



**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE SUCUPIRA
BRANCA [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.].**

Marly Catarina Felipe Coelho

1999

1. 23.

171

6

CIRCULAÇÃO E EMPRESTIM
DEB. DE DEB. DEB. DEB.

46503
13176 MFV.

MARLY CATARINA FELIPE COELHO

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
SUCUPIRA BRANCA [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.].**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção de título de "Mestre".

Orientador

Prof. PhD José Eduardo Brasil Pereira Pinto

BIBLIOTECA CENTRAL

U.F.L.A.
N.º CLAS. 7639.97332

COE

ger
N.º REGISTRO 46503

DATA 09/06/99

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Coelho, Marly Catarina Felipe

Germinação de sementes e propagação *In vitro* de sucupira
branca [*Pterodon pubescens* (Benth) Benth]/ Marly Catarina Felipe
Coelho. – Lavras: UFLA, 1999.

119p.: il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia:

1. Sucupira branca. 2. *Pterodon pubescens* 3. Planta medicinal.
 4. Micropropagação. 5. Leguminosa. 6. Cerrado. 7. Planta lenhosa.
- I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.9562

-634.97332

-633.88332

MARLY CATARINA FELIPE COELHO

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
SUCUPIRA BRANCA [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.].**

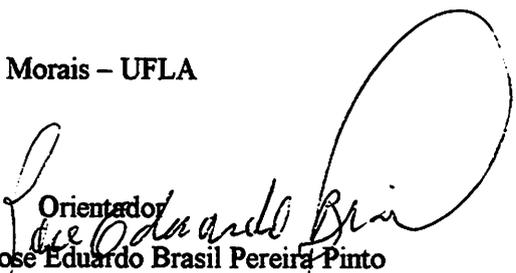
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção de título de "Mestre".

APROVADA em 16 abril de 1999

Pesquisador Dr. Luis Pedro Barrueto Cid – EMBRAPA/ CENARGEN

Pesquisador Dr. Osmar Alves Lameira – EMBRAPA / Amazônia Oriental

Prof. Dr. Augusto Ramalho de Moraes – UFLA


Orientador
Prof. Ph.D. Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
1999**

Aos meus irmãos

**Paulo, Sandra e Frederico,
e sobrinhos Ana Paula, Thiago,
Thaís, Mariana, Cynthia, Amanda,
Luis Felipe e Luísa.**

OFEREÇO

**Aos meus pais
Luiz e Maristela
a minha tia Maria da Paz**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Á Maria Santíssima;

Á Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa/CENARGEN pela liberação para realização do curso;

Á Universidade Federal de Lavras UFLA-MG, através do Departamento de Agricultura pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Á CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia Prof. Rovilson José de Souza pela compreensão e apoio;

Ao professor e orientador José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela amizade, apoio e incentivo profissional;

Ao Dr. Luís Pedro Barrueto Cid – Embrapa/CENARGEN pela sugestões e participação na Banca Examinadora;

Ao Prof. Dr. Augusto Ramalho de Moraes – UFLA pelas valiosas sugestões e participação na Banca Examinadora;

Ao Dr. Osmar Alves Lameira – Embrapa/Amazônia Oriental pela amizade e participação na Banca Examinadora;

Aos Pesquisadores Dr. Kasumitsu Matsumoto e Dr. João Batista Teixeira da Embrapa/CENARGEN pelo incentivo e amizade;

Ao grupo do Apostolado da Oração da Paróquia do Bom Jesus dos Migrantes em Sobradinho – DF e a Liga Apostólica Feminina de Shoenstatt de Brasília pelas orações;

Ao seminarista e amigo Marcus Paulo pelas orações em Roma;

Aos Eng. Florestais Sérgio Teixeira pela coleta dos frutos em Minas Gerais, e Alexander Paulo Balduino pela amizade e pela coleta dos frutos em Brasília;

Aos casais Arie e Fátima Blank, Eliseu e Renata Mann, Carlos Alberto Spaggiari e Jofeane pelos momentos difíceis e amizade;

À Marcinha e ao Evaldo Arantes pela colaboração na execução de algumas pesquisas;

À Lúcia Bandeira Coelho, Luís Cortez e Roseli Cerqueira pelo expressivo apoio e amizade;

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos: Berildo, Solange, Regina Ramos, Iraci, Suzan, Laura Becker, Marvin, Artiaga e Heráclito pela amizade e agradável convívio durante o curso;

Aos colegas da Engenharia Florestal: Marcílio, Beto e Robério;

À Regina Bern e ao Josué Lemos pela amizade;

Ao Pedro Henrique F. Tomé pelo apoio, sugestões e amizade;

Ao Marcelo Prudente de Assis pelo carinho, incentivo e agradável convívio;

Aos Bibliotecários da UFLA e CENARGEN pela atenção dispensada;
À todos os funcionários do Departamento de Agricultura;

Enfim, a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, nossos agradecimentos.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	05
2.1 Descrição da espécie <i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Benth	05
2.2 Germinação de sementes	08
2.3 Germinação de sementes de sucupira branca (<i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Benth)	17
2.4 Germinação de embriões e eixos embrionários	18
2.5 Plantas lenhosas x micropropagação vegetativa	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Procedência das sementes de Sucupira Branca (<i>Pterodon pubescens</i> (Benth.) Benth)	38
3.2 Desinfestação das sementes	39
3.3 Testes experimentais para germinação	39
3.3.1 Teste de germinação “ex vitro” de sementes seccionadas e embriões	39
3.3.2 Teste de germinação “in vitro” de sementes seccionadas e embriões	40
3.3.3 Teste de germinação “in vitro” de sementes escarificadas e embriões	40
3.3.4 Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido e em diferentes condições de gelificantes	41
3.3.5 Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido ou com ágar, em ambiente escuro ou de luz	42
3.3.6 Avaliação do crescimento de eixos embrionários em meio líquido e em meios sob diferentes condições de gelificantes	43
3.3.7 Avaliação do crescimento de embriões em tubos de ensaio fechados com tampas plásticas ou com forminhas de papel alumínio tipo brigadeiro	44
3.4 Estabelecimento “in vitro” de segmentos nodais de sucupira branca	45

3.4.1	Efeito do meio de cultura sobre estabelecimento in vitro de segmento nodal de sucupira branca	45
3.4.2	Estabelecimento de segmentos nodais de sucupira branca com metade da concentração dos sais do MS suplementado com água de côco	46
3.4.3	Indução de multibrotações em meios sólidos	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Experimentos de germinação	49
4.1.1	Teste de germinação “ex vitro” de sementes seccionadas e embriões	49
4.1.2	Teste de germinação “in vitro” de sementes seccionadas e embriões	52
4.1.3	Teste de germinação “in vitro” de escarificadas e embriões	59
4.1.4	Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido e em diferentes condições de geleificantes	64
4.1.5	Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido ou com ágar, em ambiente escuro e de luz	72
4.1.6	Avaliação do crescimento de eixos embrionários em meio líquido e em meios sob diferentes condições de gelificantes	75
4.1.7	Avaliação do crescimento de embriões em tubos de ensaios fechados com tampas plásticas ou com forminhas de papel alumínio tipo brigadeiro	77
4.2	Estabelecimento “in vitro” de segmentos nodais de sucupira branca	83
4.2.1	Estabelecimento “in vitro” de segmentos nodais de sucupira branca em meios básicos de MS(Murashige e Skoog,(1972) e WPM (Lloyd e McCown,1981)	83
4.2.2	Estabelecimento de segmentos nodais de sucupira branca em metade da força dos sais do MS suplementado com água de côco	88
4.2.3	Indução de multibrotações em meio sólido	90
5	CONCLUSÕES	99
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

RESUMO

COELHO, M.C.F. **Germinação de Sementes e Propagação *In Vitro* de Sucupira Branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. UFLA, 1999.119P. (Dissertação – Mestrado em Agronomia)*

A sucupira branca é uma essência nativa dos cerrados brasileiros, atingindo até 16 metros de altura. O óleo do fruto é muito apreciado na medicina popular nas infecções de garganta e reumáticas, protege contra infecção por cercárias. A madeira possui alta resistência natural ao apodrecimento, sendo considerada uma das madeiras mais resistentes para dormentes de via férrea. Os objetivos do presente trabalho foram identificar a melhor condição “in vitro” e “ex vitro” de germinação da semente, do embrião e eixo embrionário para o desenvolvimento da plântula, além de determinar uma metodologia para multiplicação in vitro. Experimentos foram realizados visando obtenção de germinação in vitro, por meio da utilização de meio básico de MS modificado, em meio líquido, diferentes gelificantes, tampas e condições de luz. O estabelecimento de segmentos nodais foram estudados utilizando o meio básico de MS e WPM. No experimento de multibrotações foram testados quatro diferentes concentrações combinadas de ANA e BAP. O melhor tipo de tampa para a germinação de embriões foi o de forminha de papel de alumínio juntamente com meio líquido. Os segmentos nodais foram melhor estabelecidos no meio WPM. Foram obtidos até 7,5 brotos/segmento, com segmento nodal, inoculado na posição horizontal no meio de cultura MS com a metade da concentração dos sais, suplementado com 5,0 μ M de BAP.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador); Luis Pedro Barreto Cid EMBRAPA - CENARGEN ; Augusto Ramalho de Moraes - UFLA

Abstract

COELHO, M.C.F. Seed germination and in vitro propagation of *Sucupira Branca* [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. UFLA, 119p (Dissertation – Master Program in Agronomy).

Pterodon pubescens (Benth.) Benth. is a essence native to Brazilian cerrados, reaching up to 16 meters in height. The oil of fruit is very enjoyed in folk medicine in sore and rheumatic infections, it protects from cercaria infections. The wood posses high natural resistance to rotting, being regarded as one of the most resistant woods for railroad sleepers. The objectives of the present work were to identify the best “in vitro” and “ex vitro” germination conditions for the seed, embryo and embryonic axes of the seedling’s development, in addition to determinating a methodology for in vitro multiplication. Experiments were conducted aiming at the achievement of in vitro germination by means of the use of modified MS basic medium, in liquid medium, different gelifyings, caps and light conditions the establishment of nodal segments were studied by employing the MS and WPM basic medium. In the multi-sprouting experiment, four different combined concentrations of ANA and BAP were tested. The best type of cap for embryo germination was the one of aluminum paper mould together with liquid medium the nodal segments were best established in WPM medium. Up to 75 shoots/segment were obtained, with the nodal segment, inoculated at the horizontal position in the MS culture medium with half the concentration of salts, supplemented with 0,5 μ M BAP.

Guidance Committe: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador); Luis Pedro Barrueto Cid EMBRAPA - CENARGEN ; Augusto Ramalho de Morais - UFLA

1 Introdução

No planalto Central do Brasil encontra-se o bioma Cerrado, que cobre cerca de 20% do território brasileiro e abrange mais de dez estados. O cerrado propriamente dito é caracterizado por uma vegetação cujas plantas lenhosas maiores possuem troncos e galhos retorcidos. O cerrado é quase totalmente tropical. No entanto, a tecnologia agrícola que está sendo adotada no cerrado responde a um modelo de agricultura voltada para o lucro imediato, com pouca ou quase nenhuma preocupação conservacionista a longo prazo. Extensas áreas contínuas estão sendo desmatadas para a implantação de monoculturas agrícolas e pecuária extensiva, sem reserva de amostras dos ecossistemas naturais que possam funcionar como banco genético e refúgio da fauna e da flora (Pinto 1993). Além do desmatamento do cerrado pela expansão agrícola, espécies vegetais são exploradas desordenadamente por apresentarem interesse econômico para a produção de madeira, carvão e cortiça para a indústria química e farmacêutica, contribuindo para a drástica extinção de algumas destas espécies.

A espécie *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (sucupira branca) é uma essência nativa dos cerrados brasileiros encontrada em Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. A árvore no cerrado pode atingir até 16m de altura e 40cm de diâmetro do tronco, sendo portanto uma das maiores espécies deste ecossistema (Figura 1).



FIGURA 1. Sucupira Branca - *Pterodon pubescens* (Benth) Benth.

Possui alta resistência natural ao apodrecimento e devido às qualidades físicas e mecânicas é considerada como uma das melhores madeiras para dormentes de via férrea, sendo utilizada também para construção de postes, esteios, moirões, madeiramento para pontes, construção civil e naval, assoalhos de vagões e carrocerias. O óleo do fruto confere proteção contra infecção por cercária de *Schistosoma mansoni*, (Mors, Pellegrino e Santos Filho 1966 e Dias 1993), sendo também utilizado na medicina popular nas infecções de garganta e reumáticas (Barros 1982). A árvore é ornamental, embora ainda não seja devidamente aproveitada para o paisagismo. É pouco exigente em fertilidade, podendo ser utilizada em reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente, substituindo os plantios de muitas

espécies exóticas de baixo desenvolvimento nestas condições de solo. No entanto, o corte intensivo dessa essência tem contribuído para seu rápido desaparecimento.

Dentre os problemas apresentados pelas espécies nativas, aqueles relacionados com a sua propagação são da maior importância, visto que as espécies nativas produzem sementes em apenas determinadas épocas. Algumas espécies produzem pouca ou nenhuma semente. A multiplicação da sucupira pelo semeio dos frutos ou sementes é difícil, o que impede o uso extensivo desta leguminosa no reflorestamento (Gurgel Filho 1947). Estudos realizados com germinação permitem levantar a hipótese de que as sementes de sucupira possuem dormência causada pela impermeabilidade dos tegumentos ao oxigênio, e a água e, possivelmente, pela existência de inibidores químicos da germinação (Reis 1976).

A cultura "in vitro" pode contribuir para a multiplicação clonal destas espécies e apresenta vantagens por exigir menor tempo e espaço. Garante, ainda, a conservação de germoplasma de espécies raras e de árvores ameaçadas de extinção, obtenção de plantas livres de patógeno e no melhoramento genético das espécies.

A micropropagação tem sido muito utilizada atualmente para as espécies florestais, principalmente com a finalidade de clonar árvores selecionadas para melhoramento genético, produção em larga escala visando reflorestamento, produção bioenergética e clonagem objetivando uso paisagístico. No entanto, a micropropagação de espécies lenhosas possui alguns fatores que dificultam seu uso, como a grande variabilidade genética existente em plantas de espécies nativas, como também, a presença de substâncias oxidantes. Particularmente em espécies tropicais, que contêm altas concentrações de substâncias fenólicas que se oxidam quando as células são danificadas. O desenvolvimento de metodologias específicas torna-se necessário para superar estes empecilhos.

Os objetivos do presente trabalho foram identificar a melhor condição “in vitro” e “ex vitro” de germinação da semente, do embrião e eixo embrionário para desenvolvimento de plântulas, além de determinar uma metodologia para multiplicação “in vitro” de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (sucupira branca).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Descrição da Espécie *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.

Pertencente à família Leguminosae, subfamília Faboideae (ex-Papilionoideae segundo Heringer e Ferreira (1972)), o gênero *Pterodon* caracteriza-se principalmente por possuir fruto tipo sâmara. A espécie *P. pubescens* é conhecida por sucupira-branca, fava de sucupira, faveiro, sucupira e sucupira-lisa, árvore de 10 a 20m de altura por 40 a 60cm de diâmetro do tronco. A madeira é caracterizada como pesada a muito pesada (densidade de 0,90 a 1,10 g/cm³), cerne variando de castanho claro amarelado ao castanho, ou ainda, castanho róseo levemente avermelhado, superfície pouco lustrosa, apresentando finas estrias longitudinais das linhas vasculares, textura média. A madeira é muito utilizada na construção civil graças a sua alta resistência natural ao apodrecimento. Essa resistência natural pode ser atribuída a milldurona, 4', 5', 6, 7-tetrametoxi-isoflavona e 2', 3', 4', 5, 7-pentametoxi-isoflavona isoladas de seu cerne. A casca pardo-acizentada, lisa, íntegra, apresenta fissuras quando velha (Assumpção 1972).

As folhas são compostas, paripenadas, folíolos de pecíolos curto, opostos ou levemente alternos, oblongos e ápice emarginado. As flores são pequenas, róseo-arroxeadas, reunidas em panículas densas, pedicelo com aproximadamente 1,5 a 1,8cm de comprimento; cálice glabro, apresentando cinco lacínios; pétalas curtas, vexilo obovado, emarginado; carena de pétalas estreitas e base auriculada. Os estames são monadelfos, de anteras iguais, pequenas e rimosas. Ovário estipitado de estigma puntiforme, estilete fino e encurvado e um óvulo

pêndulo. Floresce durante os meses de setembro a outubro, (Heringer e Ferreira 1972). O fruto é um legume orbicular, lenhoso, com asa ao redor, monospermo de 5 a 6 cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura, (Figura 2).

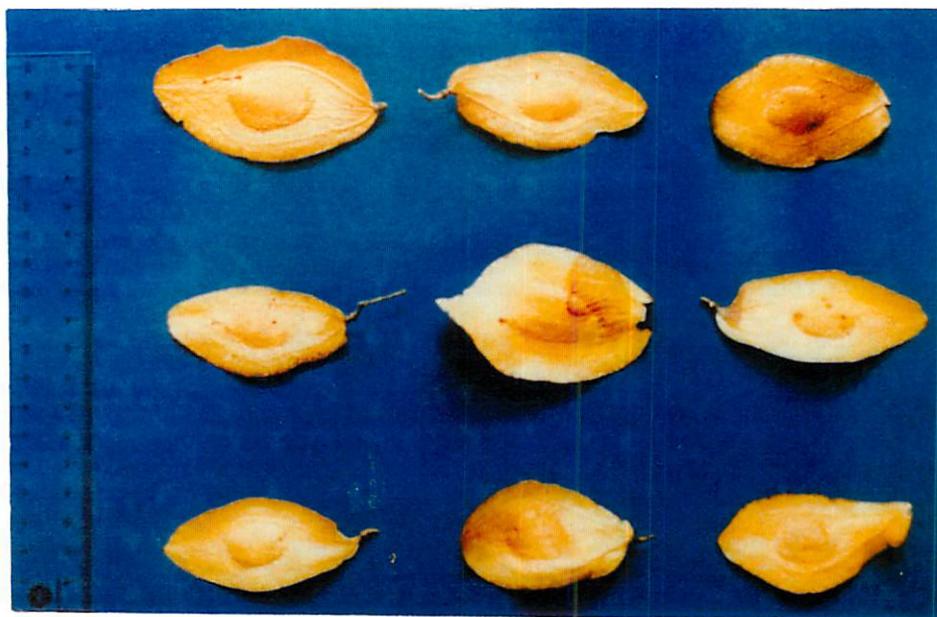


FIGURA 2. Frutos de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (sucupira branca).

