. Os frascos com os explantes foram mantidos sob condições controladas de luminosidade e temperatura. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

Tabela 3 Composição dos meios de cultura utilizados para alongamento de meristemas de Mogno Africano

Meio de cultura	Tratamentos	Concentrações BAP (mg.L ⁻¹)	Concentrações ANA (mg.L ⁻¹)	Concentrações GA ₃ (mg.L ⁻¹)
MS	T1	0	0	0
	T2	0	1,00	0
	T3	0	0	20,00
	T4	0	1,00	20,00
	T5	0,50	0	0
	T6	0,50	1,00	0
	T7	0,50	0	20,00
	T8	0,50	1,00	20,00

2.3 Parâmetros avaliados

A avaliação da altura, e sobrevivência dos explantes meristemáticos obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação, foi feita aos 20 dias de cultivo.

Foram realizadas avaliações do desenvolvimento dos explantes meristemáticos desenvolvidos nos meios de cultura para multiplicação e alongamento, quanto ao número de brotos formados e altura em centímetros. As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias de cultivo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de meristemas de plantas jovens cultivadas *in vivo*

Para o isolamento de meristemas incisados de plantas jovens de Mogno Africano cultivadas em casas de vegetação, foi utilizado meio MS com ausência e adição de reguladores de crescimento (BAP, AIB e AIA) em diferentes concentrações e combinações.

Observou-se alta taxa de contaminação por microorganismo endógenos em todos os tratamentos utilizados como mostra a Tabela 4.

Embora tenha sido elevada a porcentagem de contaminação, os explantes restantes foram analisados aos 20 dias de cultivo e os dados apresentados na Tabela 5 mostram que no tratamento MS com 0,50 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de AIA houve melhor crescimento dos segmentos inoculados.

Resultados mostraram que a maior sobrevivência dos segmentos inoculados e resistentes às contaminações foram nos tratamentos MS e MS com 0,50 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de AIA.

Tabela 4 Efeito contaminação de explantes meristemáticos de Mogno Africano nos diferentes tratamentos testados

Tratamentos	Explantes contaminados (%)
1	71,42
2	85,71
3	85,71
4	85,71
5	71,42
6	85,71

Tabela 5 Efeito de diferentes concentrações e combinações de BAP, AIB e AIA em meio MS na altura de explantes meristemáticos de Mogno Africano

Tratamentos	Altura	% Sobrevivência
MS	2,16 ^d	21,4 ^a
MS + 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP	2,50 ^c	7,15 ^b
MS + 1,00 mg.L ⁻¹ de BAP	2,75 ^b	7,15 ^b
	2,00 ^e	7,15 ^b
MS + 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg.L ⁻¹ de AIB		
	3,33 ^a	28,5 ^a
MS + 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg.L ⁻¹ de AIA		

	2,00 ^e	7,15 ^b
MS ½ força + 0,25 mg.L ⁻¹ de AIB		

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05).

Diversos estudos indicam o uso de segmentos nodais cotiledonares como explantes bastante responsivos para clonagem de plantas (JHA et al., 2004; HUSAIN et al., 2007). No entanto há serias dificuldades em se obter a regeneração de meristemas devido à necessidade fisiológica de cada espécie e processo eficiente de esterilização, fato que pôde ser observado no presente trabalho. Esse resultado corrobora com Léon (2010) quando afirma que a esterilização é uma etapa problemática, pois a solução desinfetante deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal, sem danificar o mesmo. Ainda segundo Léon (2010), em alguns casos, são utilizadas algumas gotas de detergente, adicionadas às soluções à base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos, bem como para diminuir a oxidação do material vegetal.

Além da citocinina BAP usada para estimular a brotações em explantes vegetais, para Quoirin et al. (1977), as auxinas podem ser necessárias na obtenção de melhores resultados na fase de multiplicação. Lundergan et al. (1979) afirmam que as auxinas ajudam a aumentar o tamanho das brotações. Pretendia-se neste trabalho, com a composição dos tratamentos utilizados, encontrar o melhor balanço auxina/citocinina para estimular o desenvolvimento dos explantes isolados. Quoirin et al. (1977) afirmam que, embora nem sempre as auxinas sejam necessárias no meio de multiplicação, elas são usadas para estimular o crescimento das partes aéreas. Dessa maneira foram escolhidas duas auxinas, AIB e AIA, que segundo Amaral (2006), são largamente utilizadas para proliferação de gemas axilares de espécies vegetais.

No entanto, no presente trabalho, a adição de auxinas AIB nos tratamentos não promoveu o crescimento de explantes meristemáticos como esperado, apenas quando se utilizou AIA.

Bastos et al. (2007) trabalhando com segmentos internodais de *Hancornia speciosa* (mangabeira), proporcionou a formação *in vitro* de maior número de brotações adventícias como também o maior comprimento médio das brotações, quando utilizou a combinação de BAP e AIA adicionada ao meio MS. Moraes et al. (2011) trabalhando com orquídeas obteve brotos laterais em estacas utilizando a auxina AIA. Albarrán et al. (1997) obtiveram o desenvolvimento de gemas axilares para o Mogno em meio suplementado com BAP e AIA, ambos a 2,0

mg.L⁻¹. Assim como Lee et al. (1988) que ao estudarem a

micropropagação de Mogno com utilização de segmentos nodais, em

meio suplementado com BAP de 0,1 a 1 mg.L⁻¹ obtiveram a indução de

brotações múltiplas.

Apesar das revisões de literatura e dos resultados obtidos com esse trabalho, é notório que mais estudos na fase de isolamento devem ser feitos, baseados principalmente no balanço auxina/citocinina, visto que,

para os tipos e concentrações usados, não houve resposta no desenvolvimento dos explantes. Ao que parece, as concentrações de auxina a serem testadas, mesmo na fase de indução, deverão ser maiores do que as usadas neste experimento para o sucesso na multiplicação do Mogno.

3.2 Multiplicação dos meristemas oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação de sementes *in vitro*

Com o objetivo de avaliar a melhor composição de meio de cultura que viabilizasse a formação de brotações adventícias em explantes meristemáticos de Mogno Africano, analisaram-se os parâmetros, número de brotos e crescimento dos explantes. Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos utilizando meios MS e WPM com presença e ausência de BAP em diferentes concentrações, mostraram diferença significativa a 5% de probabilidade entre os tratamentos testados, conforme apresentados na Tabela 6.

Como podem ser observados na Tabela 6 e Figura 1, os tratamentos com meios MS e WPM sem adição de BAP promoveram melhor altura após inoculação. Foi possível notar que quando usado a citocinina BAP e em concentrações crescentes, os explantes tenderam a desenvolver menor altura. Ainda na Figura 1, com referencia no efeito da multiplicação de explantes meristemáticos de Mogno, pode ser observado

que o meio MS com $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentou melhor resultado

quanto ao número de brotos formados. Apesar de a imagem demonstrar uma proporção maior dos explantes desenvolvidos do meio MS com 1

mg.L^{-1} de BAP, estes apresentavam estruturas com menos brotações,

semelhantes à calos.

De modo geral, os tratamentos utilizando meios MS se sobressaíram em comparação aos WPM quanto ao número de brotações desenvolvidas. O melhor meio para multiplicações nos tratamentos

utilizando meio de cultura WPM foi quando se adicionou $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de

BAP, como pode ser visto na Figura 2.