O seu endocarpo é provido de glândulas oleosas, de forma geralmente alongada (Figura 3), e a semente é marrom, luzidia, alongada, com extremidades arredondas, (Heringer e Ferreira 1972).. O óleo é muito apreciado na medicina popular nas infecções tanto de garganta quanto reumáticas. Pesquisas realizadas por Mors, Pellegrino e Santos Filho (1966) tendo sido isolados quatro diterpenos, um dos quais, 14,15- epoxigeranilgeraniol, que protege contra infecção por cercárias de *Schistosoma mansoni*. Estudou-se também a genotoxicidade in vivo e in vitro deste cercaricida natural em células de mamíferos, (Dias 1993).



FIGURA 3. Sementes de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (sucupira branca).

Recentemente descobriram propriedades anti-inflamatórias com o isolamento da substância ácido 4-alfa, 7-beta-diidroxivouacapano-17-betaóico (Duarte et al., 1992). A maturação dos frutos verifica-se nos meses de junho a julho.

A propagação por semente apresenta sérios obstáculos aos métodos normalmente utilizados devido à semente ser coberta com envoltório lenhoso do fruto e ainda ser essa camada pontuada de glândulas oleosas que impedem a penetração d'água. Em condições naturais, a semente necessita de mais ou menos quatro anos para produzir plântulas, (Heringer 1971).

2.2 Germinação de Sementes

A maioria das espécies agro-silvícolas tradicionais dispõem de estudos sobre germinação, o que infelizmente não ocorre com as essências nativas dos cerrados, mas atualmente, com o crescente interesse por parte dos pesquisadores, aos poucos, vêm se revelando o potencial dessa vegetação até então desconhecido. Estudos nesta área estão sendo incrementados.

Segundo Labouriau (1983), a germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado botanicamente como a retomada do crescimento do embrião, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula. Entretanto, para os tecnólogos de sementes, a germinação é reconhecida como tal, desde que as plântulas apresentem tamanho suficiente para que se possam avaliar a normalidade de suas partes e a sua possibilidade de sobrevivência.

Uma semente viável em repouso, por quiescência ou dormência, quando são satisfeitas uma série de condições externas (do ambiente) e internas (intrínsecas do órgão), ocorrerá o crescimento do embrião, o qual conduzirá à germinação. Por isso, do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (Borges e Rena 1993).

No entanto, sementes viáveis de muitas espécies não germinam mesmo quando são favoráveis os fatores externos que propiciem sua germinação como água, oxigênio e luz. Neste caso são denominadas “dormentes”.

Sementes de plantas que foram domesticadas há muitos anos geralmente são menos dormentes que as de plantas silvestres ou das espécies recém domesticadas, (Malavasi 1988). A dormência é a habilidade das sementes de retardar sua germinação até que o momento e o lugar sejam certos. É um mecanismo que distribui a germinação no tempo para favorecer e garantir a sobrevivência das espécies, (Carvalho e Nakagawa 1983; Popinigis 1985; Malavasi 1988; Eira et al 1993). Mas a dormência é um mecanismo

desvantajoso porque induz grande desuniformidade entre as mudas.

Conforme Carvalho e Nakagawa (1983) existem pelo menos 3 mecanismos de dormência de sementes: a) Sistema de controle de entrada de água no interior da semente; b) Sistema de controle do desenvolvimento do eixo embrionário; e c) Sistema de controle do equilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras do crescimento.

Amen, citado por Carvalho e Nakagawa (1983) reconhece apenas 2 mecanismos: aquele que ocorre em sementes albuminosas devido ao equilíbrio de hormônios promotores-inibidores e o que ocorre nas sementes exalbuminosas devido a impermeabilidade da casca à água.

A dormência por impermeabilidade à água ocorre principalmente em sementes da família *Leguminosae*, e em algumas espécies das famílias *Malvaceae*, *Chenopodiaceae*, *Convolvulaceae*, *Solanacea* e *Liliaceae*, (Ballard 1973; Ferreira 1976; Liu, Khatamian e Fretz 1981; Carvalho e Nakagawa (1983); Halliday e Nakao 1984; Popinigis 1985; Malavasi 1988; Varela, Brocki e Sá 1991; Ferreira, João e Heuser 1992; Eira, Freitas e Mello 1993; Santarém e Aquila 1995; Ribas, Fossati e Nogueira 1996; Lima e Garcia 1996).

Estima-se que cerca de 2/3 das espécies florestais apresentam sementes com problemas de dormência (Ledo 1979) citado por Lima e Garcia (1996).

A família *Leguminosae* é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13.000 espécies espalhadas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. É constituída de 3 subfamílias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Faboideae* (*Papilionoideae*) (Joly (1993).

Popinigis (1985) afirma que a impermeabilidade do tegumento à água, característica comum em espécies da família *Leguminosae* é devido a camada de células paliçádicas, estrutura responsável por esta restrição; o que foi observado também por Ballard (1973); Barradas e Handro (1974); Liu, Khatamian e Fretz

(1981); Varela, Brocki e Sá (1991); González-Melero, Pérez-García e Martínez-Laborde (1997).

Em estudos mais detalhados sobre a impermeabilidade do tegumento em leguminosas, Ballard (1973) observou que o tegumento interfere na translocação de água ou gases, sendo ainda uma resistência mecânica ao entumescimento. A impermeabilidade à água é uma propriedade apresentada especialmente nas leguminosas *Papilionoideas*. Com microscópio eletrônico experimentos evidenciaram que a impermeabilidade à água, não é imposta apenas pelas cutículas cerosas, mas pelas regiões suberizadas das células de Malpighi. Hagon e Ballard (1969), usando resinas, provaram que a permeabilidade é conduzida apenas pelo estrofiolo, quando este se encontra aberto.

Estudos anatômicos em *Prosopis tamarugo*, a conhecida algaroba, árvore pertencente a subfamília *Mimosoideae*, Serrato et al (1986) concluíram que a barreira à infiltração na semente consistia de uma camada hidrófoba, constituída de substâncias lipídicas denominadas de “parte cilíndrica”. A permeabilidade da semente só é conseguida quando se quebra o tegumento da semente até atingir essa camada, do contrário ela permanecerá dura. Acrescentou ainda que a quebra do tegumento envolve toda a testa, e não somente regiões particulares como o estrofiolo em *Acacia kempeana*.

Manning e Van Staden (1987) observaram que embora detalhes específicos de diferenciações celulares sejam variáveis entre as espécies, contudo as origens histogênicas e subseqüentemente as diferenciações da testa da semente, que parecem ser próprias das *Papilionoideae*, muito provavelmente pertençam a toda família *Leguminosae*. A impermeabilidade consiste de uma fina camada de cutícula na parede externa das células paliçádicas, que contém depósitos de lignina ou suberina, dependendo da espécie e do seu nicho ecológico. O estrofiolo é uma área de intrínseca sensibilidade no tegumento da semente, mas que no entanto é extremamente resistente a rompimentos, sendo

necessário o emprego de escarificação química ou mecânica para que haja ruptura e a conseqüente permeabilidade.

Angosto Trillo e Matilla Carro (1993) estudando tegumento em duas diferentes espécies de arbóreas, relataram que, em sementes de *Astragalus*, a camada de células tangenciais eram mais estreitas em sementes obtidas de maiores altitudes e também o tegumento da semente era bem menos áspero do que o tegumento de sementes obtidas de menores altitudes. Em *Adenocarpus*, a camada de células tangenciais internas foram mais finas e o tegumento também se mostrou mais macio nas sementes coletadas à altitude de 1520m, do que naquelas de mais baixa e maior altitude. Quanto à impermeabilidade, pode ser explicada pela presença da lignina na camada de células de Malpighi e também na zona entre o tegumento interno e o tegumento externo.

Um único gene foi encontrado para controlar a imposição de dormência no tegumento, mas a natureza dos fatores nucleares ainda não estão muito claros Garbutt e Witcombe, citado por Foley e Fennimore (1998).

Para superar a dormência, vários métodos podem ser utilizados, os mais comuns são: embebição em água, retirada do tegumento, desponje (corte do tegumento), furar o tegumento, a escarificação mecânica que consiste em esfregar as sementes contra superfícies abrasivas, tais como lixas ou pedras, imersão em água quente ou fria, água oxigenada, escarificação química com ácido sulfúrico, ácido clorídrico, soda, acetona e álcool (Popinigis 1985); Malavasi 1988; Passos, Lima e Albuquerque 1988; Eira, Freitas e Mello 1993; Santarém e Áquila 1995). O método a ser empregado na superação da dormência deve ser determinado para cada espécie, visto que todos esses tratamentos apresentam vantagens e desvantagens.

O tratamento pré-germinativo com ácido sulfúrico concentrado tem apresentado bons resultados em sementes de leguminosas. Conforme os dados obtidos por Ferreira (1976) com *Mimosa bimucronata* (Maricá); Liu,

Khatamian e Fretz (1981) com *Gymnocladus dioicus*, *Gleditsia triacanthos*, e *Cercis canadensis*; Halliday e Nakao (1984) com 28 espécies de leguminosas arbóreas; Passos, Lima e Albuquerque (1988) com *Leucaena leucocephala*; Áquila e Fett Neto (1988) com *Leucaena leucocephala*; Rodrigues, Aguiar e Sader (1990) com *Cassia bicapsularis*, *Cassia javanica* e *Cassia speciosa*; Varela, Brocki e Sá (1991) com *Stryphnodendron pulcherrimum*; Ferreira, João e Heuser (1992) com *Acacia bonariensis* e *Mimosa bimucronata*; Danthu, Roussell, Dia e Sarr (1992) com *Acacia senegal*; Eira, Freitas e Mello (1993) com *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril ou orelha de negros); Todd-Bockarie, Duryea, West e White (1993) com *Cassia sieberiana*; Santarém e Áquila (1995) com *Senna macranthera*; Cruz et al., (1995) com *Canavalia brasiliensis*, *Leucaena leucocephala* e *Calopogonium mucunoides*; Martins-Loução, Duarte e Cruz (1996) com *Ceratonia siliqua*; Ribas, Fossati e Nogueira (1996) com *Mimosa bimucronata*; Andrade et al., (1997) com *Bowdichia virgilioides* (sucupira-preta); Lima, Borghetti e Sousa (1997) com *Enterolobium contortisiliquum*. No entanto, a escarificação química não tem sido utilizada em escala comercial, pela sua periculosidade, risco de queimadura na pessoa que executa a escarificação. Pelo seu alto poder corrosivo e por sua violenta reação com a água, causando elevação de temperatura e respingos ao redor (Popinigis 1985). Áquila e Fett Neto (1988) observaram que em *Leucaena leucocephala*, a ação do ácido é mais drástica que de outros métodos utilizados e dependendo do tempo de imersão pode haver destruição de porções da testa, prejudicando a semente. Upreti e Dhar (1997) relatam que, mesmo com poucos minutos, o ácido sulfúrico tem uma ação drástica na redução de germinação em *Bauhinia vahlii* danificando o embrião. Grande quantidade de plântulas anormais foram obtidas por Andrade et al., (1997), estudando quebra de dormência em Sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*).

Outro método muito utilizado é o da imersão em água fervente. Para

Acacia spp., recomenda-se imergir as sementes em água quase fervendo em uma quantidade cerca de três vezes seu volume até que a mesma torne-se fria (Brasil 1992). Resultados satisfatórios de germinação de sementes foram obtidos por Ledo, citado por Varela, Brocki e Sá (1991) com *Schizolobium parahybum* (Vell) Blake (guapuruvu) e também com *Piptadenia obliqua* (Pers) Macbr (angico) e olho de cachorro *Pithecellobium parvifolium* (Willd) Benth quando tratadas com água quente entre 90°C a 100°C, Souza, Drumont e Silva citados por Varela, Brocki e Sá (1991). Para *Mimosa scabrella* (bracatinga), os melhores resultados também foram em imersão em água quente entre 70 e 90° C deixando-as em repouso nesta água por um período de 18 horas segundo Bianchetti, citado por Ribas Fossati e Nogueira (1996). Bons resultados foram encontrados para *Parkinsonia aculeata* L. (turco) conforme Torres e Santos citados por Ribas, Fossati e Nogueira (1996) em temperatura de 80-90° C. Maiores percentagens de germinação com *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze (maricá) foram obtidas, quando as sementes foram imersas em água à temperatura de 80° C seguido de resfriamento natural das sementes por 24 horas Ribas, Fossati e Nogueira (1996).

Para muitos casos, a imersão em água quente não é eficiente, como relatam Liu, Khatamian e Fretz (1981) com as leguminosas, arbóreas, ornamentais: *Gymnocladus dioicus*, *Gleditsia triacanthos* e *Cercis canadensis*, que permaneceram por 1 minuto em água fervente. Germinação irregular ocorreu com *Leucaena leucocephala*, por imersão a 100° C por 10 minutos, conforme Áquila e Fett Neto (1988). Rodrigues, Aguiar e Sader (1990) não obtiveram germinação com 5 espécies de Cássia na imersão em água fervente. Já com *Stryphnodendron pulcherrimum*, a água à temperatura de 90° C teve uma ação prejudicial indicando que ocorreu dano fisiológico na estrutura interna (Varela, Brocki e Sá 1991). O mesmo ocorreu com sementes de *Acacia senegal*, a maioria das sementes morreram apenas com uma breve fervura (Danthu,

Roussel e Sarr 1992). Eira, Freitas e Mello (1993) observaram que, em *Enterolobium cortortisiliquum* (tamboril ou orelha de negro), a imersão em água quente promoveu respostas bem diferenciadas. Este tratamento levou a crer que os resultados variam com a progênie, de modo que não pode ser recomendado para a superação dessa espécie de maneira generalizada. Problemas também ocorreram com a germinação de *Leucaena leucocephala*, segundo relato de Gosling, Samuel e Jones (1995); na qual as sementes tratadas à altas temperaturas resultaram em plântulas anormais e outras morreram. Santarém e Áquila (1995), em experimentos de germinação com *Senna macranthera*, observaram que a água quente à 90°C, por 15 minutos, só promoveu a germinação em sementes armazenadas por 2 anos. Em experimentos de imersão em água quente a 100°C, por 1 e 2 minutos, foram observados os maiores valores de plântulas anormais em sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*), segundo Andrade et al., (1997). González-Melero, Pérez-Garcia e Martínez-Laborde (1997) relataram que sementes de *Coronilla* não germinaram quando foram submetidas ao tratamento de 80°C, muito provavelmente a temperatura causou dano ao embrião.

O método da escarificação mecânica é muito utilizado, e consiste em esfregar as sementes contra superfícies abrasivas tais como lixas ou pedras. É um procedimento que pode ser utilizado no laboratório, e em alguns casos para escalas comerciais.

A escarificação mecânica mostrou resultados eficientes em *Prosopis flexuosa* e *Prosopis chilensis* Catalán (1992). As sementes foram separadas do endocarpo e submetidas a escarificação mecânica através de uma debulhadora. A mesma metodologia foi aplicada, mostrando ser o método mais eficiente para as espécies *Prosopis chilensis*, *P. flexuosa*, *P. nigra*, *P. alba*, *P. caldenia* e *P. affinis* Catalán e Balzarini (1992). Bons resultados foram relatados por Todd-Bockarie et al., (1993), em experimentos realizados com *Cassia sieberiana*

utilizando esfarelador comercial e moedor de café para escarificar as sementes. Alto índice de germinação foi obtido em *Bauhinia racemosa* por Prasad e Nautiyal (1996), escarificando com lixa a semente na região próxima à micrópila e no local oposto à micrópila. Monteiro e Ramos (1997) observaram maior número de plântulas nas sementes escarificadas através de lixa para massa nº 120 nas sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril ou orelha-de-negro), semeadas em condições de viveiro. A escarificação mecânica através de lixa abrasiva, na extremidade oposta ao embrião promoveu alto índice de germinação, superior a 80% nas espécies: *Senna macranthera*, *Senna multijuga* e *Stryphnodendron polyphyllum*, em experimentos realizados por Lemos Filho et al (1997). Em experimentos com as espécies *Coronilla juncea*, *C. valentina* e *C. minima*; González-Melero, Pérez-García e Martínez-Laborde (1997) obtiveram alto índice de germinação nas três espécies. O método de escarificação mecânica tem-se mostrado extremamente simples, de baixo custo e eficiente para muitas espécies, no entanto cuidados devem ser tomados com algumas espécies, como é o caso da *Leucaena leucocephala*, que apresentou menor crescimento nas plântulas. Este fato pode estar relacionado à perda de substâncias de reserva, através da fratura produzida pela escarificação, Brown, citado por Áquila e Fett Neto (1988). No entanto, este tratamento não se mostrou eficiente na quebra de dormência de *Schyzolobium parahybum* (guapuruvu), Cândido et al., citado por Rodrigues, Aguiar e Sader (1990).

Procedimento de escarificação para quebra de dormência, muito utilizado em laboratório, é o chamado desponete, que consiste em cortar uma pequena parte do tegumento. Espécies como *Piptadenia obliqua*, *Pithecellobium parvifolium* e *Cassia excelsa* tiveram melhores resultados de índice de velocidade de germinação, segundo experimentos de Souza et al., citados por Varela, Brocki e Sá (1991), com o procedimento do desponete. Ferreira, João e Heuser (1992) obtiveram germinação mais rápida e uniforme em sementes de

Acacia bonariensis (Gill) e *Mimosa bimucronata* (D.C.) O.K. fazendo um pequeno corte com alicate, na região lateral do tegumento da semente. Resultados satisfatórios também foram obtidos por Todd-Bockarie et al., (1993) com sementes de *Cassia sieberiana*, conseguindo uma porcentagem de germinação de 96%. O desponte também foi feito em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (orelha-de-negro) por Borges et al., citado por Eira, Freitas e Mello (1993), conseguiram altos índices de germinação nesta espécie. As sementes de *Leucaena leucocephala* tiveram grande efeito benéfico na germinação quando realizado o desponte, conforme Gosling, Samuel e Jones (1995).

De todos os métodos utilizados para a superação da dormência, por dureza ou impermeabilidade do tegumento da semente, o mais utilizado por sua praticidade é a escarificação química, através da aplicação do ácido sulfúrico. No entanto, cuidados devem ser tomados quanto ao objetivo das plântulas obtidas.

A relativa eficácia de vários tratamentos químicos para quebra de dormência deveria levar em consideração as propriedades físicas de substâncias sub estimadas. Muitos dos produtos químicos usados para superação de dormência são tóxicos para o crescimento vegetativo. Por isso, é um perigo a introdução de químicos artificiais, que podem confundir a interpretação dos resultados obtidos (Cohn 1996b).

Dados experimentais demonstraram claramente que a absorção pelas sementes de produtos químicos para quebra de dormência eram extremamente rápidos, e que as respostas fisiológicas das sementes eram igualmente rápidas. A integridade estrutural dos produtos químicos para quebra de dormência dentro da semente não é estável, os químicos são rapidamente metabolizados (Cohn 1996a).

2.3 Germinação em sementes de sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.)

Como já foi mencionado anteriormente, a sucupira branca é uma árvore da família das leguminosas, cujas sementes apresentam impermeabilidade à água.

Alguns trabalhos já foram realizados objetivando a superação da dormência da semente; Corsini (1967), visando produção de mudas em viveiro, utilizou dois métodos; por escarificação e água fervente a 100° C.

Em experimentos realizados por Reis (1976), observou-se que o poder germinativo destas sementes foi de aproximadamente 18% para as de tegumento claro e de 13,5% para as escuras em 54 dias. No entanto, no teste de tetrazólio e no teste de germinação de eixos embrionários isolados, resultaram em cerca de 85% de sementes viáveis e cerca de 95% de germinação, respectivamente. Com o desponete (aplicação de um corte no tegumento das sementes), ocorreu uma taxa de 97% de germinação, em menos de 14 dias.

A aplicação de tratamentos com substâncias escarificantes, ácido sulfúrico, ácido fórmico e hidróxido de sódio foram muito drásticos e causaram efeitos deletérios, reduzindo a germinação das sementes. O álcool etílico e acetona foram aparentemente promissores (Reis, Brune e Rena 1985).

Reis e Rena (1987), observaram, num bio ensaio utilizando sementes de arroz, que as sementes de sucupira liberaram substâncias para o meio de cultivo que inibiram a germinação das sementes de alfaca. A presença de inibidores numa semente não implica, necessariamente, que eles participem ativamente na regulação natural da dormência desta semente. Na semente de sucupira, há uma evidência de que os inibidores não estejam participando diretamente do processo de germinação, já que o simples corte do tegumento resultou em imediato aumento da embebição.

Intenso ataque de fungos foi observado por Melo, Ribeiro e Lima (1979) em teste de germinação com sementes de sucupira intactas, embora estas tivessem sido lavadas cinco vezes em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 0,2%. A taxa de germinação foi apenas 66% em 14 dias.

2.4 Germinação de embriões e eixos embrionários

O embrião é a estrutura que se desenvolve a partir de um zigoto e que se diferencia em tecidos e órgãos (Puga, Nass e Azevedo 1991).

O embrião das dicotiledôneas é constituído por um eixo embrionário e dois cotilédones. Os cotilédones são órgãos de armazenamento de reservas alimentícias destinados a fornecer energia e moléculas capazes de sustentar o crescimento do embrião. O eixo embrionário é composto de três partes: o epicótilo ou plúmula, a radícula e o hipocótilo Popinigis (1985).

O eixo embrionário tem função reprodutiva sendo capaz de iniciar divisões celulares, e de crescer. É a parte vital da semente. É um “eixo”, porque inicia o crescimento em duas “direções”: para as raízes e para o caule (Popinigis 1985).

Em algumas espécies e para determinadas circunstâncias a cultura de embriões “*in vitro*” tem sido utilizada principalmente no sentido de superar dormência de sementes devido à imaturidade do embrião ou presença de substâncias inibidoras no endosperma; estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião; testar viabilidade de sementes e recuperar híbridos raros de cruzamento incompatíveis (Hu e Ferreira 1990; Pasqual, Ribeiro e Ramos 1990).

Os citros apresentam o fenômeno da poliembrionia, que dificulta a identificação dos embriões zigóticos, comprometendo seu desenvolvimento pela competição com os embriões nucelares, dificultando o melhoramento das

espécies cítricas. Pasqual, Ribeiro e Ramos (1990), trabalhando com embriões da cultivar Natal (*Citrus sinensis* Osb.) em condições “*in vitro*”, observaram que diferentes concentrações de carvão ativado e de ácido giberélico influenciam significativamente o desenvolvimento radicular dos embriões, e que o melhor enraizamento foi obtido com 0,01 e 1,0 mg/L de GA₃ e 1,0 g/L de carvão ativado.

A retirada do tegumento em várias espécies do gênero *Citrus* fez com que ocorresse uma maior porcentagem de germinação. Nestas espécies, a grande quantidade de mucilagem depositada na superfície da semente cria uma barreira a entrada de água. Radhamani, Malik e Chandel (1991) utilizaram as espécies: *Citrus aurantifolia*, *C. limonia*, *C. lemon*, *C. reticulata*, *C. aurantium*, *C. maxima* e *C. maderaspatana*, observaram as diferentes texturas de tegumento e diferentes espessuras de mucilagem que dificultavam a entrada de água em cada espécie. O cultivo de embriões favoreceu a uma alta porcentagem de germinação.

Levi et al., (1992) realizaram interessante estudo através do cultivo de eixos embrionários de ervilha (Leguminosae) *Pisum sativum* L.. Isolando os eixos embrionários e cultivando-os em meio líquido, modificado, de Joy e Folkes (1965) estudaram a reativação e multiplicação de células. As diferentes cinéticas de reativação em dois sistemas foram explorados pelos pesquisadores, a correlação ou independência de ocorrências durante a germinação. Apresentou a reativação do ciclo celular e o conteúdo específico de proteínas nucleares. E principalmente as reações do embrião na germinação.

A colheita do pêssago com genótipos de maturação precoce destinado ao comércio é feita antes do fruto amadurecer. Portanto, a semente não germina porque se encontra completamente imatura. Pinto, Byrne e Rogers (1993) fizeram um estudo do cultivo do embrião e do óvulo do pêssago *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o de Bhojwani e Razdan (1983). Os pesquisadores

observaram que óvulos perfurados ao redor da micrópila, sem danificar o embrião, tiveram melhor desenvolvimento do que aqueles óvulos intactos. A *l*-glutamina promove o desenvolvimento do embrião quando suplementado ao meio de cultura, mas no entanto não deve ser utilizado juntamente com ácido indolilacético e cinetina porque ocorre efeito antagônico. Os reguladores de crescimento não promovem o desenvolvimento dos embriões.

A Fabaceae *Vicia narbonensis* é uma espécie silvestre da fava (*Vicia faba* L.). A espécie *V. narbonensis* L. é resistente à seca, resistente à doenças e bem adaptada a solos de baixa fertilidade. Portanto, seria benéfico a obtenção de híbridos entre as duas espécies. Contudo quando se realiza polinização cruzada entre as duas espécies, após cinco dias ocorre o abortamento do jovem saco embrionário. Lazaridou, Roupakias e Economou (1993), estudaram uma forma de isolar o embrião de *V. narbonensis* para que futuramente fosse possível obter este importante híbrido. Os pesquisadores obtiveram germinação de embriões de *V. faba* quando cultivaram vagens de 11 dias em meio modificado de Murashige e Skoog e germinação de embriões de *V. narbonensis* através do cultivo de vagens de 4 dias de idade em meio SH Stewart e Hsu (1977).

O cultivo de embriões *in vitro* para coco (*Cocos nucifera* L.) é muito importante, principalmente no que se refere a intercâmbio de germoplasma para programas de melhoramento, qualidade fitossanitária e armazenamento, segundo Ashburner, Thompson e Burch (1993). Estes pesquisadores estudaram um meio de cultura adequado para germinação e outro para o desenvolvimento destes embriões. Observaram que os embriões germinaram utilizando meio básico modificado de Murashige e Skoog e para o surgimento de raízes a concentração ótima de ANA (ácido naftalenoacético) é de 175-200 μM e a sacarose na concentração de 4-6%, em meio de cultura BM_Y₃ Eeuwens (1978).

Os embriões de damasco (*Prunus armeniaca* L.) normalmente abortam antes da maturação dos frutos. Burgos e Ledbetter (1993), perceberam o quanto

seria útil a cultura de embriões em damasco, para programa de melhoramento. As boas cultivares de damasco poderiam ser utilizadas como progenitoras. Os pesquisadores observaram através dos experimentos realizados, que o comprimento ideal para sobrevivência dos embriões isolados eram aqueles que estavam entre 5 a 9 mm. O meio de cultura C2d favoreceu ao aumento de peso dos embriões, enquanto o meio de cultura SBH de Smith, Bailey e Hough (1969) favoreceu o comprimento. O meio C2d de Chee e Pool (1987) possui altas concentrações de sais.

A espécie arbórea tropical, *Ocotea catharinensis* Mez. muito conhecida no Brasil e principalmente na Mata Atlântica, com o nome vulgar de canela-preta ou canela-coquinho apresenta dificuldades em sua propagação. As sementes de *Ocotea* perdem a viabilidade muito rapidamente, além de terem uma frutificação bem irregular, e inibidores de germinação no fruto. Moura-Costa, Viana e Mantell (1993), isolaram embriões zigóticos maduros de *Ocotea catharinensis* Mez. e cultivaram em meio modificado de Murashige e Skoog com carvão ativado a 0,3%, sacarose 2% e 0,8% de ágar. Os embriões foram cultivados a 25° C no escuro e depois que germinaram foram transferidos para meio de cultura de multiplicação através de embriogênese somática. Este meio de cultura foi enriquecido de 2,4D (ácidos 2,4-diclorofenoxiacético) e o meio de cultura utilizado foi o WPM de Lloyd e McCown (1981) com metade da concentração dos sais.

Levi et al., (1993) continuando com experimentos de isolamento de eixos embrionários de ervilha (*Pisum sativum* L.) observaram de forma mais detalhada o efeito da aplicação exógena do ácido abscísico na germinação. Eixos embrionários foram isolados de sementes de ervilha e cultivados conforme Levi et al., (1992). O ácido abscísico (ABA) foi suplementado em meio de cultura completo e em meio de cultura sem KNO₃, que é a fonte de K⁺ em meio de cultura completo. Na presença de ABA somente pouco crescimento

meristemático radicular foi observado nas primeiras 24 horas do ciclo celular da germinação. Na ausência de KNO_3 o efeito inibidor do ABA no ciclo celular aumentou, e a transição da fase G1 para a fase S foi quase completamente inibida depois de 24 horas de germinação.

Assy-Bah e Engelmann (1993) obtiveram com seus experimentos condições ótimas para conservação “*in vitro*” a médio prazo para embriões zigóticos de coco. Estes estudos são de grande importância principalmente para conservação em bancos de germoplasma. Os embriões zigóticos maduros com 10 a 12 meses de polinizados foram extraídos e inoculados *in vitro* em meio de cultura definido por Assy-Bah; Durand-Gasselín, e Pannetier (1987). Observaram que são importantes a presença de sacarose e carvão ativado no meio de recuperação durante o período de armazenamento. Os pesquisadores conseguiram conservá-los por um período de 12 meses.

Na maturação antecipada de *Prunus*, o amadurecimento dos frutos precede o amadurecimento dos embriões causando abortamento destes. Portanto, não é possível a utilização de sementes como progenitores em programa de melhoramento visando frutos com maturação precoce. Emershad e Ramming (1994), utilizaram vários meios de cultura para diferentes espécies de *Prunus*: pêsego (*Prunus persica* L.) Batsh; nectarina (*Prunus persica* L.) Batsch var. *mucipersica* Schneid.) e ameixa (*Prunus salicina* Lindl.). Os embriões cultivados possuíam de 5 a 10mm de comprimento. Os efeitos de entumescimento, germinação e formação da planta foram comparadas com os vários meios de cultura. Os embriões de todos os genótipos se entumesceram durante a estratificação nos meios de cultura. O pêsego e a nectarina obtiveram melhor desenvolvimento em WPM e a ameixa ao meio de cultura C_2d , de uma forma geral todos os genótipos desenvolveram bem em meios WPM e C_2d (Chee Medium) de Chee e Pool (1987).

O cultivo de eixos embrionários de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) foi

utilizado para obtenção de embriogênese somática por McKently (1995). Foram colhidas sementes de 14 genótipos representando as três variedades botânicas do amendoim: *Arachis hypogaea* ssp. *hypogaea* var. *hypogaea*; *A. hypogaea* ssp. *fastigiata* vars. *vulgaris* e *fastigiata*. Os explantes foram cultivados em meio de Murashige e Skoog e suplementado com 12,42 μM de picloram. Os embriões somáticos foram isolados repetidas vezes em meio líquido com picloram 4,14 μM e com 10 meses foram transferidos para meio básico sólido de MS (Murashige e Skoog, 1962 para se desenvolverem. A variedade *fastigiata* apresentou baixa frequência embriogênica em relação as variedades *hypogaea* ou *vulgaris* que apresentaram respostas similares.

Giorgini e Comoli (1996) através do isolamento e cultivo do embrião de café observaram a atividade da enzima endo- β -mananase. A atividade da enzima aumenta da extremidade micropilar para a extremidade oposta da semente correlacionando com o crescimento dos cotilédones. Quando os endospermas isolados foram incubados na presença de reguladores de crescimento, somente o ácido giberélico acarretou um aumento de atividade enquanto que, o ácido abscísico ou cicloheximida inibem completamente a produção de mananase em sementes germinantes ou inibem o efeito promotor do ácido giberélico em endospermas isolados. Os pesquisadores concluíram que a atividade de endo- β -mananase e da a mobilização de galactomanano na semente de *C. arabica*, é um fenômeno essencialmente pós-germinativo que pode estar sob o estrito controle do embrião.

O cultivo de embriões *in vitro* de laranja pêra (*Citrus sinensis* Osb.) foram utilizados por Ribeiro et al., (1997), para determinar a interação do pH e do ágar no meio de cultura. Como já foi mencionado, em *Citrus* uma barreira para os trabalhos de melhoramento é a ocorrência da poliembrião, que é a presença de dois ou mais embriões na mesma semente. Neste trabalho foram utilizados frutos de 10 semanas com aproximadamente 5,5 cm de comprimento

de uma única planta da variedade laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.). Todos os embriões foram inoculados independentes dos estádios em que se encontravam em meio MS em várias concentrações de ágar e em diferentes valores de pH. Observaram que concentrações de ágar e valores de pH interagem significativamente no crescimento do sistema radicular e no percentual de sobrevivência *in vitro* de embriões de laranjeira Pêra. Para aumentar o percentual de germinação, o valor do pH do meio MS deve ser aferido para 6,7 e acrescido de 10,5 g/L de ágar. O desenvolvimento e crescimento dos embriões são maximizados em MS com 10,5 g/L de ágar.

Reis e Rena (1987) fizeram experimentos com eixos embrionários de Sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth) Benth]. Foram isolados eixos embrionários de sementes secas e de sementes que sofreram corte prévio no tegumento e posterior embebição em placas de Petri por 24 horas. Comparou-se com as sementes que sofreram corte no tegumento das sementes intactas e concluíram que o corte nas sementes acarretou redução do quociente respiratório e considerável aumento da taxa respiratória, indicando mudança no curso da respiração. No entanto a soma das taxas respiratórias, obtidas com eixos embrionários e cotilédones isolados separadamente, foi maior que a taxa respiratória das sementes cortadas, indicando que a barreira ao oxigênio e à água, imposta pelos tegumentos, não era totalmente removida pelo corte.

2.5 Plantas lenhosas x micropropagação

Os tipos de cultivo “*in vitro*” utilizados para propagação de plantas lenhosas não diferem muito dos tipos utilizados para outras espécies de plantas. A principal diferença na maioria dos casos é que somente tecidos jovens têm sido utilizados ou tem dado resultados satisfatórios, é raro sucesso com tecidos maduros. A micropropagação tem sido aplicada para multiplicar e propagar

numerosas plantas lenhosas nos últimos anos Sommer e Wetzstein (1984).

Dunstan e Thorpe (1986) afirmaram: até que os aspectos bioquímicos e fisiológicos da juvenilidade e maturidade sejam esclarecidos, não serão possíveis elucidar alguns padrões morfogenéticos que são observados na cultura de tecidos em arbóreas.

A propagação das plantas através da cultura de tecidos têm sido realizada pelo uso de calos, órgãos, células e culturas de protoplastos. Embora os explantes de espécies arbóreas tenham dificuldade de crescer e diferenciar “in vitro”, os primeiros tipos de cultivos foram utilizados experimentalmente com vários graus de sucesso em micropropagação de várias espécies arbóreas Bonga e Durzan (1987c).

Conforme Pierik (1990), quando uma planta envelhece sua capacidade regenerativa costuma diminuir, por isso tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens, melhor do que as plantas adultas. Especialmente no caso de árvores e arbustos. Os tecidos embrionários geralmente tem alta capacidade regenerativa. Os embriões e as sementes são utilizados frequentemente como material experimental para o cultivo de tecidos.

Os tecidos jovens, não lignificados, em geral são mais apropriados para o cultivo do que os tecidos velhos e lenhosos, contudo encontra-se um grande número de exceções na literatura Pierik (1990).

As arbóreas leguminosas são consideradas de importância econômica, particularmente em regiões tropicais, como fonte de material de construção e combustível. Plantações clonais de genótipos superiores com rendimentos acima da média, poderão contribuir com significativo melhoramento na produção de madeira. Técnicas de micropropagação através de brotações axilares ou embriogênese somática estão começando a ser desenvolvidas para leguminosas arbóreas e eventualmente as técnicas poderão suprir as plantações clonais Davey, Kumar e Hammatt (1994).

As técnicas de cultura de tecidos são indicadas para determinadas espécies do Cerrado, principalmente quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelas vias clássicas. Um exemplo seria o caso de multiplicação de plantas selecionadas por alta produtividade ou qualidade de frutos superiores. Se as estacas da espécie não enraizam, a micropropagação pode representar solução para sua propagação. Outro caso no qual a multiplicação “in vitro” seria vantajosa, surge quando a espécie é rara, como a pera-do-cerrado (*Eugenia klotzchiana*), ou produz poucas sementes, como a sucupira-branca e a produção de mudas é insuficiente para atender à demanda. Assim, a multiplicação por cultura de tecidos oferece a possibilidade de produzir dezenas ou centenas de mudas a partir de uma única semente ou matriz selecionada Melo et al., (1998).