Tabela 6 Efeito de diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS e WPM na altura e número de brotos de explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 21 dias de cultivo

Tratamentos	Altura (cm)	Números de brotos
MS	3,05 ^a	5,33 ^g
	2,93 ^b	9,55 ^c
MS + 0,25 mg.L ⁻¹ de BAP		
	2,49 ^d	14,2 ^a
MS + 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP		

	1,96 ^h	10,4 ^b
MS + 1,00 mg.L ⁻¹ de BAP		
WPM	2,76 ^c	5,33 ^g
	2,11 ^g	6,78 ^d
WPM + 0,25 mg.L ⁻¹ de BAP		
	2,33 ^e	6,53 ^e
WPM + 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP		

	2,22	f	6,31	f
WPM + 1,00 mg.L ⁻¹ de BAP				

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

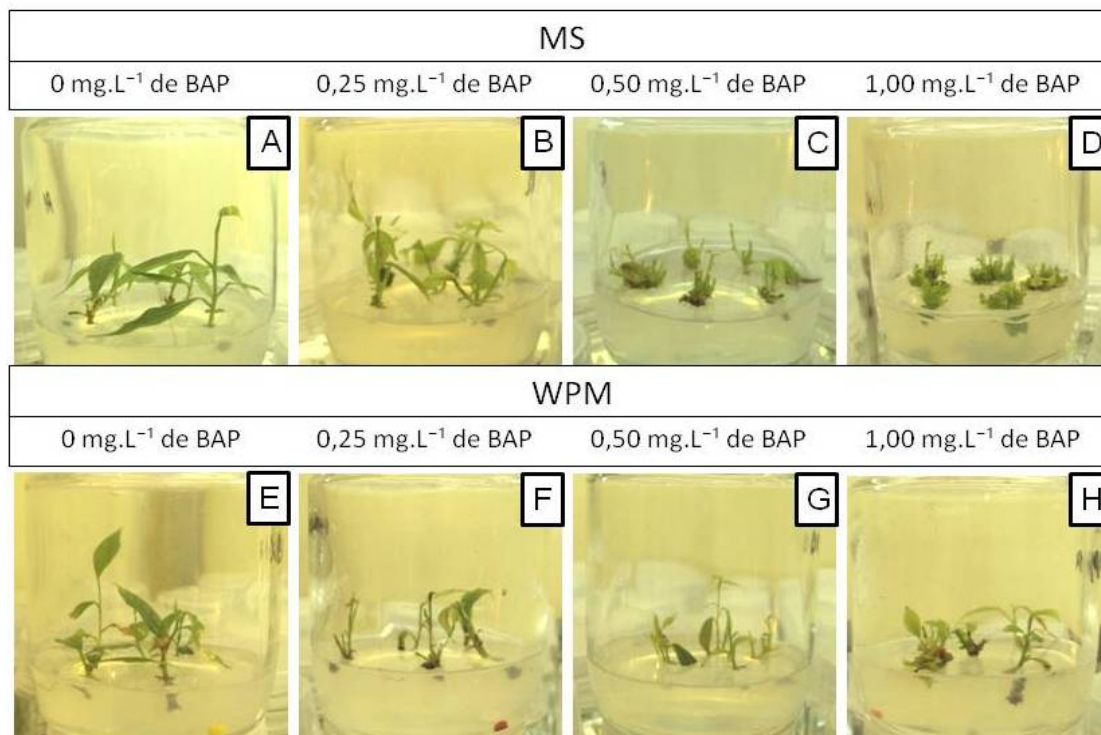
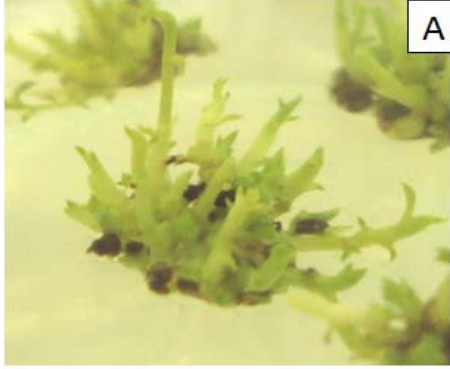
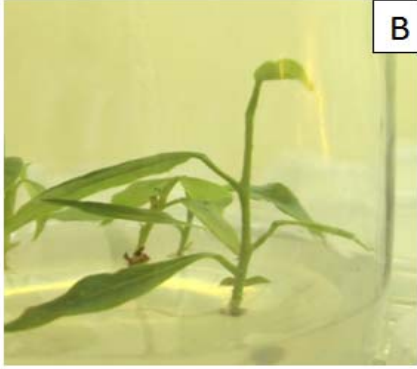


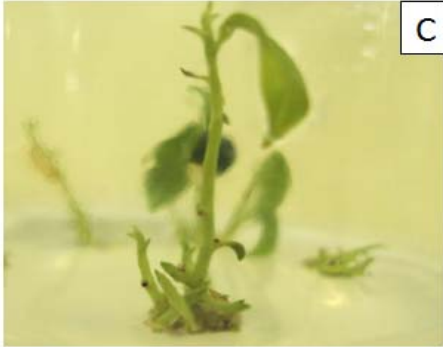
Figura 1 Desenvolvimento de explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 21 dias pós inoculação, nos diferentes tratamentos **A** e **E** (0 mg.L^{-1} de BAP); **B** e **F** ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP); **C** e **G** ($0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP) e **D** e **H** ($1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP)



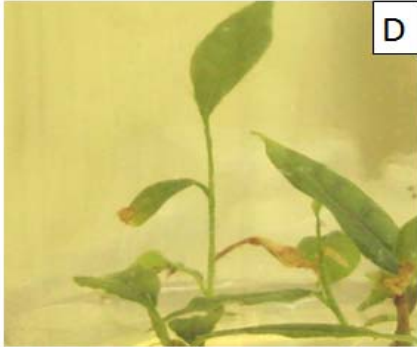
A



B



C



D

Figura 2 Características dos explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 21 dias de cultivo **A** Meio MS com 0,50 mg.L⁻¹ de BAP (melhor resultado para MS); **B** Meio MS com 0 mg.L⁻¹ de BAP (pior resultado para MS); **C** Meio WPM com 0,25 mg.L⁻¹ de BAP (melhor resultado para WPM); **D** WPM com 0 mg.L⁻¹ de BAP(pior resultado para WPM)

Para expor melhor os resultados obtidos nesse trabalho, a fim de demonstrar a evolução dos explantes desenvolvidos nos diferentes meios de cultura para multiplicação, as Figuras 3 e 4 apresentam os valores obtidos para avaliação da altura e número de brotos dos explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 7, 14 e 21 de cultivo.

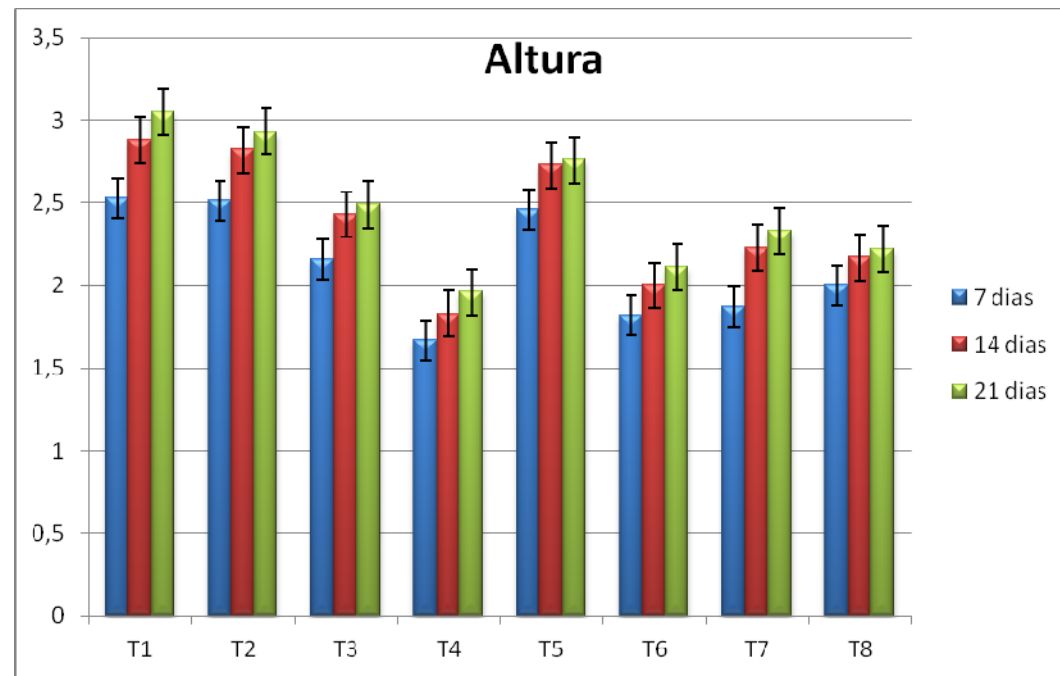


Figura 3 Altura dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para multiplicação meristemática. Eixo vertical com valores em centímetro (cm)