Nas plantas naturalmente ocorrem a presença de substâncias químicas denominadas de endógenas. Estas substâncias regulam a planta tanto nutricionalmente como também no crescimento e no desenvolvimento. Os reguladores geralmente são ativos em baixas concentrações, e são conhecidos como hormônios. Produto químico sintético com atividade fisiológica similar as substâncias de crescimento das plantas são denominadas de “reguladores de crescimento”. Como os reguladores de crescimento são suplementados aos meios de cultura e portanto aplicados externamente aos tecidos, são denominados de exógenos. As principais classes de reguladores de crescimento ou hormônios são: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. George (1993a).

As auxinas são muito utilizadas, principalmente em trabalhos de micropropagação. As auxinas são incorporadas ao meio de cultura para promover formação de calos, crescimento de células em suspensão, órgãos, e regula a morfogênese, especialmente associada as citocininas. A escolha dos compostos e a concentração requerida depende: do tipo de crescimento ou

desenvolvimento necessário, do nível da auxina endógena do explante, da capacidade do tecido cultivado de sintetizar auxina naturalmente e da interação entre a auxina sintética aplicada e da auxina endógena. As principais auxinas são: AIA (ácido 3-indolilacético), ANA (ácido naftalenoacético), AIB (ácido indolilbutírico), 2,4,D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6 triclorepicolínico) CPA (ácido 4-clorofenoxi) acético, NOA (ácido naftoxiacético), George (1993a).

As citocininas produzem pouco efeito quando aplicadas as plantas intactas, mas tem visível efeito para estimular síntese de proteínas. As citocininas promovem a maturação dos cloroplastos e retardam a senescência das folhas destacadas. Os efeitos das citocininas são mais visíveis na cultura de tecidos quando são usadas juntamente com as auxinas, estimulam a divisão celular e controlam a morfogênese. Adicionados a cultura de tecidos em gemas, esses compostos superam a dominância apical e liberam as gemas laterais da dormência, neste aspecto possuem um efeito oposto ao das auxinas endógenas. As principais citocininas são: cinetina (Kin) (6 furfurilamino-purina), BAP (6-Benzilaminopurina), 2 ip (Isopenteniladenina), zeatina (ZEA) (N⁶-(4-hidroxi-3 metilbut-2 enil) aminopurina, PBA (6-Benzilamino) 9-2-tetraidropiranyl-9-H-purina, TDZ (thidiazuron) (N-phenyl-N⁷-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea), George (1993a).

O ácido giberélico (GA₃) aplicado em toda a planta influencia no crescimento e desenvolvimento, de diversas formas: no crescimento da haste, promovendo a floração ou induzindo a frutificação. Vários efeitos da giberelina em toda a planta são causados pelo aumento seletivo ou decréscimo na biosíntese e atividade das enzimas. O ácido giberélico mais utilizado é o GA₃ (2,4a, 7-trihidroxi-1-metil-8-metilene-gib-3 ene -1,10 ácido carboxílico-1-4 lactona, George (1993a).

O etileno é um regulador de crescimento em forma gasosa, produzido

por células vegetais, inclusive por células *in vitro*. O mesmo pode influir no padrão de desenvolvimento das culturas, mas a sua síntese, ou melhor, a sua presença nas culturas, é normalmente, regulada mais pelo tipo de fechamento ou vedação feito nos frascos de cultura do que pela composição do meio, Torres e Caldas (1990).

O ácido abscísico é um inibidor de crescimento *in vitro*. Em *Citrus* Giladi et al., citado por Torres e Caldas (1990) observaram que a adição de ABA ao meio de cultura promovia inibição do alongamento de gemas. No entanto, é bem eficiente para desenvolvimento normal e maturação de embriões somáticos, evitando a germinação precoce dos mesmos Ammirato citado por Torres e Caldas (1990.)

Barbosa et al., (1990) objetivando maximizar a proliferação *in vitro* de explantes de macieira, testaram sete concentrações de BAP (6-benzylaminopurina) em meio básico modificado de Murashige e Skoog (1962). Foram utilizados explantes da cultivar Gala provenientes de propágulos mantidos “*in vitro*” sob a forma de “culturas estoques”. Definiu-se, para Gala, a concentração ideal de BAP na faixa de 10,0 μM , a qual proporcionou a quantidade expressiva de 16,1 novas plantas em apenas 60 dias.

Proliferação e alongamento de brotações de café (*Coffea arabica* L.) foram observados por Pasqual e Barros (1992) quando utilizaram BAP 3mg/L na ausência de ANA. Para obter a multiplicação e a maior proliferação de brotações com mais de 1 cm, utilizaram a concentração de 0,5 mg/L de BAP. Os segmentos nodais utilizados foram obtidos através da repicagem de mudas oriundas de sementes *in vitro*. Os segmentos caulinares tinham aproximadamente 3mm e foram inoculados em meio de cultura com sais de MS e vitamina de Morel (1964).

As leguminosas arbóreas têm obtido relativamente pouco sucesso usando segmento de haste ou de raízes em sua propagação, segundo Rajadurai et

al., citado por Mathur e Mukunthkumar (1992). Proliferação de gemas nas leguminosas arbóreas *Bauhinia variegata* e *Parkinsonia aculeata* foram obtidas por Mathur e Mukunthakumar (1992). Através de segmentos nodais de 2 cm de comprimento, de árvores com 6 a 8 anos de idade. Utilizaram meio básico de MS suplementado com BAP, *Bauhinia* e *Parkinsonia* obtiveram um nível ótimo de multiplicação a 13,3 μM de BAP respectivamente. Brotos isolados com 3 a 4 nós foram transferidos para meio básico MS enriquecido de AIB (ácido indolilbutírico) havendo mais de 86% de enraizamento com 4,9 μM e 9,8 μM de AIB para *Bauhinia* e *Parkinsonia*, respectivamente.

A espécie arbórea ornamental *Telopea speciosissima* R. Br. possui problemas em sua propagação através de sementes, pois são muito susceptíveis a doenças e ocorre uma grande segregação varietal. Offord, Campbell e Mullins (1992) estabeleceram uma forma de propagação clonal nesta espécie. As plantas matrizes obtidas por estaquia foram cultivadas em casa de vegetação e pulverizadas com ácido giberélico a 60 μM . Os brotos terminais foram coletados e inoculados em meio MS suplementado com o dobro da concentração de ferro. Depois de 6 semanas os brotos axilares estavam alongados. Em seguida os micro brotos foram tratados com BAP. A concentração ótima foi de 1,25 μM de BAP. Estes brotos foram transferidos para tratamento com GA_3 , a melhor concentração foi de 2,5 μM de GA_3 para alongamento dos brotos obtidos.

Kristiansen (1992) conseguiu identificar o clone de *Ficus benjamina* com características de mais rápida proliferação e crescimento in vitro. Os explantes foram obtidos de clones cultivados em casa de vegetação. Brotos apicais foram inoculados em meio básico de MS, suplementado com 8,9 μM de benziladenina. Os explantes foram transferidos para meio de cultura fresco a cada três semanas. Depois de 3 a 4 subcultivos, começaram a crescer os aglomerados de brotações. Os aglomerados de gemas foram divididos e transferidos para meio fresco. Em seguida aglomerados de 4 a 6 brotações foram

transferidos para meio de enraizamento sem reguladores de crescimento. Observou-se que o clone “Cleo” atingiu um excelente crescimento em relação aos demais clones, com elevado índice de proliferação.

A multiplicação “in vitro” é uma forma eficiente para atender uma produção em larga escala de espécie frutífera arbórea, como é o caso do caju *Anacardium occidentale* L., que possui sementes recalcitrantes. D’Silva e D’Souza (1992) cultivaram nós cotiledonares de castanhas colhidas de árvores com 5 a 10 anos. Os nós cotiledonares foram inoculados em meio básico de MS com várias concentrações de cinetina, zeatina, 6-benzilaminopurina e água de coco; isolados e em combinação. Observou-se que a incorporação da maltose adicionada a sacarose e a benzilaminopurina resultaram em grande número de gemas. Para enraizamento, a melhor resposta foi com 2,9 μM de AIA e 4,9 μM de AIB.

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) é uma arbórea dos cerrados brasileiros, pertencente a família das leguminosas. Sua importância econômica é a produção de tanino, além de conter princípios farmacológicos e boa madeira para construção civil. O barbatimão não se propaga facilmente pelo método convencional de multiplicação vegetativa. Pasqual e Barros (1992) conseguiram obter multibrotações através de segmentos caulinares por germinação de sementes “in vitro”. Os segmentos foram inoculados em meio de MS. A maior proliferação de brotos de barbatimão obtida por organogênese direta do explante, se deu com o uso de 4,0 mg/L de BAP na ausência de ANA. O maior número de brotos com mais de 1 cm ocorreu na ausência de reguladores de crescimento.

A *Kielmeyera coriacea* Martius, conhecida popularmente como “Pau-Santo”, é também espécie vegetal típica dos cerrados. Por ter casca fortemente suberificada, extrai-se a cortiça. É também usada na medicina popular contra a dor de dente, como tônica, como emoliente e possui propriedades cercaricidas.

Sua propagação é predominantemente por sementes, mas seu desenvolvimento é lento e a desuniformidade genética de seus descendentes é muito grande. Arello e Pinto (1993) conduziram experimentos com segmentos nodais obtidos de plântulas provenientes da germinação de sementes *in vitro*. Utilizaram meio de cultura de Murashige e Skoog (1962), e observaram que a máxima proliferação de brotos foi obtida com o emprego de 5,0 mg/L de BAP mais 0,1 mg/L de ANA. A maior porcentagem média de brotos com mais de 1,0 cm foi conseguida em meios sem BAP. Maior proliferação de brotos com mais de 1,0 cm de altura ocorreu com o uso de 0,1 mg/L de BAP.

Schuch e Peters (1993) observaram que para obtenção de brotações de macieiras (*Malus prunifolia* e *Malus domestica*) utilizando-se o meio mineral de MS e benziladenina nas concentrações de 2,0 e 3,5 mg/L, favoreceu a multiplicação das cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh), respectivamente. Com a concentração de 3,5 mg/L de BAP, a adição de 1,0 mg/L de GA₃ afetam o número de brotações formadas.

Na Índia, a mirra (*Commiphora wightii*) é uma planta muito utilizada por ser balsâmica, na indústria de perfumes, incenso e na medicina Ayurvedica. Ultimamente, o interesse por esta planta deve-se ao fato dela possuir atividade anti-colesterol. Barve e Mehta, (1993) obtiveram alto índice de formação de brotos utilizando meio básico MS suplementado com 17,8 µM de benziladenina e 18,6 µM de cinetina, com 0,3% de carvão ativado. Depois os brotos foram transportados para meio com baixa concentração de benziladenina (1,8 µM) e cinetina (1,9 µM) para que ocorresse o alongamento. Para enraizamento as combinações mais eficientes foram 4,9 µM de AIB com 5,7 µM de AIA ou 5,4 µM de ANA.

A multiplicação de *Fagus sylvatica* L. (faia), árvore muito comum na Europa, cuja propagação através de sementes é muito difícil, foi obtida por

Vieitez, Ferro e Ballester (1993). Através do cultivo de eixos embrionários, obtiveram brotos axilares para os experimentos. Observaram proliferação de gemas em meio WPM suplementado com 0,5 mg/L de BA mais 2 mg/L de zeatina adicionado com 0,2 mg/L de ANA. Para enraizamento utilizou-se a auxina AIB na concentração de 1 g/L, sendo necessário um período de sete dias de escuro.

A Leguminosae *Acacia mearnsii* é de grande importância econômica evidente possuir alto teor de tanino em sua casca. No sentido de multiplicar árvores que contenham maior teor de tanino, Huang, Al-Khayri e Gbur (1994) obtiveram multibrotação com BAP a 2 mg/L (8,87 μ M) com presença ou ausência de 0,01 mg/L de AIB. Os segmentos com aglomerados de multibrotação foram transferidos para meio contendo 2 mg/L de BAP e 0,01 mg/L de AIB. O meio básico utilizado foi o MS. Para enraizamento, a concentração ideal foi de 0,6 mg/L (3,22 μ M) de ANA cultivando-os em metade da concentração de MS.

A multiplicação *in vitro* da arbórea ornamental *Cornus florida* L. foi no sentido de selecionar clones resistentes ao cancro e a antracnose, além de promover uma rápida propagação. Declerck e Korban (1994) cultivaram segmentos nodais em diversos meios de culturas. Observaram que a melhor resposta foi em meio WPM suplementado com 2,2 μ M 6-benziladenina (BA). Importante ressaltar que os micronutrientes utilizados foram do meio MS. Os brotos ficaram mais uniformes e com maiores internós com 3,3 μ M de BA.

A proliferação de brotos em *Fraxinus angustifolia* Vahl, arbórea ornamental utilizada em paisagismo, cujas sementes tem problema de dormência, foi obtida por Perez-Parron, Gonzalez-Benito e Perez (1994). Os pesquisadores utilizaram material juvenil e adulto para os experimentos. Segmentos nodais provenientes de sementes germinadas tiveram maior proliferação em meio QL Quoirin e Lepoivre (1977) mais 8,9 μ M de BA (benziladenina) e 0,49 μ M AIB (ácido indolilbutírico). Enquanto o material

proveniente de árvores (10 anos de idade) obtiveram maior índice de multibrotação em meio DKW Driver e Kuniyuki (1984) suplementado de 4,4 μM de BA e mais 0,98 μM de AIB. Detalhe importante é que os explantes adultos tiveram maior proliferação quando foram colocados em posição horizontal no meio de cultura. Para enraizamento a melhor resposta foi em meio com sais de WPM e vitaminas (LS) Linsmaier e Skoog (1965) suplementado com 0,98 μM de AIB e depois transferido para meio suplementado com 3,9 μM de AIB para brotos de origem adulto e para 4,9 μM de AIB para brotos de origem juvenil.

Pinto et al., (1994) obtiveram multibrotações em segmentos nodais e apicais de “pau-santo” (*Kielmeyera coriacea*) planta nativa dos cerrados de importância econômica, que vem sofrendo exploração predatória e que está extinguindo-se em muitas regiões. As sementes de “pau-santo” foram pré-germinadas em solução de ácido giberélico. As sementes foram cultivadas em meio de MS com metade da concentração dos sais e suplementado com ácido giberélico. Os segmentos nodais e apicais de *Kielmeyera* foram imersos em meio básico de MS com diferentes concentrações de benzilaminopurina. Observou-se que os segmentos nodais mostraram maior capacidade de produção de brotos em relação aos apicais. A maior taxa de multiplicação foi obtida com as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/L de BAP no explante nodal e 0,5 mg/L de BAP no explante apical. Melhor porcentagem de brotação com mais de 1,0 cm foi obtida com níveis de até 0,5 mg/L de BAP, independentemente do tipo de explante.

A leguminosa arbórea *Swartzia madagascariensis* (Desv.) é espécie considerada medicinal na África muito rica em saponinas. A propagação por sementes apresenta alto grau de variabilidade genética, a propagação in vitro foi usada por Berger e Schaffner (1995), objetivando selecionar genótipos com alto teor de saponinas. Brotos foram inoculados em meios básicos: MS, WPM, e B5

Gamborg, Miller e Ojima (1968). Todos os meios foram suplementados com 2,2 μM BA, foram utilizados também vários tipos de gelificantes. A maior indução de brotos foi obtida com ágar em meio MS contendo 2,2 μM de benziladenina. Para enraizamento, utilizou-se MS com metade da concentração suplementado com 26,8 μM de ácido naftalenoacético.

Multibrotação através de segmentos de nós cotiledonares foi relatado por França et al., (1995), em Barbatimão (*Stryphnodendron polyphythum*, Mart.). O barbatimão é árvore leguminosa típica do cerrado, sua casca possui propriedade medicinal, agente cicatrizante de ferimentos. Os explantes foram obtidos através de sementes germinadas em casa de vegetação. Os segmentos de nós cotiledonares foram inoculados em meio MS suplementados com diferentes tipos de citocininas. A melhor proliferação de gemas ocorreu com a concentração de 13,3 μM de BA (benziladenina). No entanto, brotos de maior comprimento foram obtidos com 0,04 μM de BA e 0,005 μM de ácido indolilacético. Para enraizamento, foi utilizada metade da concentração dos macronutrientes do meio MS suplementado com 5,37 μM de ácido naftalenoacético e 80 mg/L de floroglucinol.

Para induzir brotações de gemas axilares dos segmentos nodais de abacateiro (*Persea americana* Mill-cv. Fuerte), Biasi, Koller e Kampf (1994) obtiveram melhor índice quando adicionaram 3 mg/L de BAP em meio reduzido pela metade da concentração de sais do meio MS, para evitar oxidação dos explantes. O enraizamento foi obtido pela indução por três dias em meio MS com 25 mg/L de AIB e depois transferido para meio isento de reguladores de crescimento com 1 g/L de carvão ativado.

A multiplicação do juazeiro (*Ziziphus mauritiana* Lamk.), árvore utilizada como forrageira nos desertos da Índia, além de servir para fazer cercas, ferramentas e lenha, foi observada por Mathur, Ramawat e Nandwani (1995) que inocularam segmentos nodais de árvore com 20 a 25 anos de idades em

meio modificado de MS sendo acrescentados 11 μ M de benziladenina e 0,5 μ M de ácido indolilacético. Por sucessivas subculturas, cerca de 15 a 20 brotos foram obtidos por inoculações. A indução de enraizamento constou de um pré-tratamento com 50 μ M de ácido indolilbutírico ou de ácido naftalenoacético por 24 horas e em seguida transferido para meio White (1943) livre de auxinas.

A arbórea medicinal *Eucommia ulmoides* Oliver é muito apreciada na China, por conter um potente antihipertensivo além de ter uma resina isolante elétrica denominada de gutta-percha. No entanto, somente a árvore feminina produz o óleo e a gutta-percha. Chen, Hu e Huang (1995) conseguiram multibrotações através de brotações apicais de plântulas de um mês de idade. As brotações com 3 a 5 mm de comprimento foram cultivadas em meio básico MS suplementado com 1 mg/L de benziladenina. Os brotos foram subcultivados no mesmo meio aumentando para um índice de 7 novos brotos por dois brotos cultivados. O enraizamento foi obtido utilizando-se gelrite, reduzindo-se em um terço a concentração dos sais do meio MS e adicionando-se 0,1 mg/L de ANA.

Prunus mume Sieb. et Zucc. é uma arbórea cultivada no Japão por sua produção de frutos. Os frutos são colhidos prematuros para preparo de pickles. Harada e Murai (1996) cultivaram segmentos nodais de aproximadamente 2 cm com uma gema lateral em meio básico WPM, suplementado com 5 μ M de benziladenina, 3% de sorbitol e 0,7% de ágar. Após 30 dias, os brotos foram separados e subcultivados no mesmo meio. O melhor enraizamento foi obtido em meio WPM com 1 μ M de ácido naftalenoacético.

Campos e Pais (1996) relataram a proliferação de brotos obtidos com a espécie *Persea indica* (L.) K. Spreng, arbórea cuja madeira é similar ao mogno. Madeira muito apreciada no fabrico de móveis, no entanto a árvore se encontra em vias de extinção. A multiplicação in vitro foi conseguida através do cultivo de gemas axilares provenientes de plântulas germinadas in vitro. As gemas foram inoculadas em meio MS suplementado com 2,8 μ M de benziladenina.

Para enraizamento, a base dos brotos foram imersos em 16,11 mM (3 g/L) de ácido indolilbutírico por 1 a 2 segundos e depois transferidos para meio de cultura MS com metade da concentração e sem reguladores de crescimento.

Para se obter multibrotações na arbórea *Cleistanthus collinus* Benth, Quraishi, Koche e Mishra (1996) cultivaram segmentos nodais, 1,5 cm de comprimento em MS com 2,2 μ M de benziladenina. A multibrotação ocorreu em 4 semanas. Observou-se que, reduzindo a concentração de BA para 1,1 μ M, a multiplicação dos brotos foi muito maior mas sendo necessárias 8 semanas. O enraizamento foi obtido com metade da concentração do meio MS acrescido de 22,8 μ M de ácido indolilacético e mantido no escuro nas primeiras 72 horas.

A multibrotação em *Gmelina arborea* Roxb., árvore produtora de madeira para fabrico de móveis na Ásia, foi solução para se obter a propagação desta espécie, já que possui sementes recalcitrantes. Kannan e Jasrai (1996) inocularam segmentos nodais de 1 a 1,5 cm de comprimento provenientes de árvores com 3 a 5 anos de idade, em meio de cultura MS com 1,1 μ M de BA, obteve-se 7 a 9 brotos por cada segmento nodal. O enraizamento foi estimulado por pulso em solução com 246 μ M de AIB por cinco minutos e transferidos para vermiculita.

A multiplicação da espécie *Cordia verbenaceae* L., arbusto perene, medicinal, com ação terapêutica anti-inflamatória e anti-infecciosa, conhecida popularmente como erva-baleeira foi obtida por Lameira (1997). Os experimentos foram conduzidos com segmentos nodais e apicais. O segmento apical foi o mais eficiente proporcionou um maior número e comprimentos de brotações. A concentração que induziu maior número de brotações foi de 5 μ M de cinetina mais 0,01 μ M de ANA em meio de cultura MS. O enraizamento foi em meio de cultura MS sem regulador de crescimento.

Parra e Amo-Marco (1998) fizeram interessante estudo comparativo de multibrotações provenientes de segmentos nodais de explantes juvenis, obtidos

de germinação de sementes *in vitro*, e explantes obtidos de árvores com mais de dez anos de idade da espécie *Myrtus communis* L. Ao contrário do que era esperado, os explantes provenientes da árvore foram mais eficientes produzindo mais brotos e de maior alongamento. O meio de cultura mais propício foi o meio MS suplementado de 4,4 μM de benzildadenina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência das sementes de Sucupira Branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.)

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras e do Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN – EMBRAPA).

Foram utilizadas sementes de populações do município de Brasilândia, Norte de Minas Gerais, coletadas em 13 de maio de 1995 e 18 de julho de 1996. Os frutos, após a remoção das alas, foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em câmara fria, temperatura variando de 6 a 9°C e umidade relativa de 70%, no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG). Foram utilizadas sementes de frutos coletados em Brasília, nas seguintes localidades e respectivas datas: Universidade de Brasília (UnB) em 25 de julho de 1997, quadra 403 Sul em maio de 1996 e 26 de julho de 1997. Os frutos coletados em Brasília foram armazenados em câmara fria, temperatura de 18°C a 20°C, na Área de Biologia Celular do CENARGEN / EMBRAPA. De acordo com a necessidade, as sementes foram isoladas dos frutos através de tesoura de poda antes da instalação dos experimentos, não havendo armazenamento da semente nua, por período superior a seis meses. Uma vez que se observou melhor conservação das sementes quando estavam no interior dos frutos.

3.2 Desinfestação das sementes

A desinfestação das sementes foi realizada em ambiente asséptico, na câmara de fluxo laminar horizontal.

As sementes foram imersas em álcool à 70% por um minuto. Depois em solução de hipoclorito de sódio à 2% por vinte minutos. Em seguida lavadas três vezes em água destilada autoclavada.

3.3 Testes experimentais para germinação

3.3.1 Teste de germinação ex vitro de sementes seccionadas e embriões

Neste experimento foram utilizadas sementes provenientes de Brasilândia-MG coletadas em 18 de julho de 1996, visando a comparação de dois métodos de superação de dormência. Após a desinfestação, um dos métodos utilizados constou de sementes seccionadas, ou seja, sementes que tiveram um pequeno corte no lado oposto ao eixo embrionário e o outro método de sementes sem tegumento, ou seja, o embrião. As sementes foram semeadas em caixas tipo gerbox contendo areia lavada e autoclavada a 121°C durante 60 minutos. Foram utilizadas 50 sementes para cada tratamento, divididas em dez repetições, sendo que cada repetição foi constituída por 5 tubos. As caixas foram mantidas em câmara de germinação à 30°C e fotoperíodo de 8 horas. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento de raízes, comprimentos da parte aérea, número de folhas e índice de germinação. Os dados foram transformados pela $\sqrt{X+1}$. A avaliação foi feita após 14 dias de semeio.

3.3.2 Teste de germinação in vitro de sementes seccionadas e embriões

Neste experimento foram utilizadas 60 sementes procedentes de Brasilândia-MG coletadas em 18 de julho de 1996 e metade foram submetidas ao seccionamento. Em seguida, foi feita a desinfestação das sementes como descrita anteriormente em câmara de fluxo laminar horizontal. Procedeu-se então a retirada dos tegumentos das sementes restantes (30), isolando-se assim os embriões (radícula + hipocótilo + plúmula + cotilédones).

Utilizou-se meio básico de MS diluído para metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementados com vitaminas de MS e 2% de sacarose, utilizando-se ponte de papel filtro como suporte. O meio de cultura foi ajustado a um pH de 5,8 e autoclavado à 121°C durante 20 minutos. Utilizou-se 13 ml de meio de cultura em cada tubo. O material foi cultivado em tubos de ensaio de 20 x 150 mm, sob condições de 14 horas de fotoperíodo e 28°C de temperatura. Para tampar foram utilizadas forminhas de papel alumínio da marca Rochedo, dimensão 24 x 16, da cor prata. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições sendo cada unidade experimental constituída por 5 tubos de ensaio contendo um propágulo por tubo. Os tratamentos foram constituídos pelas combinações de dois métodos de propágulos: sementes seccionadas e embriões, com quatro épocas de avaliação (7, 14, 21 e 35 dias). O experimento foi instalado com os tratamentos dispostos segundo o esquema de parcelas subdivididas, com os métodos nas parcelas e avaliações nas subparcelas.

3.3.3 Teste de germinação in vitro de sementes escarificadas e embriões

Neste experimento foram utilizadas 240 (duzentas e quarenta) sementes procedentes da UnB coletadas em 25 de julho de 1997. Metade das sementes foram escarificadas através de lixa da marca 3M 231 Q Wetordry Imperial paper

C 180. Em seguida foi feita a desinfestação das sementes em câmara de fluxo laminar. Procedeu-se então o isolamento dos embriões nas sementes restantes.

Foi utilizado meio básico de MS diluído para a metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementado com vitaminas de MS e 2% de sacarose. As sementes escarificadas e embriões foram inoculados nos seguintes tratamentos (2 x 5): ágar a 0,7% lavado com aproximadamente 1 litro de água deionizada; meio líquido usando suporte de papel filtro e meios com ágar a 0,7% suplementado de carvão ativado nas concentrações de 0,1%; 0,2% e 0,3%. Em cada tratamento foram utilizados 24 sementes. Os meios de cultura foram ajustados para pH de 5,8. Utilizou-se 13 mL de meio de cultura em cada tubo. O tubo de ensaio utilizado foi de 20 x 150 mm com tampas de forminhas de papel alumínio. O material foi autoclavado à 121°C por 20 minutos. Após inoculação o material foi cultivado sob condições de 14 horas de fotoperíodo e 28°C de temperatura. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos em esquema de parcela subdividida, ficando na parcela as combinações dos tipos de propágulos (sementes escarificadas e embriões) com os meio (ágar lavado, meio líquido, ágar com carvão a 0,1%; 0,2% e 0,3%) e na subparcela as semanas de avaliação (7 dias e 28 dias). Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 6 tubos de ensaio contendo um propágulo por tubo. Os dados foram transformados pela $\sqrt{x+1}$. A primeira avaliação foi feita aos 7 dias e a segunda avaliação aos 28 dias.

3.3.4 Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido e em diferentes condições de gelificantes

Neste experimento foram utilizadas sementes procedentes da UnB coletadas em 25 de julho de 1997. As sementes foram submetidas a desinfestação e em seguida ao isolamento dos embriões.

Utilizou-se meio básico de MS diluído para a metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementado com vitaminas de MS e 2% de sacarose. Os mesmos procedimentos anteriores foram utilizados quanto ao ajuste de pH, quantidade de meio, especificações do tubo e tampas, autoclavagem, condições de fotoperíodo e temperatura da câmara de crescimento. Os embriões foram inoculados nos seguintes tratamentos: ágar à 0,7% lavado com aproximadamente 1 litro de água deionizada; meio líquido com suporte de papel filtro; ágar à 0,7% e fitigel à 0,22%. Em cada tratamento foram utilizados 28 embriões, totalizando 112 embriões. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos no esquema parcela subdividida ficando na parcela os tratamentos (ágar lavado, meio líquido, ágar e fitigel) e na subparcela os dias de avaliações aos 5, 10 e 15 dias. Foram utilizadas 7 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 4 tubos de ensaio, contendo um propágulo por tubo.

3.3.5 Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido ou com ágar, em ambiente escuro ou de luz

Neste experimento foram utilizadas sementes procedentes de Brasília, da quadra 403 Sul coletadas em maio de 1996. As sementes foram submetidas a desinfestação e em seguida ao isolamento dos embriões.

Utilizou-se meio básico de MS diluído para a metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementado com vitaminas de MS e 2% de sacarose. Foram estudados os seguintes tratamentos: dois meios de inoculação (: ágar à 0,7% e meio líquido com suporte de papel de filtro, dois regimes de condicionamento (escuro e luz) e duas épocas de avaliação (aos 7 e 21 dias). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos disposto em esquema de parcela subdividida. Na parcela ficaram os

tratamentos (luz e escuro) e tipo de suporte (ágar e líquido) e na subparcela os dias de avaliação (7 e 21 dias). Em cada tratamento foram utilizados 20 embriões, totalizando 80 embriões. Foram utilizadas 5 repetições por cada tratamento, sendo cada unidade experimental constituída por 4 tubos de ensaio, contendo um propágulo por tubo. Os dados foram transformados pela $\sqrt{X+1}$. Os tratamentos foram para câmara de crescimento sob condições de 16 horas de fotoperíodo e de 25 a 28°C de temperatura, e a outra metade do tratamento foi para câmara escura. Foram feitas duas avaliações aos 7 e 21 dias.

3.3.6 Avaliação do crescimento de eixos embrionários em meio líquido e em meios sob diferentes condições de gelificantes

Neste experimento foram utilizadas sementes procedentes da UnB coletadas em 25 de julho de 1997. As sementes foram submetidas a desinfestação e em seguida ao isolamento dos eixos embrionários (Radicula + hipocótilo + gêmula), (Figura 4).

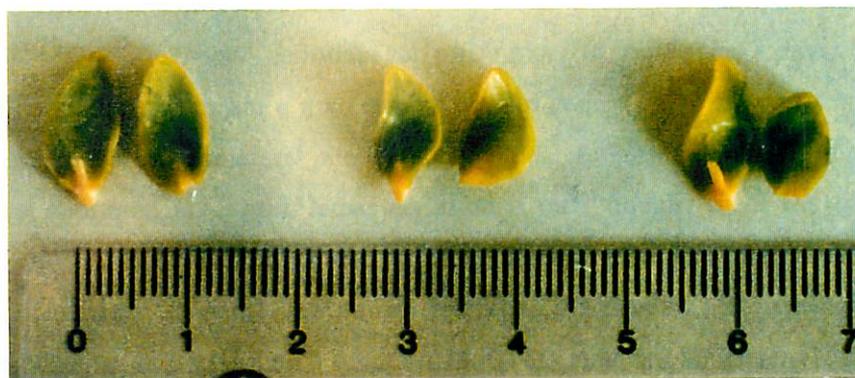


FIGURA 4. Embriões de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (sucupira branca) mostrando em evidência os eixos embrionários.

Utilizou-se meio básico de MS diluído para metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementado com vitaminas de MS e 2% de sacarose. Os

eixos embrionários foram inoculados nos seguintes tratamentos: ágar à 0,7% lavado com aproximadamente 1 litro de água deionizada; meio líquido com suporte de papel filtro; ágar à 0,7% e fitigel à 0,22%. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos no esquema de parcela subdividida, ficando na parcela os tratamentos acima mencionados e na subparcela épocas de avaliação (7 e 14 dias). Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 6 tubos de ensaio contendo um propágulo por tubo. Assim, em cada tratamento foram utilizados 24 eixos embrionários, totalizando 96 eixos embrionários. Os dados foram transformados pela $\sqrt{X + 1}$. Foram feitas 2 avaliações aos 7 e 14 dias.

3.3.7 Avaliação do crescimento de embriões em tubos de ensaio fechados com tampas plásticas ou com forminhas de papel alumínio tipo brigadeiro

Neste experimento foram utilizadas sementes procedentes de Brasilândia coletadas em 13 de maio de 1995. As sementes foram submetidas a desinfestação e em seguida ao isolamento dos embriões.

Utilizou-se meio básico de MS diluído para a metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementado com vitaminas de MS e 2% de sacarose em meio líquido com suporte de papel filtro. Os embriões foram inoculados e tampados com tampa plástica ou com forminhas de papel alumínio, tipo brigadeiro. Os tratamentos avaliados foram: dois tipos de tampas: tampas plásticas e tampas de forminha de papel alumínio e quatro épocas de avaliação: aos 7, 14 e 21 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os tratamento dispostos no esquema de parcelas subdivididas. Nas parcelas foram avaliadas os tipos de tampas e nas subparcelas as épocas de avaliação. Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada unidade experimental por 6

tubos de ensaios. Foram feitas 4 avaliações, os dados foram transformados pela equação $\sqrt{x+1}$.

3.4 Estabelecimento in vitro de segmentos nodais de sucupira branca

Os segmentos nodais foram utilizados como explante primário e derivados de plântulas germinadas in vitro com 5 a 8 nós, aproximadamente após 3 meses de cultivo. O cultivo dos embriões ocorreu em meio básico de MS (Murashige e Skoog, 1962) diluído para metade da força dos sais de macro e micronutrientes, suplementado com vitaminas de MS e 2% de sacarose, em meio líquido com suporte de papel filtro.

Os meios de cultura foram ajustados a um pH de 5,8 e autoclavados à 121°C durante 20 minutos sob pressão 1,5 atm. O tubo de ensaio utilizado foi de 20 x 150 mm, com tampa de forminha de papel alumínio, tipo brigadeiro.

Os segmentos nodais foram obtidos através da secção das hastes caulinares em segmentos contendo pelo menos uma gema, e tamanho aproximado de 15 a 20 mm. As folhas, a gema apical e cotiledonares foram eliminadas. Os explantes foram inoculados no meio de cultura na proporção de um segmento por tubo. Após a inoculação o material foi cultivado sob condições de 14 horas de fotoperíodo, com luz branca fria produzida por lâmpadas fluorescentes e intensidade luminosa de 0,005 ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e temperatura de 28°C. Os seguintes parâmetros foram avaliados: altura da haste, número de hastes, número de gemas, comprimento da raiz.

3.4.1 Efeito do meio de cultura sobre estabelecimento in vitro de segmento nodal de sucupira branca

Neste experimento foram utilizados explantes derivados de plântulas germinadas in vitro, de sementes procedentes da UnB coletadas em 25 de julho

de 1997. O explante tinha idade de 3 meses e 13 dias. Os segmentos nodais mediam aproximadamente 20 mm. Foram cultivados em meio de cultura básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962) e meio de cultura básico de WPM (Lloyd e McCown, 1981) com 0,7% de ágar. Os tratamentos avaliados foram os meios de cultura básicos (MS e WPM) e três épocas de avaliações com 30, 60 e 90 dias. Utilizou-se 13 mL de meio de cultura por tubo de ensaio. Foram feitas três avaliações com 30, 60 e 90 dias. Os parâmetros avaliados foram: altura da haste, número de hastes, número de gemas e comprimento de raiz. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos no esquema de parcela subdividida. Na parcela ficaram os tipos de meios (MS e WPM) e na subparcela as épocas de avaliação (30, 60 e 90 dias). Foram utilizadas 6 repetições em cada tratamento, sendo cada unidade experimental constituída de 6 tubos de ensaio, contendo um segmento nodal por tubo. Os dados foram transformados pela equação $\sqrt{x+1}$.