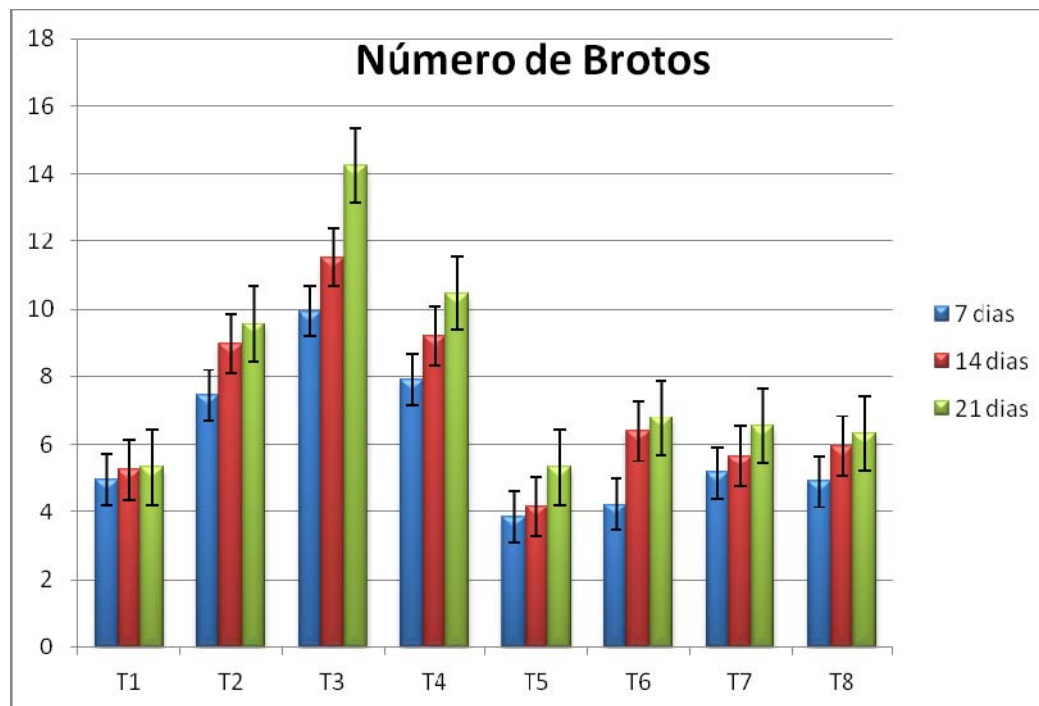


Figura 4 Número de Brotos dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para multiplicação meristemática

Segundo Sriskandarajah et al. (1982) as citocininas são utilizadas para quebra da dormência apical dos brotos e aumento da taxa de multiplicação. Desse modo, assim como observado no trabalho, a escolha da citocinina BAP foi relevante para a multiplicação *in vitro* de Mogno, devido à ocorrência um grande número de brotações por meio do crescimento dos explantes meristemáticos.

Dentre as citocininas, o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias (Grattaplagia & Machado, 1998). Diversos trabalhos corroboram com esta afirmação, como os de Peres-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997) em citros, Almeida et al. (1998) em abacaxizeiro, Vesco & Guerra (1999) em goiabeira, Schwartz et al. (2000) em macieira, dentre outros. Além disso, em algumas culturas, as brotações obtidas na fase de multiplicação geralmente são pequenas e não se encontram em condições de ser individualizadas para o enraizamento. Neste caso, necessita-se de uma fase de alongamento e as giberelinas são os principais reguladores vegetais utilizados com esta finalidade (Grattaplagia & Machado, 1998).

Junior et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes ao obtidos no presente trabalho, para crescimento de brotações adventícias com uso do meio de cultura MS com presença de BAP. No entanto, os autores discordam dos resultados aqui apresentados quando afirmam que em espécies lenhosas, o meio MS não se mostra satisfatório para multiplicação em alguns casos, pois composições mais diluídas em macronutrientes como o meio WPM apresentam melhor desempenho.

Mantovani (2001), por exemplo, promoveu maiores taxas de multiplicação (63,3 brotos) com meio WPM em relação ao meio de cultura MS (39,7 brotos) em experimentos feitos com Louro-pardo (*Cordia trichotoma*)

Discordando dos trabalhos acima citados, os resultados aqui obtidos mostraram que os tratamentos utilizando meio MS com concentrações de 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹ de BAP diferiram de forma positiva e

significativamente dos tratamentos com meio WPM para multiplicação *in vitro* de Mogno, assim como Rocha et al. (2007) quando testaram a multiplicação *in vitro* da Meliaceae *Cabralea canjerana*, e observaram que o meio de cultura MS apresentou melhores resultados (1,77 brotos) quando comparado ao meio WPM (1,12 brotos). Brondani (2008) trabalhando com o híbrido entre *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*, também obteve elevada taxa de brotações utilizando o meio de cultura MS. Assim como Jha et al. (2004), que obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, estabelecendo um protocolo para a micropropagação da leguminosa arbórea *Sesbania rostrata*, onde a maior formação de

brotos ocorreu em meio MS suplementado com $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de

benziladenina (BA), assim como quando utilizamos a citocinina BAP.

3.3 Alongamento dos meristemas oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação de sementes *in vitro*

De acordo com a Tabela 7, os resultados do presente trabalho referentes ao alongamento de meristemas de Mogno Africano mostraram que foi observado diferenças significativas quanto as variáveis analisadas nos diferentes tratamentos utilizando meio de cultura MS com presença e ausência de reguladores de crescimento (ANA, GA_3 e BAP) em diferentes concentrações e combinações.

Segundo Pádua (2012) os reguladores de crescimento suprem possíveis carências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, promovendo assim o alongamento e multiplicação da parte aérea das plântulas *in vitro*. As classes de reguladores de crescimento mais citadas para esta finalidade são as giberelinas e auxinas. No entanto, no presente trabalho, o crescimento das plântulas cultivadas em meio de cultivo suplementado com giberelinas, auxinas, citocininas combinações ou ausência dessas não apresentaram resultados satisfatórios na maioria dos

casos. O melhor crescimento foi obtido quando o meio MS foi suplementado somente com 20,00 mg.L⁻¹ de GA₃.

Tabela 7 Efeito de diferentes concentrações de BAP, ANA e GA3 em meio MS no vigor, altura e número de brotos de explantes meristemáticos de Mogno Africano

Tratamentos	Altura (cm)	Números de brotos
MS	2,36 ^b	5,55 ^e
	1,83 ^g	5,66 ^d
MS + 1,00 mg.L ⁻¹ de ANA		
	3,38 ^a	5,77 ^c
MS + 20,00 mg.L ⁻¹ de GA ₃		

MS + 1,00 mg.L ⁻¹ de ANA + 20,00 mg.L ⁻¹ de GA ₃	2,08 ^e	4,88 ^f
MS + 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP	2,36 ^b	7,66 ^a
MS+ 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP + 1,00 mg.L ⁻¹ de ANA	2,19 ^d	4,77 ^g

MS + 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP + 20,00 mg.L ⁻¹ de GA ₃	2,33 ^c	5,66 ^d
MS+ 0,50 mg.L ⁻¹ de BAP + 1,00 mg.L ⁻¹ de ANA + 20,00 mg.L ⁻¹ de GA ₃	1,88 ^f	6,00 ^b

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05).

Portanto, na tentativa de alongamento de meristemas de Mogno, os resultados deste trabalho mostraram que o melhor meio de cultura foi o

MS com $20,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , como mostra a Figura 5, comparando-se a

características dos meristemas alongados nesse meio com o tratamento controle (MS). Esse fato pode estar relacionado à função das giberelinas, que geralmente promovem o alongamento das células (TORRES et al., 1998).

Na avaliação do parâmetro número de brotos para o experimento visando o alongamento de meristemas, diferença significativa foi observada entre os tratamentos. De acordo com dados apresentados na

Tabela 7, o meio MS com $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, também utilizado como

controle, foi melhor para característica número de brotos, assim como ensaios feitos no presente trabalho para multiplicação de explantes meristemáticos de Mogno.