3.4.2 Estabelecimento de segmentos nodais de sucupira branca com metade da concentração dos sais do MS suplementado com água de côco

Neste experimento foram utilizados explantes derivados de plântulas germinadas in vitro, de sementes procedentes de Brasilândia, coletadas em 18 de julho de 1996. O explante tinha a idade de 3 meses e 16 dias. Os segmentos nodais mediam aproximadamente 20 mm e foram cultivados em meio de cultura básico de MS, diluído a metade da força dos sais de macro e micronutrientes com vitaminas de MS e 2% de sacarose, em meio líquido com suporte de papel filtro. Para composição dos tratamentos, o meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de água de côco (0,0; 5,0; 10,0 e 20%). Utilizou-se 13 mL de meio de cultura por tubo de ensaio. Foram feitas três avaliações com 30, 60 e 90 dias. Os parâmetros avaliados foram: altura da haste, número de hastes,

número de gemas e comprimento de raiz. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos disposto no esquema de parcela subdividida. Nas parcelas foram avaliados as diferentes concentrações de água de côco (0,0; 5,0; 10,0 e 20,0%) e nas subparcela as épocas de avaliação (30, 60 e 90 dias). Foram utilizadas 7 repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental constituídas por 4 tubos de ensaio, contendo um propágulo por tubo.

3.4.3 Indução de multibrotações em meio sólido

Neste experimento foram utilizados explantes derivados de plântulas germinadas *in vitro*, de sementes procedentes de Brasilândia-MG, coletadas em 18 de julho de 1996. O explante tinha a idade de 4 meses e 11 dias. Os segmentos nodais mediam aproximadamente 20 mm, e foram inoculados em posição horizontal no meio de cultura. Foi utilizado o meio de cultura básico de MS, diluído para a metade dos sais dos macro e micronutrientes com vitaminas de MS e 2% de sacarose com 0,7% de ágar. O meio de cultura foi suplementado em diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM) combinadas com diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 3,0 e 5,0 μM). Utilizou-se 30 mL de meio de cultura em cada recipiente magenta. Inocularam-se 5 segmentos nodais em cada magenta. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamento: 4 combinações de BAP com 4 de ANA totalizando 16 tratamentos, dispostos segundo esquema fatorial. Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada parcela constituída 5 segmentos nodais. A avaliação do experimento foi realizada após 17 dias de inoculação. Os parâmetros avaliados foram: número de aglomerados (multibrotação), número de brotos por aglomerado e porcentagem de calos. Os dados foram transformados pela $\sqrt{x + 0,5}$. O porcentual de calos foi avaliado conforme área

do segmento nodal coberto com calos, foi atribuído (*) para até 25% da área coberta por calo, (**) de 25 a 50% do segmento nodal coberto por calo, (***) de 50 a 75% e (****) de 75 a 100% do segmento nodal coberto por calo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimentos de Germinação

4.1.1 Teste de Germinação “ex vitro” de sementes seccionadas e embriões

A germinação em areia lavada, através de germinadores e condições controladas, proporciona uma melhor visualização no estudo da emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais das plântulas.

O estudo comparativo dos dois métodos de superação de dormência apresentado neste teste teve o objetivo de avaliar qual o que apresentava maior homogeneidade, velocidade, índice de germinação e qualidade das estruturas das plântulas.

As sementes seccionadas e os embriões de sucupira branca não apresentaram diferenças significativas quanto aos parâmetros comprimento da parte aérea e número de folhas. No entanto, para os parâmetros comprimento da raiz e índice de germinação apresentaram diferenças significativas a 1% pelo teste F, como mostram os resultados da análise de variância (Tabela 1).

Pelo teste de germinação, observou-se que as sementes seccionadas de sucupira branca foram superiores aos embriões em relação ao comprimento da raiz e ao índice de germinação, como apresentada na Tabela 2.

A retirada de pequeno fragmento das sementes (seccionamento) possibilita a embebição da semente favorecendo uma rápida germinação. A velocidade de germinação observada nas sementes de sucupira branca também

foi observadas em várias espécies arbóreas leguminosas, submetidas ao mesmo processo.

TABELA 1. Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para CR (comprimento de raízes), PA (comprimento da parte aérea), número de folhas, e índice de germinação quando sementes seccionadas e embriões foram cultivados em areia lavada sob condições de germinador e avaliados aos 14 dias de cultivo. Dados transformados $\sqrt{X+1}$.

C. variação	G.L.	C.R. (cm)	P.A (cm)	N-Folhas	Ind. Germ.
Propágulos	1	1,3999**	0,2474 ^{NS}	0,4289 ^{NS}	0,1495**
Resíduo	18	0,0941	0,0727	0,1082	0,0212
c.v. (%)		18,14	19,31	24,64	11,08
Média		1,69	1,40	1,33	1,31

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

NS: não significativo pelo teste F

Barradas e Handro (1974) relataram que o mesmo ocorreu com as sementes de barbatimão (*Stryphnodendron barbadetimam* (Vell.) Mart.) quando comparadas com a germinação de sementes intactas, em experimento estabelecido em placas de Petri sob condições de germinador. O mesmo foi observado por Ferreira (1976) em seu experimento com maricá (*Mimosa bimucronata* (D.C) O.K.), em que o seccionamento da semente possibilitou cerca de 100% de germinação em menos de 48 horas. O seccionamento do tegumento promoveu rapidez de germinação nas leguminosas *Acacia bonariensis* Gill e *Mimosa bimucronata* (D.C) O.K. conforme Ferreira, João e Heuser (1992); também em *Acacia senegal* (L.)Willd por Danthu et al., (1992); com *Cassia sieberiana* D.C por Todd-Bockarie et al.,(1993), com *Senna macranthera* (Colladon) Irwin e Barneby por Santarém e Aquila (1995), com urucum *Bixa orellana* por Amaral, Pereira e Cortelazzo (1995). No entanto, Áquila e Fett Neto (1988) observaram que em *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit o seccionamento proporcionou alta porcentagem de germinação, mas as

plântulas cresceram menos do que as plântulas provenientes de sementes submetidas a outros métodos de quebra de dormência. Gosling, Samuel e Jones (1995) relataram que sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit submetidas ao seccionamento e sob 40°C de germinação apresentaram alto índice de mortalidade.

TABELA 2. Valores médios para os parâmetros crescimento de raiz (C.R.), comprimento da parte aérea (P.A), número de folhas e índice de germinação, em função dos tipos de propágulos de sucupira branca, cultivados "ex vitro".

Propágulos	C.R. (cm)	P.A (cm)	N-folhas	Ind. Germ.
Seccionada	1,96a	1,51a	1,48a	91a
Embrião	1,43b	1,28a	1,18a	55b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

Reis, Brune e Rena (1985), em estudo comparativo com sementes intactas de sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth) e utilizando várias formas de superação de dormência observaram que o corte no tegumento apresentou porcentagem de germinação e energia germinativa pelo menos cinco vezes superior ao controle.

Neste experimento, onde comparou-se a germinação de sementes seccionadas e desenvolvimento de embriões de sucupira branca, observou-se que as sementes seccionadas apresentaram 91% de germinação e os embriões apenas 55%. Os embriões de sucupira branca sofreram um severo ataque de fungos. O que também havia ocorrido com Melo, Ribeiro e Lima (1979) em teste de germinação com sementes intactas de sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth), em substrato de papel sob temperatura de 25°C em condições de câmara de germinação. Pois as sementes que tinham sido lavadas cinco vezes em solução aquosas de hipoclorito de sódio a 0,2%, obtiveram uma taxa de

germinação de 66%.

A contaminação por fungos no desenvolvimento de embriões de sucupira branca, em areia lavada, sob condições de germinador, provavelmente deve ter sido facilitada pela ausência do tegumento que desta forma agiria como capa protetora. Por outro lado, é difícil controlar a quantidade de água nas caixas gerbox, já que não ocorre drenagem no caso de excesso de água. A própria constituição química das sementes de sucupira branca, leguminosa, portanto rica em proteínas, deve ter favorecido a proliferação de fungos.

Para as espécies tropicais, segundo Mascarenhas et al., (1987) e Le Roux, citado por Harry e Thorpe (1994), as sementes que são utilizadas para explante, devem ser desinfestadas antes da remoção dos embriões ou no caso de germinação asséptica. O procedimento da desinfestação deve ser rigoroso por causa do alto grau de contaminação natural. Geralmente, segundo eles, utiliza-se a combinação $HgCl_2$, $NaOCl$ e etanol.

4.1.2 Teste de germinação “in vitro” de sementes seccionadas e embriões

O teste de germinação de sementes seccionadas e embriões de sucupira branca, em meio líquido “in vitro” teve como objetivo comparar a eficiência da germinação, quanto a velocidade e homogeneidade, visando obtenção de plântulas como fonte de explantes para experimentos “in vitro”.

Pelos resultados das análises de variância (Tabela 3), verificaram-se diferenças significativas entre os tratamentos, ou seja, germinação de sementes seccionadas e desenvolvimento de embriões de sucupira branca. Os embriões apresentaram-se superiores em todos os parâmetros avaliados, como mostra a Tabela 4.

TABELA 3. Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para CR (comprimento de raízes) PA (comprimento da parte aérea), número de folhas e Índice de germinação quando sementes e embriões de sucupira branca foram cultivados "in vitro". Dados não transformados.

F.variação	G.L.	C.R.	P.A.	N-folhas	Índ. germ.
Propágulos	1	32,875**	15,620**	9,720**	0,263**
Resíduo 1	10	2,318	0,539	0,838	0,032
Avaliações	3	117,271**	34,107**	51,940**	0,263**
Prop. X aval.	3	2,026**	0,895**	1,376**	0,158**
Resíduo 2	30	0,441	0,139	0,221	0,014
c.v.(1) (%)		32,95	30,85	37,36	20,42
c.v.(2) (%)		14,38	15,61	19,19	13,53
Média		4,62	2,38	2,45	0,876

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 4: Valores médios de comprimento de raiz (CR), comprimento da parte aérea (PA), número de folhas e índice de germinação em propágulos de sucupira branca, cultivados "in vitro".

Propágulos	C.R.(cm)	P.A.(cm)	N. Folhas	Índ. Germ.
Embrião	5,448a	2,955a	2,90a	0,95a
Seccionada	3,792b	1,814b	2,00b	0,80b

médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de F, a 1% de probabilidade.

Os embriões tiveram maior velocidade de crescimento radicular do que as sementes seccionadas (Figura 5). Observou-se um acréscimo médio no comprimento da raiz de 0,24 cm para o embrião e de 0,27 cm para sementes seccionadas para cada dia de avaliação, valores estes bastante semelhantes, mostrando que o desenvolvimetro dos embriões foram sempre superiores aos das sementes seccionadas, já na etapa inicial de avaliação. Neste caso, provavelmente o tegumento ainda agiu como uma barreira impedindo rapidez no processo de embebição da semente, em relação ao embrião, que tinha maior área de superfície de absorção em contato com o meio líquido, enquanto que as sementes seccionadas atingiram a máxima germinação somente ao 26 dias (Figura 6). Rapidez de germinação através da retirada do tegumento foi relatado

por Radhamani, Malik e Chandel (1991) com várias espécies de Citrus: *Citrus aurantifolia*, *C. limonia*, *C. limon*, *C. reticulata*, *C. aurantium*, *C. maxima*, *C. maderaspatana* e *P. trifoliata*, onde as sementes com tegumento precisaram de 32, 30, 32, 31, 70, 85, 80 e 32 dias para germinar, sem o tegumento reduziram para 25, 20, 27, 26, 35, 36, 35 e 28 dias respectivamente.

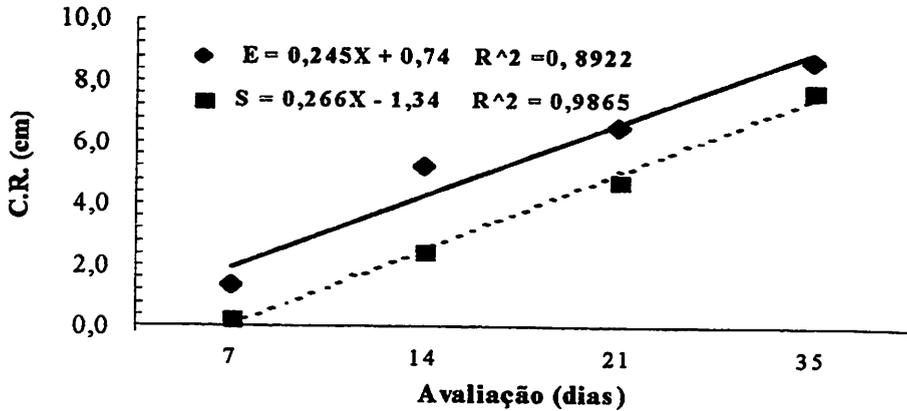


FIGURA 5. Representação e equação de regressão para comprimento de raízes em função dos épocas de avaliação (X: 7, 14, 21 e 35 dias), para em dois diferentes tipos de propágulos: embriões (E) e Sementes seccionadas (S) cultivados “in vitro”.

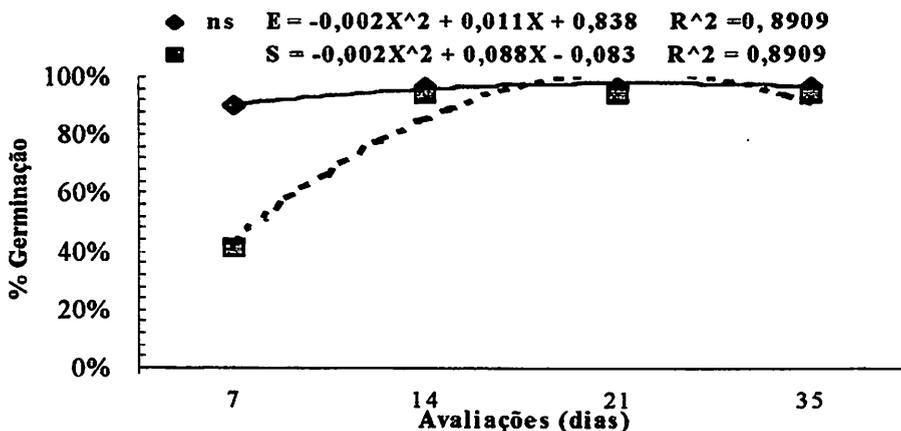


FIGURA 6: Representação e equação de regressão para índice de germinação em função dos épocas de avaliação (X: 7, 14, 21 e 35 dias), para em dois diferentes tipos de propágulos: embriões (E) e Sementes seccionadas (S) cultivados “in vitro”.

O cultivo de embriões também foi a maneira de obtenção de plantas das espécies *Fraxinus ornus* (freixo) e *Sorbus domestica*, sementes intactas de *Fraxinus* germinaram apenas 7% e não houve germinação de sementes intactas de *Sorbus domestica* conforme Arrillaga, Marzo e Segura (1992).

Nas sementes seccionadas de sucupira branca, observou-se leve coloração amarronzada exsudando no local do corte das sementes, provavelmente ocorreu oxidação dos fenóis, o que também foi observado por Ashburner, Thompson e Burch (1993) no cultivo de embriões de coco (*Cocos nucifera* L.) “in vitro” sendo necessário a suplementação de carvão ativado a 0,2% no meio de cultura. Na sucupira branca a oxidação fenólica foi atenuada pelo uso do meio líquido.

Cantos et al., (1998) observaram que a baixa germinação de pinheiros (*Juniperus oxycedrus* e *Juniperus macrocarpa*) estava relacionada com a presença de inibidores no endosperma e com o impedimento mecânico da testa. Obtenção de plantas foram conseguidas quando inocularam embriões “in vitro”.

As sementes seccionadas de sucupira branca apresentaram germinação heterogênea, diferentemente dos embriões que apresentaram desenvolvimento bem homogêneo. Os embriões de sucupira branca logo aos 7 dias de cultivo atingiram cerca de 90% de germinação, como mostra a Figura 6. Para as sementes seccionadas o percentual de germinação máxima ocorreu aos 26 dias de avaliação, enquanto para embriões não houve uma clara tendência desse comportamento. Também foram observados para parte aérea e N° de folhas maior comprimento da parte aérea e maior número de folhas, em menor tempo (Figura 7 e Figura 8). Nota-se que houve um acréscimo médio no comprimento da parte aérea de 0,14 cm para embriões e de 0,13 cm para sementes seccionadas para cada dia de avaliação; para o número de folhas, espera-se um acréscimo médio de 0,18 e 0,16 folhas para embriões e sementes seccionadas, respectivamente, em função do aumento de um dia na avaliação (Figura 8).

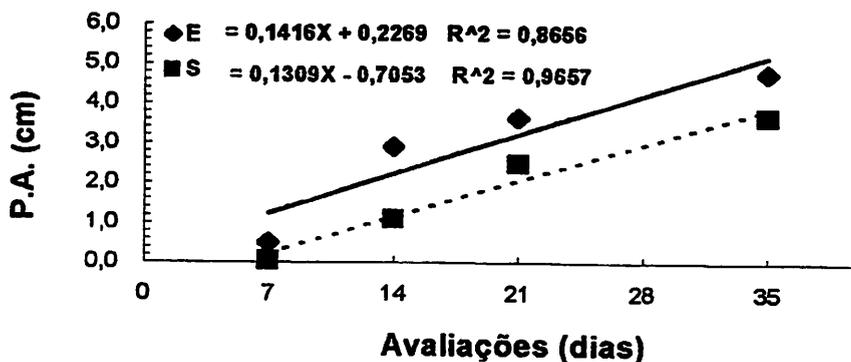


FIGURA 7. Comprimento da parte aérea (P.A.) em função das avaliações (A: 7, 14, 21 e 35 dias) a partir do cultivo de diferentes tipos de propágulos. (E: embriões; S: sementes).

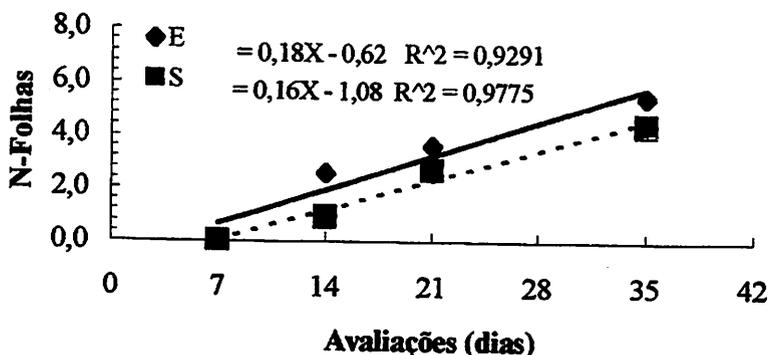


FIGURA 8. Número de folhas (N.F.) em função das avaliações (A: 7, 14, 21 e 35 dias) a partir do cultivo de diferentes tipos de propágulos. (E: embriões; S: sementes).