Para expor melhor os resultados obtidos nesse experimento, a fim de demonstrar a evolução dos explantes desenvolvidos nos diferentes meios de cultura utilizados para alongamento, as Figuras 6 e 7 apresentam

os valores obtidos para avaliação da altura e número de brotos dos explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 7, 14 e 21 de cultivo.

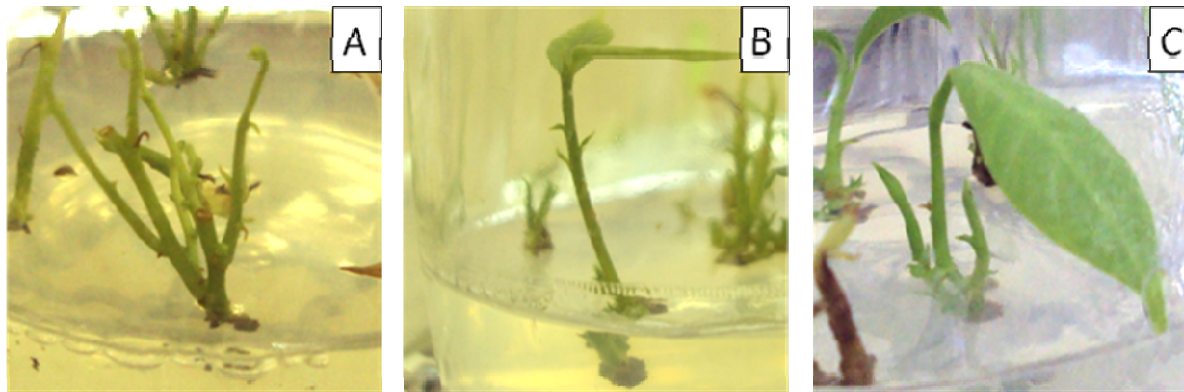


Figura 5 Características dos explantes meristemáticos de Mogno Africano aos 21 de cultivo **A** Meio MS com $20,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 ; **B** Meio MS; **C** Meio MS com $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP

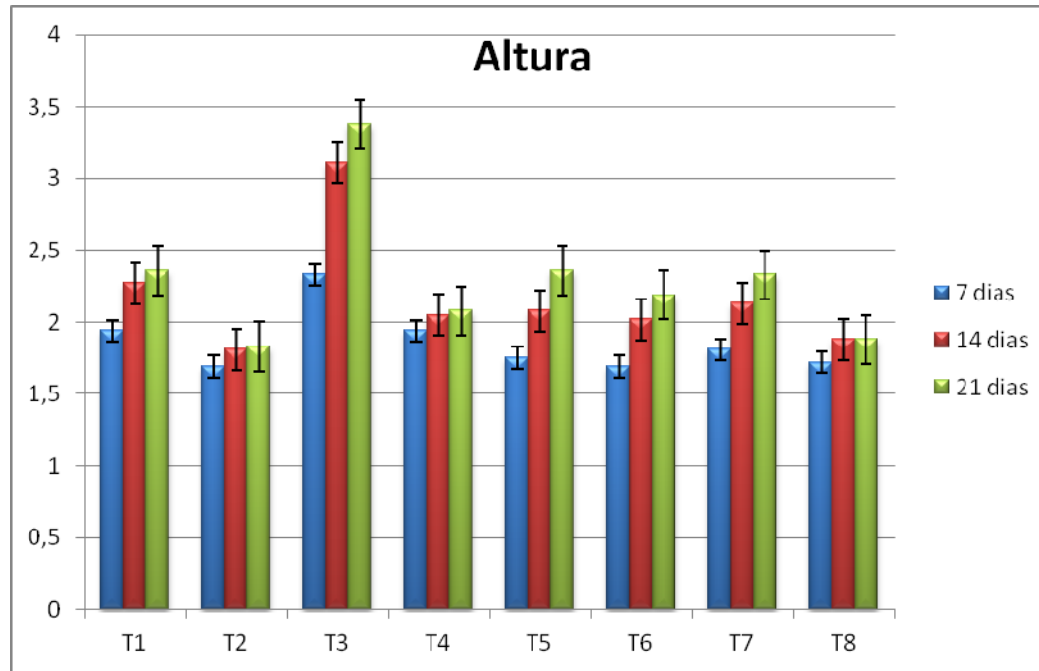


Figura 6 Altura dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para alongamento dos meristemas. Eixo vertical com valores em centímetro (cm)

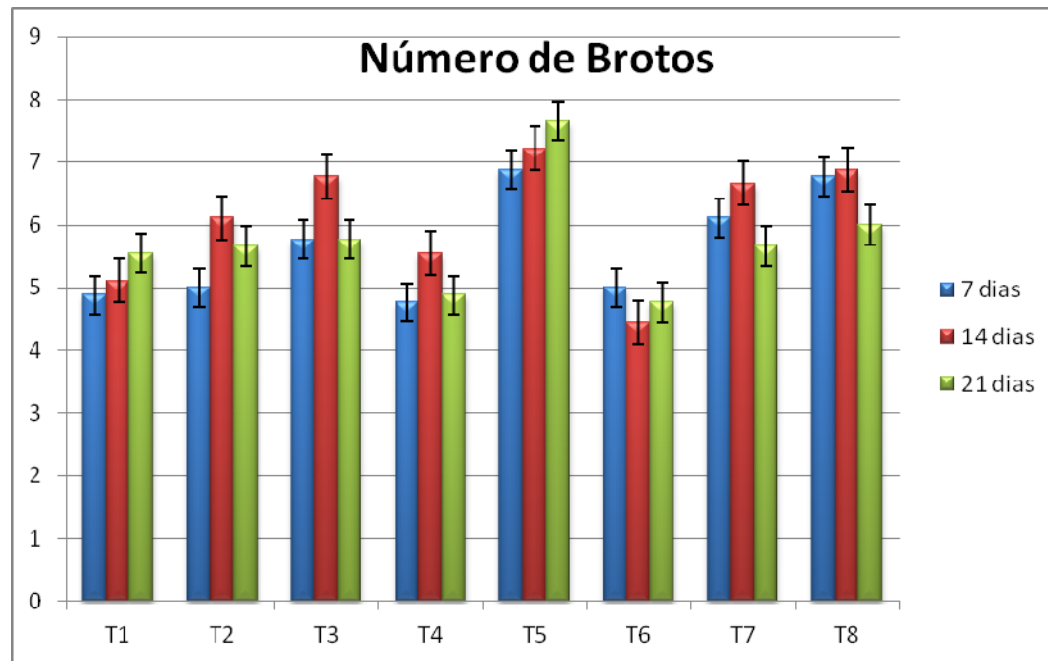


Figura 7 Número de brotos dos explantes de Mogno Africano, desenvolvidos em diferentes meios de cultura para alongamento dos meristemas

Resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho com o alongamento de meristemas, utilizando GA₃, foram encontrados por Pereira et al. (2006), avaliando o comprimento de brotos de Unha de Gato, após 45 dias de cultivo. Os autores observaram o maior comprimento na presença de GA₃, porém na ausência deste regulador não houve diferenças estatísticas.

Os resultados obtidos no presente trabalho e dos autores acima citados corroboram com a ideia de Metrauz (1987) quando afirma a importância das giberelinas no alongamento meristemático. Segundo o autor, uma das formas de estimular o crescimento das brotações é por meio da adição do ácido giberélico (GA₃) ao meio de cultura, o qual promove o aumento do comprimento das brotações, devido ao estímulo da divisão e alongamento das células.

Ledo et al. (2001), avaliando o crescimento de plântulas de açaizeiro *in vitro*, na presença dos reguladores ANA e BAP que também foram utilizados nesse trabalho, afim de promover o alongamento de explantes meristemáticos de Mogno, reportaram maior comprimento da parte aérea em meio de cultivo com a introdução ANA combinado com BAP. Reis et al. (2008) também avaliaram o comprimento dos brotos de *Melissa officinalis* em meio de cultura MS na presença e ausência do regulador de crescimento BAP e concluíram que na ausência desse regulador o comprimento dos brotos foi maior, assim como resultados mostrados na Tabela 7.

Silva (2004) afirma que a fase de alongamento é de fundamental importância, pois as brotações múltiplas que apresentam pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se

estas forem diretamente cultivadas em meios de enraizamento, ou darem origem a mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização. Desse modo, o comportamento observado no desenvolvimento de Mogno cultivado em meio MS com GA₃, sugere que a metodologia apresentada no presente trabalho pode ser considerada para o alongamento de segmentos meristemáticos.

4 CONCLUSÃO

A adição de citocininas e auxinas combinadas ou não ao meio MS, não apresentaram diferenças significativas para regeneração de segmentos nodais oriundos de plantas *in vivo*. No entanto, o maior crescimento dos explantes, mesmo não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ocorreu quando houve a suplementação do meio MS com combinação de BAP e AIA

A suplementação de $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP ao meio MS foi essencial para promover taxas significativas para multiplicação de explantes de Mogno.

O fornecimento da giberelina GA_3 ao meio MS gerou maior alongamento das plântulas de Mogno cultivadas *in vitro*.

ABSTRACT

Nowadays Brazilian Mahogany's wood (*Swietenia machophylla* King.) is one of the most economically valorized woods, reaching higher market values than other tree species, being used for many purposes. In general, the species has difficulty of natural regeneration and of reforestation establishment, having as its main plague *Hypsipyla grandella* Zellar's larvae. Genus Khaya Species has great potential in reforestation because of its tolerance to this plague. The micropropagation using tissue plant culture techniques is becoming an important and viable alternative in tree species multiplication, including genus Khaya. The aim of this work was the production of Mahogany's somatic embryos derived from leaf explants of adult greenhouse cultivated plants. African Mahogany plants selected leaf sections which were cultivated in greenhouses were disinfected and inoculated in MS environment with different nutrients and growth regulators concentrations and associations. Afterwards the material was subjected to subculture process and environment changes, being maintained under controlled temperature conditions and light absence. To evaluate the embryogenic characteristics of the obtained masses, selected callus from the different treatments were observed by light microscopy. The treatment in which embryogenic characteristics were observed in the cell masses was obtained when it was

used MS mediums supplemented with casein, malt extract, 4,4 mg.L⁻¹ of

2,4-D, 2 mg.L⁻¹ of 2-iP and 1 mg.L⁻¹ of AIB and moved after 30 days

moved to MS mediums supplemented with casein, malt extract, 2,2

mg.L⁻¹ of 2,4-D, 2 mg.L⁻¹ of 2-iP and 1 mg.L⁻¹ of AIB in subculture process for 7 months.

Keywords: Mahogany.Embryogenesis.Callus.

REFERÊNCIAS

ALBARRÁN, J. C.; VIELMA, M.; CONTRERAS, I. G.; Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King: estudio de condiciones óptimas para La regeneración y transformación genética. **Revista Florestal Venezolana**, v. 41, p.111-118, 1997.

ALMEIDA, W. A. B. de; MATOS, A. P. de; SOUZA, A. de S. Influência da benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de plântulas do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivadas *in vitro*. **Magistra**, n. 10, p. 55-63, 1998.

AMARAL, V. F. M. de. Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell. 2006, 63 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa, Santa Maria, 2006

BASTOS, L. P.; SOUZA, M. J. de.; COSTA, M. J. P. de C.; ROCHA, M. C. da.; HANSEN, D. de S.; SILVA, S. A. DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. da S. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n. 2, p.1122-1124, jul. 2007.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2ed. **Plenum**, New York, 1984, 445 p.

BRONDANI, G. E. Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. 2008, 118 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2008.

COUTO, J. M. F. Germinação e Morfogênese *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). 2002. 60 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Florestal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, É. de P. Desinfestação e Germinação *in vitro* de sementes de Mogno (*Swietenia macrophylla* king). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.005, p.633-642, 2004.

FILHO, A. N. K.; GRAÇA, M. E. C.; JUNIO, A. G. Micropropagação do Mogno: desinfestação e germinação. **Embrapa**, n.65, p.2-3, dez. 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C. et al. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa**, v.1, p.99-169, 1998.

GUI-FERREIRA, A.; BORGUETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. **Artmed**, Porto Alegre, 2004. 324 p.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; et al. **Handbook of plant cell culture**. New York, p. 177-227, 1983.

HUSAIN, M. K.; ANIS, M.; SHAHZAD, A. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, n. 43, p. 59-64, 2007.

JHA, A. K.; PRAKASH, S.; JAIN, N.; NANDA, K.; GUPTA, S. C. Micropropagation of *Sesbania rostrata* from the cotyledonary node. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 2, p. 289-292, 2004.

JUNIOR, P. C. P. F. J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.22, n.1, p.1-9, jan./mar. 2012.

LAMEIRA, O. A.; LOPES, S. da C.; LEÃO, N. V. M.; CORDEIRO, I. M. C. C.; REIS, L. R. S. Efeito de substratos na germinação *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* KING). **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.2, n.1, p. 15-19, 2006.

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C. de; LEDO, C. A. da S.; OLIVEIRA, M. do S. P. de. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p. 468-472, dez. 2001.

LEE, S. K.; RAO, A. N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* through tissue culture. **Garden Bulletin Singapore**, v.41, p.11-18, 1988.

León, E. A. B. Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese *in vitro* em explantes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) 2010, 59 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2010.

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.

LUNDERGAN, C., JANICK, J. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. **HortScience**, Alexandria, v.14, p.514, 1979.

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, v.11, n.2, p.93-101, 2001.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Tissue culture studies on big-leaf mahogany *Swietenia macrophylla*. In: INTERNACIONAL WORKSHOP BIO-REFOR, 1997, Brisbane. **Proceeding IUFRO/SPDC**, p.116-118, 1997.

MERKLE, S. A.; NAIRN, J. Hardwood tree biotechnology. **In vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v.41, p.602-619, 2005.

MÉTRAUX, J. P. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 296-317, 1987.

MORAES, C. P.; SOUZA-LEAL, T.; PEDRO, N. P.; MARTINE, G. de A.; MORO, A. M. AIA no estímulo de brotos laterais em estacas de *Dendrobium nobile* Lindley (Orchidaceae). **Ensaio e Ciência – Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.15, n.2, p.111-119, 2011.

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

PÀDUA, M. S. Germinação *in vitro*, indução e Caracterização de massas pró-embriogênicas dedendezeiro (*Elais guineensis* Jacq.). 2012, 120 p. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PASQUAL, M. Textos acadêmicos: meios de cultura. **FAEPE/UFLA**, Lavras, 2001, 127 p.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr. 2006.

PERES-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and Mandarin by direct organogenesis. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 5, p. 931-934, 1997.

PINTO, F. Calogênese e indução de gemas axilares em Mogno (*Swietenia macrophylla* King). 2012, 88 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

QUOIRIN, M. LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* sp. **Acta Horticulturae**, v.78, p.437-442, 1977.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v.38, p.116-124, 2002.

REIS, É. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, Viçosa, v.55, n.3, p. 160-167, mai./jun. 2008.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v.31, p.43-50, 2007.

SCHOTTZ, E. de S.; FILHO, A. N. K.; TRACZ, A. L.; KOEHLER, H.; RIBAS, L. L. F.; QUOIRINS, M. Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* KING (Meliaceae) a partir de material juvenil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.17, n.2, p.109-117, abr./jun. 2007.

SCHWARTZ, E.; RONCATTO, G.; FORTES, R. de L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marabukaido utilizando 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 22, n. 1, p. 77-79, 2000.

SILVA, E. S. B. Propagação *in vitro* de *Prunus* spp. 2004, 115p. **Tese** (Doutorado em Fruticultura de clima Temperado), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2004.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**, v.9, p.103-117, 2007.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 24, p. 1-9, 1982.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ**, Brasília, v.1, p.87-132, 1998.

VALVERDE-CERDAS, L.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v.42, p.225-228, 1998.

VESCO, L. D.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg) – Lírio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 21, n. 1, p. 60-64, 1999.