Observou-se um comportamento diferente na germinação “in vitro” em relação a germinação “ex vitro” do experimento anterior. Na germinação “ex vitro” de sucupira branca, melhor germinação ocorreu com sementes seccionadas, já na germinação “in vitro” o melhor desempenho germinativo foram dos embriões.

O cultivo “in vitro” de embriões de sucupira branca neste experimento obtiveram alto índice de germinação e maior velocidade devido a ausência de tegumento, o embrião ao ser inoculado rapidamente iniciou o metabolismo da germinação através da embebição. Outro fator que contribuiu foi o meio básico, rico em nutrientes e em estado líquido. O estágio de maturação das sementes, com os cotilédones cheios de reservas. Inclusive este é um fator interessante visto que o cultivo de embriões é muitas vezes empregado com embriões imaturos, geralmente sendo necessário o emprego de reguladores de crescimento, como no caso da obtenção de híbridos de *Vicia narbonensis* x *Vicia faba* (fava) por Lazaridou, Roupakias e Economou (1993). Alta porcentagem de

germinação de embriões imaturos de damasco (*Prunus armeniaca* L.) foi conseguido também por Burgos e Ledbetter (1993), obtendo-se mais de 80% de germinação com embriões medindo de 5 a 9mm de comprimento. Emershad e Ramming (1994) relataram altas percentagens de germinação de embriões de nectarina (*Prunus persica* (L.) Batsch var. *nucipersica* Schneid) e pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch) cultivadas em meio básico WPM atingiram 98% e 100% de germinação respectivamente onde 100% desenvolveram-se em plantas, e ameixa (*Prunus salicina* Lindl) cultivada em meio C2d obteve, 98% de germinação com 100% dos embriões sendo convertidos em plantas. Thiagarajan e Murali (1994) com cultivo de embriões imaturos de neem (*Azadirachta indica* (A. Juss)), obtiveram mais de 89% de germinação de embriões a partir de 3 mm de comprimento.



FIGURA 9: Germinação “in vitro” de sementes seccionadas (A) e embriões (B) de sucupira branca em meio líquido, com 20 dias de inoculação.

4.1.3 Teste de germinação in vitro de sementes escarificadas e embriões

O teste de germinação de sementes escarificadas e embriões de sucupira branca “in vitro” possibilitou um estudo mais detalhado do comportamento destes propágulos em diferentes meios. A germinação in vitro tem como objetivo a produção de explantes juvenis e assépticos para o estabelecimento de experimentos in vitro. O ideal neste caso é a produção de plântulas vigorosas e bem homogêneas.

O resultado das análises de variância, (Tabela 5), mostram diferenças significativas quanto ao propágulos e meios ($P < 0,01$) para todos os parâmetros: CR, PA, número de folhas e índice de germinação. As avaliações que foram feitas afetaram significativamente ($P < 0,01$) no C.R., P.A. e número de folhas formadas não afetando na germinação. Quanto às interações, observamos: entre tipos de propágulos x meio não afetaram nenhum parâmetro avaliado; tipo de propágulos x avaliação com diferenças significativas para comprimento de raiz, altura da parte aérea e número de folhas, entre meios x avaliações afetaram todos parâmetros menos a germinação. A interação tripla somente foi significativa ($P < 0,05$) para índice de germinação.

TABELA 5. Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para CR (comprimento de raiz) PA (comprimento da parte aérea), número de folhas e índice de germinação, quando sementes escarificadas e embriões de sucupira branca foram cultivados in vitro. Dados transformados.

C.variação	G.L.	C.R. (cm)	P.A (cm)	N ^o Folhas	Germinação
Propágulos	1	4,164**	1,596**	1,184**	0,738**
Meios	4	0,711**	0,391**	0,169**	0,086**
Prop. x Meios	4	0,081 ^{NS}	0,045 ^{NS}	0,023 ^{NS}	0,009 ^{NS}
Resíduo 1	30	0,082	0,051	0,029	0,013 ^{NS}
Avaliação	1	12,183**	5,235**	4,982**	0,404 ^{NS}
Prop. x aval.	1	2,339**	1,353**	1,184**	0,3*10 ⁻⁴ ^{NS}
Meios x aval.	4	0,529**	0,339**	0,169**	0,033 ^{NS}
Prop x Meios x Aval.	4	0,068 ^{NS}	0,031 ^{NS}	0,023 ^{NS}	0,037*
Resíduo 2	30	0,067	0,049	0,029	0,013
c.v.(1) (%)		19,81	17,76	13,70	9,72
c.v.(2) (%)		17,88	17,45	13,70	9,60
Média		1,45	1,27	1,25	1,17

^{NS}, *, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Os embriões tiveram melhores resultados em relação ao comprimento da raiz, parte aérea, número de folhas e índice de germinação, quando comparados com as sementes escarificadas (Tabela 6). Geralmente, as sementes escarificadas apresentam altos índices de germinação e desenvolvimento quando comparadas com outros métodos de superação de dormência, comumente realizados em laboratórios de qualidade de sementes. Diferentemente do que foi obtido com a germinação de sucupira branca, Rodrigues, Aguiar e Sader (1990) observaram a eficiência da escarificação com lixa na porção distal do eixo embrionário em 3 espécies de *Cassia*, teste de germinação conduzido em substrato de areia esterilizada.

TABELA 6. Valores médios de comprimento de raiz (CR), comprimento da parte aérea (PA), número de folhas e índice de germinação em função de diferentes tipos de propágulos cultivados “in vitro”.

Propágulos	C.R. (cm)	P.A.(cm)	Nº Folhas	Índ. Germ.
Embriões	1,68a	1,41a	1,37a	1,26a
Escarificada	1,22b	1,13b	1,13b	1,07b

Médias seguidas por mesma letra, na colunas, não diferem entre si, na linha, pelo Teste F a 1% de probabilidade.

Porcentagem de 100% de germinação foi obtido por González-Melero, Pérez-García e Martínez-Laborde (1997) com sementes da leguminosa *Coronilla valentina* spp. *glauca*, *C. juncea* com 92% de germinação e *C. minima* com 98%, quando as sementes foram submetidas à escarificação, em teste de germinação conduzido em placas de Petri. Lemos Filho et al., (1997) observaram que a escarificação promoveu mais de 80% de germinação nas sementes das leguminosas arbóreas *Senna macranthera* (Collad.) Irwin e Barneby (fedegoso), *Senna multijuga* (Rich.) Irwin e Barneby (farinha-seca) e *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (barbatimão-da-mata), em testes conduzidos com papel filtro em caixas tipo gerbox.

O cultivo “in vitro” de sementes de sucupira branca, escarificadas através de lixa, não apresentaram boa germinação. O tegumento remanescente muito provavelmente ainda agiu como barreira à germinação. Observou-se grande desuniformidade na germinação deste propágulo, além de apresentar uma forte coloração amarronzada ao redor da semente nos meios com ágar e manchar o papel filtro no meio líquido, muito provavelmente pela liberação de fenóis. Esse fenômeno da oxidação também foi relatado por Siqueira e Inoue (1991) com cultivo de tecidos do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), segundo eles, o processo de oxidação se deve principalmente à intoxicação dos tecidos por fenóis liberados por tecidos recém-feridos, testou-se o meio líquido, ao contrário

de sua localização fixa, próxima aos explantes, no meio sólido.

O efeito significativo entre a interação meios de cultura e épocas de avaliação, em sucupira branca, são mostrados na Tabela 7 e Tabela 8.

TABELA 7. Valores médios da interação dos fatores meios de cultura e épocas de avaliação para os parâmetros comprimento de raiz (C.R.) e parte aérea (P.A).

Meios	C.R. (cm)		P.A. (cm)	
	1ª avaliação	2ª avaliação	1ª avaliação	2ª avaliação
Agar lavado	1,030 a	1,490 c	1,000 a	1,240 b
Meio líquido	1,110 a	2,480 a	1,030 a	1,940 a
Agar + car. 0,1%	1,060 a	1,710 bc	1,010 a	1,370 b
Agar + car. 0,2%	1,050 a	1,600 bc	1,000 a	1,330 b
Agar + car. 0,3%	1,050 a	1,920 b	1,020 a	1,740 a

Médias seguidas por mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$)

TABELA 8. Valores médios da interação dos fatores meios de cultura e épocas de avaliação para os parâmetros número de folhas e índice de germinação.

Meios	Número de Folhas		Índice de germinação	
	1ª avaliação	2ª avaliação	1ª avaliação	2ª avaliação
Agar lavado	1,000 a	1,310 b	1,000 a	1,100 c
Meio líquido	1,000 a	1,840 a	1,000 a	1,280 b
Agar + car. 0,1%	1,000 a	1,390 b	1,000 a	1,510 a
Agar + car. 0,2%	1,000 a	1,430 b	1,000 a	1,110 c
Agar + car. 0,3%	1,000 a	1,520 b	1,000 a	1,210 bc

Médias seguidas por mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

De maneira geral não houve diferença na primeira avaliação em relação aos cinco diferentes tipos de meio. No entanto na segunda avaliação, percebe-se a superioridade do meio líquido em relação aos outros meios. Em seguida os meios suplementados com carvão ativado, principalmente na concentração a 0,3% apresentou-se como o melhor no cultivo de propágulos de sucupira branca. e por último o ágar lavado.

A Tabelas 9 e 10 representa os valores médios dos parâmetros avaliados em relação aos diferentes tipos de meios, onde observa-se as maiores médias para os propágulos cultivados em meio líquido, em seguida, o meio suplementado com carvão ativado a 0,3%, sendo o meio com ágar lavado o que proporcionou um menor desenvolvimento nos propágulos inoculados.

TABELA 9 Valores médios de comprimento de raiz (CR), comprimento da parte aérea (PA), número de folhas e índice de germinação em função dos meios de cultura.

Meios	C.R. (cm)	P.A. (cm)	Número de folhas	Índice de germinação
Agar lavado	1,22 b	1,12 c	1,15 b	1,09 b
Meio líquido	1,79 a	1,48 a	1,42 a	1,27 a
Agar + car. 0,1%	1,38 b	1,69 bc	1,19 b	1,15 b
Agar + car. 0,2%	1,32 b	1,16 bc	1,22 b	1,11 b
Agar + car. 0,3%	1,48 b	1,38 ab	1,26 b	1,20 b

Médias seguidas por mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

TABELA 10: Valores médios do Índice de germinação em função dos tipos de propágulos, meios de cultura em cada época de avaliação. Dados transformados.

Propágulos	Avaliação (dias)	Meios				
		Agar Lavado	Meio. Líquido	Agar + Car. 0.1%	Agar+ Car.02%	Agar+ Car.03%
Escarificada	7	1,00 a A	1,00 b A	1,00bA	1,00 b A	1,00 bA
Embrião	7	1,07 a B	1,37 a A	1,20a AB	1,19a AB	1,13 a B
Escarificada	28	1,08 a B	1,34 a A	1,10bB	1,04bB	1,17bAB
Embrião	28	1,24 a B	1,39aAB	1,30a AB	1,22aB	1,52 a A

Médias seguidas por mesma letras minúsculas na coluna para cada época de avaliação, e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

A presença de carvão ativado, principalmente em altas concentrações no cultivo in vitro de sucupira branca, causou um engrossamento na raiz e um

maior crescimento desta. Observou-se também uma coloração de verde mais intenso nos folíolos. Segundo Pasqual e Pinto, citados por Pasqual, Ribeiro e Ramos (1990) o carvão ativado é utilizado pelo poder de absorver substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, como também pode promover o crescimento de embriões.

O carvão ativado pode interferir com os compostos polifenólicos produzidos pelos explantes, modificando o índice entre polifenóis conjugados e polifenóis livres influenciando o potencial organogênico do desenvolvimento das gemas e das raízes, Druart et al., citado por Dumas e Monteuis (1995). Conforme Druart e Wulf (1993) o carvão ativado também absorve 5-hydroxymethylfurfural produzido pela autoclavagem da sacarose, impurezas do ágar, etileno produzido pela cultura, como também absorve componentes do meio de cultura como as vitaminas, citocininas, auxinas e ácido ascórbico.

Os propágulos de sucupira branca tiveram pior desempenho em meio de ágar lavado. Nas sementes escarificadas, a forte oxidação localizada ao redor das sementes devem ter dificultado a germinação. A lavagem do ágar teve como objetivo reduzir a provável presença de resíduos tóxicos e reduzir as concentrações de elementos químicos muitas vezes em excesso nos ágar purificados conforme Hadrami et al., (1993).

4.1.4 Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido e em diferentes condições de gelificantes

O crescimento e desenvolvimento de embriões de sucupira branca “in vitro”, em diferentes tipos de suporte, apresentou o meio líquido como o mais eficiente entre os tipos experimentados.

Pelos resultados das análises de variância verificaram-se diferenças significativas entre os tipos de suportes, avaliações e respectiva interação para

CR, P.A. e número de folhas, e o índice de germinação somente foi significativa para avaliações, mostrando os efeitos dos tratamentos no desenvolvimento das plântulas (Tabela 11).

O crescimento da raiz foi maior no meio líquido, como mostra a (Figura 10) houve um crescimento linear ao longo do tempo. No meio líquido já aos 5 dias de cultivo, os embriões de sucupira branca apresentavam uma média de 1,14cm de comprimento radicular em relação a 0,48cm de raiz apresentado pelos embriões cultivados em ágar.

TABELA 11. Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para comprimento de raiz (C.R.), comprimento da parte aérea (P.A), número de folhas e índice de germinação, quando embriões foram cultivados em diferentes meios e submetidos a três avaliações. Dados não transformados.

Causas variação	G.L.	C.R. (cm)	P.A (cm)	N-folhas	Germinação
Tratamento	3	17,418**	4,541**	2,124**	0,232 ^{NS}
Erro 1	24	1,395	0,176	0,092	0,093
Avaliações	2	23,731**	5,965**	8,103**	0,228**
Trat. x aval.	6	2,229**	1,471**	1,363**	0,036 ^{NS}
Erro 2	48	0,182	0,070	0,095	0,020
c.v.(1) (%)		81,04	74,53	85,42	40,60
c.v.(2)(%)		29,26	47,02	87,14	18,89
Média		1,46	0,563	0,35	0,75

^{NS}, *, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Os resultados de sucupira branca cultivados em fitigel, ágar lavado e em ágar aos 5 dias de cultivo tiveram um comprimento radicular bem aproximado, 0,34cm, 0,35cm e 0,48cm respectivamente. No entanto os embriões de sucupira branca cultivados, aos 15 dias atingiram em meio líquido uma média de 4,43cm de comprimento, ao passo que ágar atingiu apenas 2,16cm, fitigel 1,42cm e ágar lavado 1,34cm de comprimento de raiz.

A altura da parte aérea dos embriões de sucupira branca cultivados “in vitro” também mostraram a superioridade do meio líquido, como apresentam as Figuras 11 e 12. Os resultados em meio líquido, aos 15 dias, obtiveram uma

média de 2,26cm de altura, enquanto em ágar, tiveram uma média de 0,90cm, fitagel com 0,52cm e em ágar lavado com 0,28cm de altura. Na altura da parte aérea, observa-se também que os embriões em meio líquido obtiveram um maior número de folhas, (Figura 12).

A porcentagem de germinação ao longo dos quinze dias de cultivo “in vitro”, o ocorreu de maneira geral nos diferentes meios, um aumento linear na proporção de embriões germinados já que estatisticamente não houve diferenças significativas para a interação tratamento e avaliação. Aos 5 dias de cultivo os embriões de sucupira branca tinham 66% de germinação e aos 15 dias atingiram 84% de germinação.

Os embriões de sucupira branca cultivados “in vitro”, de maneira geral, obtiveram melhor resultados em meio líquido. A absorção dos nutrientes pelos embriões no meio líquido deve ser mais rápida do que na presença de gelificantes. A utilização do meio líquido na cultura de tecidos apresenta algumas vantagens como redução de custos, a esterilização do meio pode ser feita por ultrafiltração não sendo necessário a autoclavagem, facilita a automatização e principalmente por intensificar a propagação de gemas, crescimento e embriogênese somática em várias espécies. A ausência de agentes gelificantes pode aumentar a disponibilidade de água e dissolver substâncias do explante. Contudo o uso de meio líquido envolve problema de asfixia das explantes como resultado de imersão. Materiais inertes absorventes são utilizados para manter contato entre o meio e o explante como papel filtro, celulose e outros, conforme Alvard, Corte e Teisson (1993).

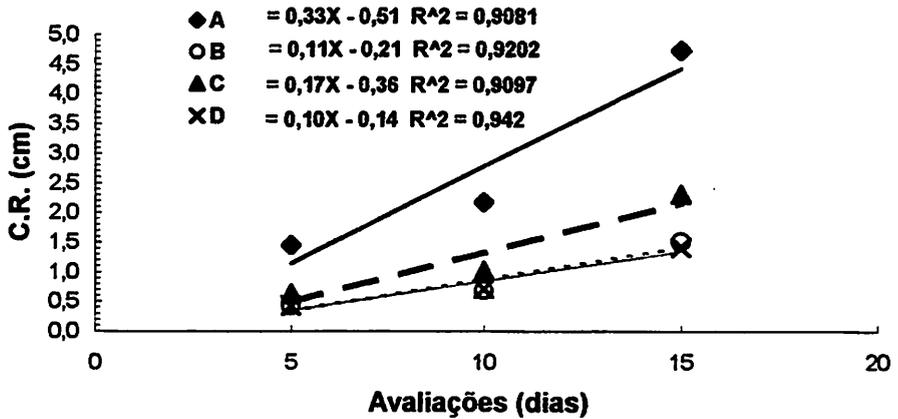


FIGURA 10. Representação gráfica e equação de regressão para comprimento de raízes em função das épocas ns avaliações aos 5, 10 e 15 dias a partir do cultivo de embriões de sucupira branca em diferentes meios. Sendo A: meio líquido, B: fitigel, C: ágar não lavado e D: ágar lavado.