**ARTIGO 2 Indução de massas pró-embriogênicas de mogno via
embriogênese somática**

EMANUELLE TAÍS DA SILVA SOUZA²

ARTIGO normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003)

² Email : manutsouza@yahoo.com.br.

RESUMO

A madeira do Mogno Brasileiro (*Swietenia machophylla* King.) é hoje uma das mais valorizadas economicamente, alcançando valores de mercado superiores a outras espécies arbóreas, sendo utilizada para diversos fins. De modo geral, a espécie possui dificuldade de regeneração natural e de estabelecimento em reflorestamentos, tendo como principal praga larvas de *Hypsipyla grandella* Zellar. As espécies do gênero *Khaya* apresentam grande potencial no reflorestamento devido à tolerância a esta praga. A micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecidos vegetal esta se tornando uma alternativa viável e importante na multiplicação de espécies arbóreas, incluindo o gênero *Khaya*. O objetivo do presente trabalho foi a produção de embriões somáticos de Mogno obtidos por meio de explantes foliares de plantas jovens cultivadas em casa de vegetação. Segmentos foliares seccionados de plantas de Mogno Africano foram desinfetados e inoculados em meios MS com diferentes concentrações e combinações de nutrientes e reguladores de crescimento. Posteriormente o material foi submetido a processos de subcultivos e trocas de meios, sendo mantidos sob condições controladas de temperatura sob ausência de luz. Objetivando verificar as características das massas obtidas, calos selecionados dos diferentes tratamentos foram avaliados por microscopia fotônica. O tratamento em que características embriogênicas foram observadas nas massas celulares, foi obtido quando utilizado para inoculação do material o meio MS suplementado com

caseína, extrato de malte, $4,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, 2 mg.L^{-1} de 2-iP e 1

mg.L^{-1} de AIB e depois de 30 dias transferidos para meio MS

suplementado com caseína, extrato de malte, $2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, 2 mg.L^{-1} de 2-iP e 1 mg.L^{-1} de AIB em processos de subcultivos por 7 meses.

Palavras chave: Mogno. Embriogênese. Calos.

1 INTRODUÇÃO

A falta de políticas adequadas, de conhecimentos técnicos e de consciência ecológica, estão levando à exploração econômica desordenada das florestas com conseqüente diminuição da biodiversidade e perdas de recursos genéticos de várias espécies arbóreas de interesse comercial, como o Mogno.

O Mogno é uma das espécies mais importantes no mercado madeireiro, pelo seu alto valor econômico, devido características da sua madeira, como, a coloração e propriedades que facilitam seu acabamento e uso na confecção de móveis finos, trabalhos arquitetônicos, instrumentos musicais, entre outras utilidades de luxo (COUTO, 2002).

Devido à importância econômica e comercial do Mogno e a necessidade de manejo sustentável da espécie, a Cultura de Tecidos tem sido considerada uma das técnicas biotecnológicas mais importantes para a propagação, e nas últimas décadas vem sendo utilizada com sucesso em plantas arbóreas (PINTO, 2012). Na visão de Pieruzzi (2009) a técnica pode auxiliar nos processos de conservação e reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seu ambiente natural. Dessa maneira a clonagem de espécies vegetais tem sido indicada como estratégia de conservação e reflorestamentos além de contribuir com programas de melhoramento genético e desenvolvimento de técnicas de controle silvicultural (PINTO, 2012).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática vem sendo utilizada com bastante sucesso em programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma de espécies

arbóreas (PIERUZZI, 2009), podendo contribuir significativamente para a propagação *in vitro* do Mogno

A técnica de embriogênese somática é explicada pela totipotência, ou seja, todas as células do corpo da planta, células vivas e normais, teoricamente, possuem a capacidade de regenerar em um organismo inteiro, por meio de formação de um novo órgão ou embriões somáticos (SCHERES et al., 1999; LAUX et al., 1997; TAMBARUSSI, 2009). O processo de aquisição de competência, desdiferenciação e rediferenciação é essencialmente regulado por substâncias de crescimento vegetal, exemplo, auxinas e citocininas, que produzem alterações na polaridade celular e promovem divisões celulares (TAMBARUSSI, 2009; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2009).

Segundo Laux et al. (2004) para o desenvolvimento da embriogênese, utilizam explantes vegetais que podem ser meristemas, cotilédones, hipocótilos, raízes, entre outros. Na regeneração de plantas lenhosas via calogênese, os explantes mais utilizados são as folhas e entrenós de plantas que se desenvolveram *in vitro* (PINTO, 2012).

Apesar de grandes avanços das técnicas de cultura de tecidos, o estabelecimento de protocolos que estimulem a embriogênese em plantas lenhosas é muito limitado, fato que se deve a recalcitrância da maioria dessas espécies, como por exemplo, o Mogno. Em algumas espécies lenhosas, a embriogênese somática tem permitido a obtenção de calos embriogênicos e conseqüentemente a produção de plantas em grande escala (PINTO, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi obter um protocolo eficiente de embriogênese somática *in vitro* a partir de explantes foliares de Mogno Africano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) localizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras – MG.

2.1 Material vegetal

Para a realização do trabalho foram utilizados explantes foliares de plantas jovens de Mogno Africano (*Khaya senegalensis*) as quais foram cultivadas em casas de vegetação sob condições controladas.

Foram escolhidos folíolos jovens, porém rígidos para que o tecido não fosse afetado durante o processo de esterilização. Assim, foram utilizados tratamentos de assepsia superficial de acordo com Teixeira et al. (2004) e adaptações, submetendo-se os folíolos à imersão em água corrente por 15 minutos. No fluxo laminar, sob agitação, os folíolos foram imersos em etanol a 70% (v/v), por 1 minuto, submersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial 50% por 20 minutos, e, por último, os folíolos foram submetidas a um triplo enxágüe com água estéril para a remoção de resíduos das soluções desinfestantes como segue o protocolo referencial.

Antes da transferência dos explantes para os meios de cultivo foram realizados cortes na superfície abaxial dos folíolos. Segmentos quadrangulares de aproximadamente 1 cm foram excisados e inoculados em placas de petri contendo 30 mL de meio de cultura, sendo que a parte abaxial dos explantes ficaram em contato com o meio de cultura.

2.2 Meios de cultura testados

O material vegetal desinfetado foi preparado e inoculado em meio de cultura MS com variações nutricionais e de reguladores de crescimento para indução de calos. O meio base foi MS acrescido ou não de diferentes combinações de BAP, ANA, 2,4-D (Ácido 2,4-diclorefenoxiacético), 2-ip (Isopenteniladenina) e AIB, além de concentrações ou não de caseína e extrato de malte. A Tabela 1 descreve os diferentes experimentos com os tratamentos e subcultivos.

Os meios foram solidificados com 0,6% de Agar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. O experimento foi mantido sob condições controladas à temperatura de 25±2°C, sob ausência de luz em processo de subcultivos a cada 30 dias. Mensalmente avaliou-se de forma visual a contaminação (fúngica e bacteriana), existência ou não de massas embriogênicas, coloração e consistência dos calos (friável ou compacto). Os calos obtidos a partir da indução de embriogênese somática foram analisados por microscopia fotônica.

Tabela 1 Número de subcultivos e meios de cultura MS testados visando a produção de calos embriogênicos em explantes foliares de Mogno Africano

Meio Básico	Número de Subcultivos	Reguladores vegetais	Nutrientes
MS -01	2	BAP 0,5 mg.L ⁻¹ , ANA 0,5 mg.L ⁻¹	
	7	2,2 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, 2 mg.L ⁻¹ de 2-iP e 1 mg.L ⁻¹ de AIB	Caseína, Extrato de Malte
MS-02	3	-	
	5	2 mg.L ⁻¹ 2,4-D, 3 mg.L ⁻¹ BAP	
MS-03	2	5 mg.L ⁻¹ 2,4-D	
	1	-	
	5	2 mg.L ⁻¹ 2,4-D, 3 mg.L ⁻¹ BAP	
MS-04	2	10 mg.L ⁻¹ 2,4-D	
	1	-	

	5	2 mg.L ⁻¹ 2,4-D, 3 mg.L ⁻¹ BAP	
MS-05	2	20 mg.L ⁻¹ 2,4-D	
	1	-	
	5	2 mg.L ⁻¹ 2,4-D, 3 mg.L ⁻¹ BAP	
MS-06	2	50 mg.L ⁻¹ 2,4-D	
	1	-	
	5	2 mg.L ⁻¹ 2,4-D, 3 mg.L ⁻¹ BAP	
MS-07	2	100 mg.L ⁻¹ 2,4-D	
	1	-	
	5	2 mg.L ⁻¹ 2,4-D, 3 mg.L ⁻¹ BAP	
MS-08	1	4,4 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, 2 mg.L ⁻¹	Caseína, Extrato de Malte

de 2-iP e 1 mg.L⁻¹ de AIB

2,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg.L⁻¹

6

Caseína, Extrato
de Malte

de 2-iP e 1 mg.L⁻¹ de AIB

2.3 Avaliação da anatomia dos calos

As massas calogênicas desenvolvidas nos diferentes experimentos foram analisadas visualmente, e aquelas que apresentavam características com potencial embriogênico foram escolhidas para avaliação anatômica. Os calos então selecionados com características pró-embriogênicas, dos experimentos MS-01, MS-04 e MS-08, foram analisados por microscopia fotônica, seguindo o procedimento descrito abaixo para verificar as características embriogênicas de suas células.

As massas celulares foram fixadas em FAA 50% (solução de formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico) por três dias e então foram conservadas em álcool 70% até o momento da desidratação. A desidratação foi realizada em série etílica (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 hora em cada e na de 100% duas vezes de 1 hora, posteriormente deixadas *over night* em quantidades iguais de resina com álcool 100%. Após foi infiltrada em resina pura durante 24h.

Posteriormente os calos foram emblocados em historesina Leica de acordo com o protocolo do fabricante, e em seguida feitos cortes com espessura de 5 μ m em micrótomo rotativo, corados com azul de toluidina na concentração de 0,1% e visualizados em microscópio óptico Leica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora os explantes utilizados no estudo tenham sido submetidos tratamentos distintos, quase todos apresentaram desenvolvimento de estruturas calogênicas semelhantes na fase inicial, com exceção do experimento MS-02. A formação de massas celulares foi percebida nas extremidades do tecido vegetal com apenas 2 semanas de tratamento, o que, a princípio, foi satisfatório para a primeira fase da pesquisa. Segundo Quiriz-Figueroa et al. (2002) esta proliferação calogênica nos bordos dos explantes ocorre nas células do câmbio vascular, é o que leva à formação do calo primário.

Além do bom resultado referente ao tempo do desenvolvimento de calos, destaca-se que não houve significativas perdas do material vegetal por contaminação, o que pode ser atribuído à eficiência do processo de esterilização descrito por Teixeira et al. (2004) e modificações utilizadas nesse trabalho.

A exemplo do ocorrido na fase inicial, em todas as etapas de subcultivos dos tratamentos, as características das massas celulares permaneceram bem semelhantes, isto é, apresentaram mesmo nível de crescimento. Como pode ser visto na Figura 1, houve formação de massas com coloração gradativa em nuances bege, com aspectos translúcidos e desuniformes.

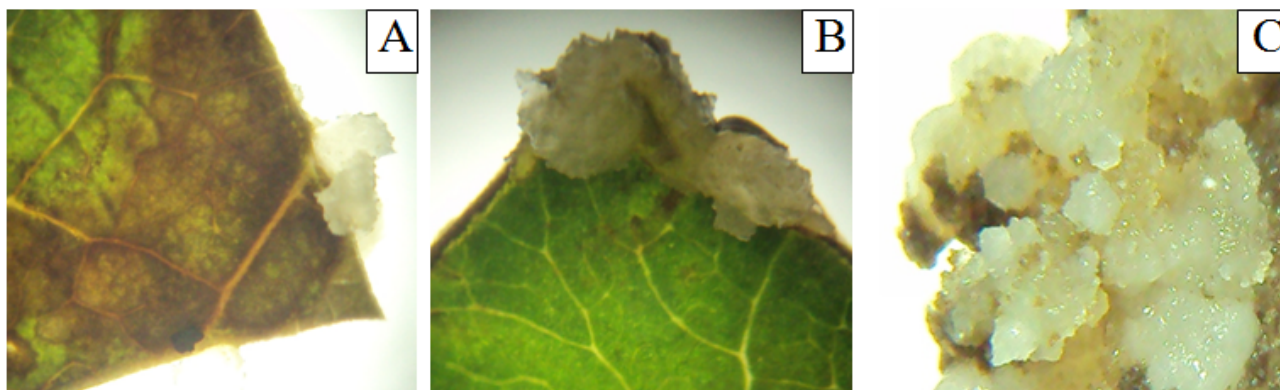


Figura 1 Massas foliares produzidas em explantes foliares de Mogno Africano. Imagens experimento MS-08. A Início da formação de calosidades nos bordos dos explantes foliares, B Desenvolvimento das calosidades e C Estruturas calogênicas obtidas ao longo dos subcultivos

Nos experimentos MS-02, MS-03, MS-04, MS-05, MS-06 e MS-07, utilizou-se concentrações gradativas de 2,4-D nos primeiros subcultivos, afim de obter uma comparação entre os tratamentos utilizados para indução de massas embriogênicas. No experimento MS-02 em que o meio de cultura não possuía regulador ocorreu inibição na formação de calos. O processo de utilização de auxinas, no caso 2,4-D, deveu-se ao fato de serem consideradas substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, alterando e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (PÁDUA, 2012). Portanto, nos meios suplementados com 2,4-D, verificou-se a formação de calos em todas as concentrações, sendo mais frequente nas concentrações de 5, 10 e 20 mg.L⁻¹. Foi escolhido a concentração média de 10 mg.L⁻¹ para avaliação

dos calos por microscopia, pela intensa formação de massas calogênicas e indícios visuais de áreas pró-embriogênicas.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram alcançados por Werner et al. (2007) com explantes foliares de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) e Matsumoto et al. (1991) em explantes foliares de mandioca (*Manihot esculenta*) tendo conseguido a indução de embriões somáticos. Devido a este aspecto, concluímos que segmentos foliares de Mogno Africano foram induzidos à calogênese com resultados

favoráveis na formação de massas especialmente quando se utilizou 10

mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Independente do fato dos experimentos apresentarem visualmente características de calos com capacidade de formação de embriões, por meio da microscopia fotônica constatou-se que apenas o MS-08 reunia condições favoráveis, haja vista que os demais apresentavam células irregulares, redondas, grandes e espaço intercelular como mostra a Figura 2.

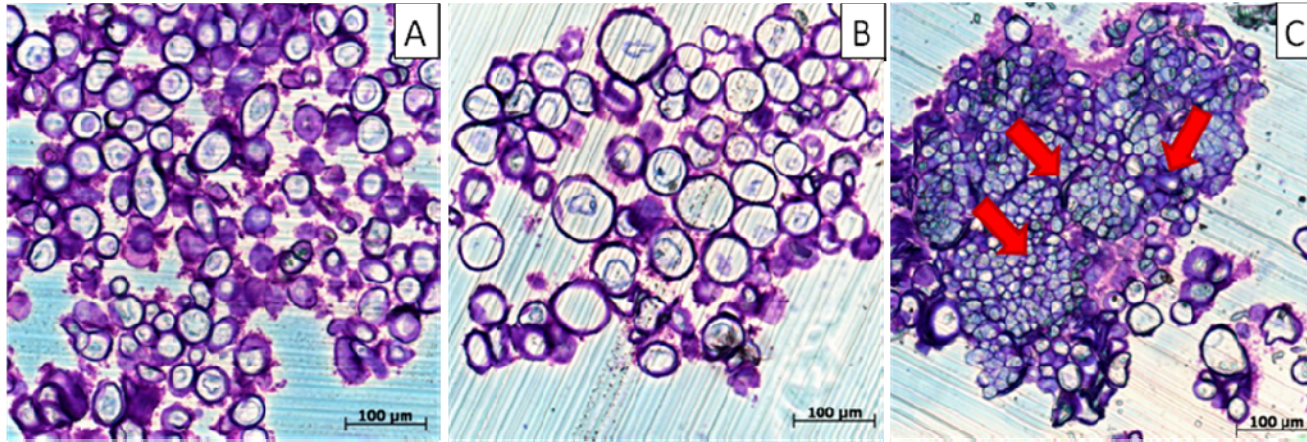


Figura 2 **A** Células dos calos do experimento MS-01 com características não embriogênicas, ou seja, células irregulares, redondas, grandes e espaço intercelular, **B** Células dos calos do experimento MS-04 com características não embriogênicas, ou seja, células irregulares, redondas, grandes e espaço intercelular, **C** Células dos calos do experimento MS-08 com características embriogênicas, isto é, células pequenas e isodiamétricas, densamente coradas, núcleos grandes, vacúolos pequenos e divisão celular com formação de aglomerados (**SETAS**)

Foi possível observar no experimento MS-08 células pequenas, citoplasma denso, vacúolos pequenos, núcleos grandes com nucléolo aumentado, vacúolos pequenos e divisão celular com formação de aglomerados, ou seja, características ideais para desenvolvimento embriogênico.

O êxito obtido com MS-08 deveu-se a eficiência do protocolo em que os reguladores de crescimento 2,4-D, 2iP e AIB adicionados ao meio MS, juntamente com caseína e extrato de malte mostraram-se eficientes na indução de massas celulares com potencial embriogênico em explantes foliares de Mogno Africano, assim como o protocolo publicado por Teixeira et al. (2004), utilizado para a cultura *Coffea arabica* L. No trabalho citado, os segmentos de folha foram cultivados inicialmente no

meio MS contendo $4,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D entre outros componentes e, após

um mês, transferidos para o meio MS com redução na concentração de

2,4-D, sendo portanto $2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D entre demais componentes,

assim como neste trabalho.

Segundo Pessotti et al. (2007), a expressão da embriogênese somática pode ser desencadeada por diferentes fatores, dependendo da

espécie, cultivar e condições fisiológicas da planta doadora. Porém, o procedimento mais comum é a exclusão ou diminuição da concentração de auxina (principalmente 2,4-D) no meio de cultura utilizado para indução das culturas embriogênicas.

Como pode ser observado pela descrição já feita, a redução na concentração de 2,4-D de $4,4 \text{ mg.L}^{-1}$ para $2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ pode ter sido

essencial para se obter um aumento substancial da frequência de formação de setores embriogênicos. O resultado obtido com a execução do presente trabalho foi satisfatório, que como relatado por Teixeira et al. (2004) a embriogênese somática, apresenta um potencial muito grande de poder ser utilizada para produção de mudas em larga escala.

Além da utilização de 2,4-D no meio de cultura MS-08 visando a produção de calos embriogênese, o uso de nutrientes também pode ter sido fundamental para obtenção de massas pró-embriogênicas. Vieira et al. (2007), afirmam que o nitrogênio possui grande importância para a maioria das espécies cultivadas *in vitro*, por estar envolvido nos processos fisiológicos e bioquímicos associados ao controle de crescimento, diferenciação e morfogênese, sendo a caseína e o extrato de malte umas das principais fontes de suplementação do nitrogênio. BARTOS (2012) corrobora com a ideia, afirmando que o extrato de malte e caseína são misturas complexas, pois são formas orgânicas de nitrogênio que estimulam o crescimento de muitas espécies quando cultivadas *in vitro*.

Segundo a autora, estas misturas fornecem um conjunto de aminoácidos responsáveis por estimular o crescimento de muitas espécies *in vitro*, podendo ser observado um estímulo do crescimento e do desenvolvimento. Portanto, BARTOS (2012) conclui que a caseína e o extrato de malte influenciam positivamente na formação de calos embriogênicos, ou seja, a associação desses dois componentes no meio nutritivo proporciona a maior percentagem de formação de calo embriogênico.

4 CONCLUSÃO

Apenas calos do experimento MS-08 apresentaram características embriogênicas, isto é, células pequenas e isodiamétricas, densamente coradas, núcleos grandes e vacúolos pequenos. Divisões celulares com formação de aglomerados também foram observadas.

Assim, calos provenientes do meio MS-08 apresentaram maior potencial embriogênico para uma possível regeneração de plantas de Mogno Africano *in vitro*.

ABSTRACT

Nowadays Brazilian Mahogany's wood (*Swietenia machophylla* King.) is one of the most economically valorized woods, reaching higher market values than other tree species, being used for many purposes. In general, the species has difficulty of natural regeneration and of reforestation establishment, having as its main plague *Hypsipyla grandella* Zellar's larvae. Genus Khaya Species has great potential in reforestation because of its tolerance to this plague. The micropropagation using tissue plant culture techniques is becoming an important and viable alternative in tree species multiplication, including genus Khaya. The aim of this work was the production of Mahogany's somatic embryos derived from leaf explants of adult greenhouse cultivated plants. African Mahogany plants selected leaf sections which were cultivated in greenhouses were disinfected and inoculated in MS environment with different nutrients and growth regulators concentrations and associations. Afterwards the material was subjected to subculture process and environment changes, being maintained under controlled temperature conditions and light absence. To evaluate the embryogenic characteristics of the obtained masses, selected callus from the different treatments were observed by light microscopy. The treatment in which embryogenic characteristics were observed in the cell masses was obtained when it was

used MS mediums supplemented with casein, malt extract, 4,4 mg.L⁻¹ of

2,4-D, 2 mg.L⁻¹ of 2-iP and 1 mg.L⁻¹ of AIB and moved after 30 days

moved to MS mediums supplemented with casein, malt extract, 2,2

mg.L⁻¹ of 2,4-D, 2 mg.L⁻¹ of 2-iP and 1 mg.L⁻¹ of AIB in subculture process for 7 months.

Keywords: Mahogany.Embryogenesis.Callus.

REFERÊNCIAS

BASTOS, P. M. C. Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo. 2012, 151p. **Dissertação** (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S. B.; GUERRA, M. P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.3, p.217-224, mar. 2009.

COUTO, J. M. F. Germinação e Morfogênese *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). 2002. 60 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Florestal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

LAUX, T.; JÜRGENS, G.. Embryogenesis: A New Start in Life. **The Plant Cell**, v. 9, p.989-1000, jul. 1997.

LAUX, T. L.; WÜRSCHUM, T.; BREUNINGER, H. Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. **The Plant Cell**, v.16, p.190–202, 2004.

MATSUMOTO, K.; CABRAL, G. B.; TEIXEIRA, J. B.; RECH, E. L. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.3, n.2, p.107-110. 1991.

PÂDUA, M. S. Germinação *in vitro*, indução e Caracterização de massas pró-embriogênicas dedendezeiro (*Elais guineensis* Jacq.). 2012, 120 p. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PESSOTTI, K. V.; WERNER, E. T.; LOPES, F. P.; CUZZUOL, G. R. F. Indução e Expressão da Embriogenese Somática em *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.1056-1058, jul. 2007.

PIERUZZI, F. P. Quantificação de aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA e marcadores protéicos na germinação de sementes de *Ocotea odorifera* Vell. (Lauraceae). 2009, 69 p. **Dissertação** (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PINTO, F. Calogênese e indução de gemas axilares em Mogno (*Swietenia macrophylla* King). 2012, 88 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

QUIROZ-FIGUEROA, E. R.; FUENTES-CERDAS, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the development stages and differentiation of two different somatic embryogenesis system of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, p.1114-1149, 2002.

SCHERES, B.; BENFEY, P. N. Asymmetric cell division in plants. **Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v.50, p.505-37, 2009.

TAMBARUSSI, E. V. Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera*. 2009, 121 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. da C.; MELLO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, n.121, 2004. 39 p.

VIEIRA, J. G. Z.; YAMAKAMI, J. K.; AGUIAR, R. S de.; UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T. de. Influência da caseína hidrolisada no cultivo in vitro de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 207-212, abr/jun. 2007.

WERNER, E. T.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; CUZZUOL, G. R. F. Indução da Calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.1053-1055, jul. 2007.