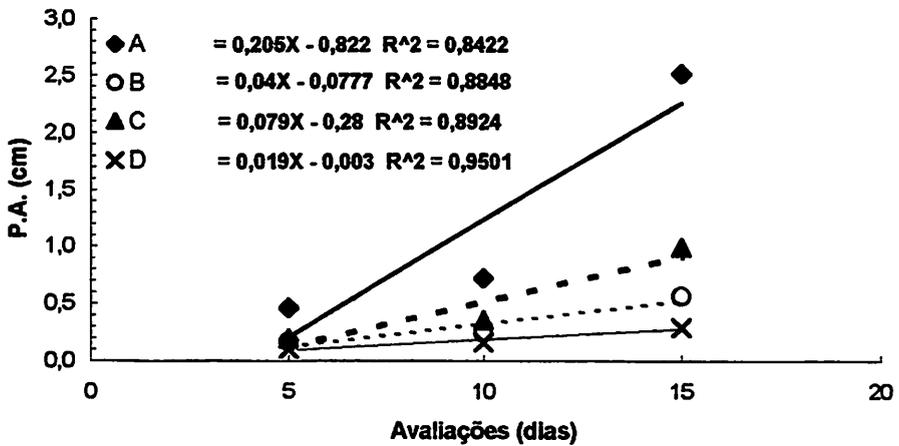


FIGURA 11. Gráfico e equação de regressão para parte aérea em função das avaliações (A: 5, 10 e 15 dias) a partir do cultivo de embriões de sucupira branca em diferentes meios. Sendo A: meio líquido, B: fitigel, C: ágar não lavado e D: ágar lavado.

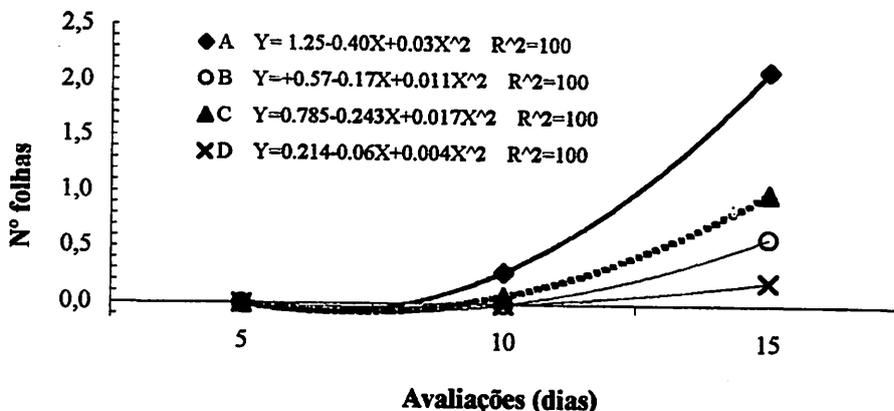


FIGURA 12. Gráfico e equação de regressão para o número de folhas de embriões de sucupira branca cultivados em diferentes meios em função dos dias de avaliação. Sendo A: meio líquido, B: fitigel, C: ágar não lavado e D: ágar lavado.

Neste experimento, observamos a supremacia do meio líquido, o que também foi observado por Watad et al., (1995) com proliferação de gemas de *Aconitum napellus*. O índice de propagação por mês foi de 4,2, que foi 45% maior que o máximo valor atingido com água solidificada. Essa diferença, segundo Watad et al., (1995), provavelmente deve-se à restrição de difusão das moléculas grandes em meio ágar e dos compostos inorgânicos. O baixo potencial hídrico existente no ágar solidificado limitaria a absorção dos íons. Os microelementos e fosfato poderiam ser absorvidos pelo ágar e portanto ficariam menos disponíveis nos explantes. A superfície de contato do explante no ágar, também restringiria as trocas gasosas.

Lameira et al., (1997) observaram que o meio líquido foi bem mais eficiente, na multiplicação “in vitro” de *Cordia verbenacea* L. conseguindo-se uma média de 3 propágulos por explantes com 13mm.

Os meios sólidos ou semi-sólidos são tradicionalmente solidificados com ágar, um polissacarídeos extraído de algas marinhas. O ágar tem sido

preferido para gelificação de meios. Neste experimento, com cultivo de embriões de sucupira branca utilizamos o ágar, e o ágar lavado, ambos na concentração de 0,7%. Romberger e Tabor (1971) fizeram um estudo detalhado do comportamento e efeitos do ágar utilizando meristemas de gema apical do pinheiro *Picea abies*. Em termos de qualidade foram testadas 12 marcas de ágar, o que apresentou melhor resultado foi o ágar Difco purificado. Para a concentração do ágar, observaram um declínio no crescimento do explante, com o aumento da concentração do ágar. O que foi explicado pela hipotética ação inibidora na qual o ágar possui substâncias que não são extraídas pelo processo de purificação, o melhor resultado foi o ágar na concentração de 0,125%. O mesmo foi relatado por Singha e Townsend (1985) notaram grande variação nos elementos químicos que compõem três marcas de ágar, em seus experimentos com maçã (*Malus baccata* (L.) Borkh x *M. pumila* var. *Niedzwetzkyana* (Dieck) Schneid) e pêra (*Pyrus communis* L.) utilizando gemas apicais. Compararam concentrações de Alumínio, que não é nutriente para a planta. Pelo contrário, possui efeitos tóxicos no desenvolvimento da planta. As variações de altos níveis de elementos químicos mostraram-se surpreendentes. Essas variações entre as marcas de ágar refletem no explante. Multibrotações na maçã foram reduzidas na presença de Bacto-agar e TC ágar quando houve aumento da concentração de 0,3% para 1,2%, a redução foi severa principalmente com Bacto-agar.

No cultivo “in vitro” de embriões de sucupira branca, os melhores resultados foram obtidos em cultivo com meio líquido, (Figura 13).

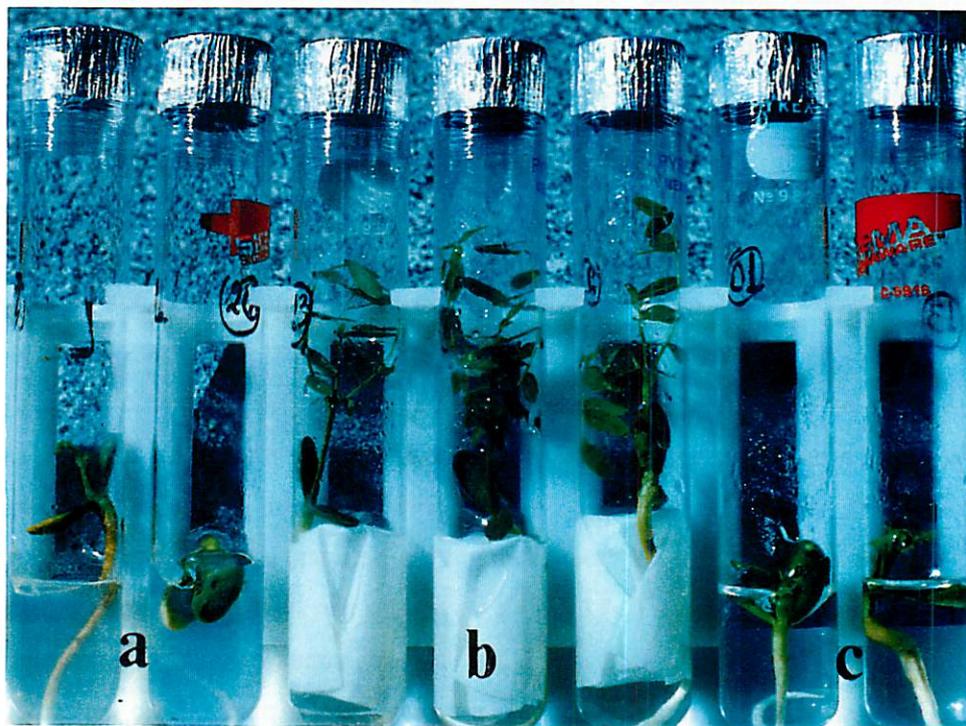


FIGURA 13: Desenvolvimento de embriões de sucupira branca “in vitro” em ágar lavado (A), meio líquido (B) e fitigel (C) aos 12 dias.

Segundo Ghashghaie, Brenckmann e Saugier (1991) tiveram melhores resultados utilizando ágar do que meio líquido em micropropagação “in vitro” de rosa (*Rosa hybrida* cv. Madame G. Delbrard). Em meio líquido, as gemas tiveram um desenvolvimento anormal com caules compridos, retorcidos, translúcidos e folhas quebradiças. Por outro lado, aumentando a concentração de ágar acima de 5,5 g/L, ocorreu uma redução na alongação e multiplicação de gemas. O número de gemas utilizáveis foi significativamente alto com ágar em concentrações moderadas (7,5 g/L).

O ágar lavado, utilizado no meio de cultura de embriões de sucupira branca, teve como objetivo reduzir ou eliminar as impurezas remanescentes. Com os resultados obtidos através das análises, observou-se que o ágar lavado

não teve melhor desempenho do que o ágar que não foi submetido a lavagem. Marcas de ágar e seus efeitos na formação e desenvolvimento de gema provenientes de explantes juvenil e adulto de carvalho (*Quercus robur* L.) foram comparadas por Pierik et al., (1997). Com os resultados dos experimentos, notou-se que o material juvenil foi menos sensível as marcas de ágar quando comparadas com material adulto. O ágar BDP (purified from Becton and Dickinson, US) foi o que apresentou relativamente a mais baixa concentração de elementos e não apresentou sintomas de necrose nas folhas e nem na gema apical, com 80% de formação de gemas no material adulto e 88% de gemas no material juvenil.

Análises química e física do ágar foram realizadas por Scholten e Pierik (1998) como gelificante em cultura de roseira (*Rosa hybrida* cv. Motrea; Marcelis-Van Acker e Scholten, 1995) antes de realizar os experimentos proporcionaram uma grande lavagem nos ágar que seriam utilizados em todos os experimentos. Suspensão de ágar, gel e água da lavagem do ágar foram submetidos a análises. Os melhores resultados para ágar foram o Daishin e o BD purificado, contendo relativamente baixa concentração de elementos. A alta concentração de elementos traços (Cu, Mn, Fe, Al, Cr, Cd, Ni) no ágar Daishin foi surpreendente. O ágar MC 29 continha um alto nível de Zn e Sn. No ágar BD purificado relativamente altas concentrações de Mn, Fe e Al foram detectados. Aparentemente, esses íons são mais difíceis de serem removidos durante a purificação do ágar, segundo Scholten e Pierik (1998). Baixas concentrações de Na e Cl são bons parâmetros para a pureza do ágar. Cloro foi quase completamente removido do ágar. Os elementos traços do ágar Daishin podem se lavados com pequeno volume de água. A diálise da suspensão removeu 48% do Al quando comparado com 85% no caso do gel, Scholten e Pierik (1998).

Pelas análises apresentadas no cultivo de embriões “in vitro” de sucupira branca, o fitagel utilizado na concentração de 2,2 g/L não obteve bons resultados

em relação as demais formas de suporte. No entanto, Li, Huang e Gbur (1998) obtiveram bons resultados utilizando fitagel na concentração de 2 g/L na embriogênese somática de embriões imaturos de pinheiro (*Pinus taeda* L.).

4.1.5 Avaliação do crescimento de embriões em meio líquido ou com ágar, em ambiente escuro e de luz

Neste experimento, onde embriões de sucupira branca foram cultivados *in vitro* em ambientes de luz ou de escuro, observamos que estes tiveram um comportamento indiferente quanto a este fator para a germinação. Na análise de variância, verificaram-se diferenças significativas apenas para meio ($P < 0,05$) no comprimento de raiz e épocas de avaliação ($P < 0,01$) para comprimento de raiz e número de folhas formadas, Tabela 12. As interações entre luz e meio de cultura, luz e épocas de avaliação não afetaram o comprimento de raiz, parte aérea, número de folhas e índice de germinação. Para raiz somente o meio influenciou no comprimento da raiz, o fotoperíodo não afetou significativamente a parte aérea independente dos diferentes meios, porém as avaliações em ambientes (luz e escuro) influenciaram significativamente no comprimento da parte aérea, como mostra a (Figura 14).

TABELA 12. Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para CR (comprimento de raízes) PA (comprimento da parte aérea), número de folhas e índice de germinação quando embriões foram cultivados na presença ou ausência de luz (dados transformados).

C. variação	G.l.	C.R. (cm)	P.A (cm)	N ^o Folhas	Índ. Germin.
Luz	1	0,266 ^{NS}	0,432**	0,077 ^{NS}	0,003 ^{NS}
Meio	1	0,379**	0,091 ^{NS}	0,044 ^{NS}	0,003 ^{NS}
Luz x Meio	1	0,001 ^{NS}	0,011 ^{NS}	0,004 ^{NS}	0,013 ^{NS}
Erro1	16	0,061	0,036	0,022	0,003
Semana	1	2,599**	2,049**	0,680**	0,000 ^{NS}
Luz x semana	1	0,052 ^{NS}	0,371**	0,077 ^{NS}	0,000 ^{NS}
Meio x semana	1	0,096 ^{NS}	0,043 ^{NS}	0,044 ^{NS}	0,000 ^{NS}
Luz x meio x sem.	1	0,134 *	3,4*10 ^{-4NS}	4,49*10 ^{-3 NS}	0,000 ^{NS}
Erro2	16	0,029	0,032	0,022 ^{NS}	5.2*10 ⁻⁴
c.v.(1) (%)		16,25	15,29	13,19	4,11
c.v.(2) (%)		11,20	14,28	13,19	1,65
Média		1,52	1,25	1,13	1,38

^{NS}, *, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

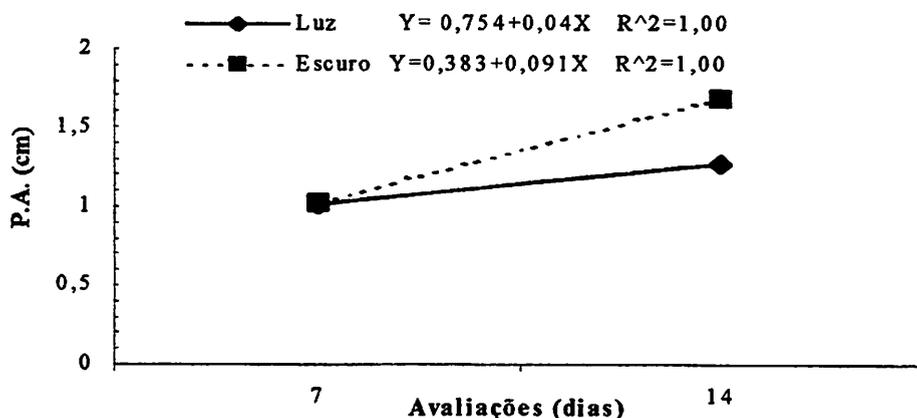


FIGURA 14: Comprimento da parte aérea de plântulas de sucupira branca, em relação aos ambientes de luz e escuro.

Os embriões de sucupira branca, cultivados no escuro como os cultivados em luz, tiveram desempenho germinativo muito semelhante (Tabela 13). No entanto, certa disparidade ocorreu com o desenvolvimento da parte

aérea dos embriões cultivados no escuro, com sintomas de estiolamento, como mostra a (Figura 14). As hastes apresentaram-se bem delgadas e os internós bem espaçados. Semelhante resultado de germinação foi observado por Cavalcante e Perez (1996), com sementes escarificadas através de ácido sulfúrico em *Leucaena leucophala* Lam. (De Wit). As sementes cultivadas em luz contínua atingiram 99,3% de germinação, similarmente as sementes no escuro alcançaram 99,0%. Afirmaram que para classificação segura das sementes quanto a sua fotoblastia, sugeriu realizar germinação em condições naturais, ou seja, em sementes que não tivessem sido submetidas a escarificação.

TABELA 13: Porcentagem de germinação de embriões de sucupira branca em meio líquido e com ágar, em ambiente escuro ou de luz em duas épocas de avaliação.

Meios	1º Avaliação		2º Avaliação	
	luz	escuro	luz	escuro
Líquido	85	90	85	90
Ágar	100	85	100	85

A importância da luz na germinação de sementes é conhecida há muito tempo; contudo as várias espécies comportam-se das mais diversas formas, as sementes de *Impatiens wallerana* Hook, só germinaram na presença de luz ou quando induzidas através da aplicação exógena de GA₃, conforme Souza e Pereira (1992). As sementes de calabura (*Muntingia calabura* L.), de maneira semelhante, não germinaram no escuro a 25° C com ou sem solução de GA₃. No entanto em luz constante com ou sem GA₃ germinaram 67% e 44% respectivamente, Laura, Alvarenga e Arrigoni (1994). As sementes de quaresmeira (*Tibouchina sellowiana* Cogn) são fotoblásticas positivas e necessitam de pelo menos um fotoperíodo de 12 horas, concluíram Barbosa et al., (1988). Em sementes de *Vaccinium myrtillus* L. (mirtilo) cultivadas no escuro, a germinação não excedeu a 0,5%, com indução de luz por 4 dias a

porcentagem de germinação atingiu o máximo de 90%, Giba, Grubisic e Konjevic (1993).

4.1.6 Avaliação do crescimento de eixos embrionários em meio líquido e em meios sob diferentes condições de gelificantes

O cultivo de eixos embrionários de sucupira branca em diferentes tipos de suporte não apresentaram diferenças significativas, como mostra a análise de variância (Tabela 14). Diferenças significativas ocorreram apenas para épocas de avaliação ($P < 0,01$) para comprimento de raiz, comprimento da parte aérea e número de folhas. Observou-se, de maneira geral, um crescimento muito lento, o que já era esperado, visto que a retirada dos cotilédones, afetaria o suprimento imediato das reservas nutritivas fazendo com que os eixos embrionários, retirassem esses nutrientes do meio de cultura. Como o meio de cultura utilizado foi o MS, diluído em 50% dos macro e micronutrientes, talvez este fato tenha contribuído para lentidão do crescimento observado. A última avaliação realizada foi aos 14 dias, provavelmente com maior período de tempo, os eixos embrionários de sucupira branca, apresentassem diferenças entre os meios utilizados.

TABELA 14. Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para CR (comprimento de raiz) PA (comprimento da parte aérea) e número de folhas quando eixos embrionários foram cultivados em diferentes meios (dados transformados).

C. variação	G.l.	C.R. (cm)	P.A. (cm)	N-folhas
Meios	3	0,259 ^{NS}	0,005 ^{NS}	0,029 ^{NS}
Erro1	12	0,241	0,024	0,012
Semana	1	2,063**	1,481**	1,761**
Meios x semana	3	0,039 ^{NS}	0,006 ^{NS}	0,029 ^{NS}
Erro2	12	0,023	0,009	0,012
C.V.(1) (%)		43,27	31,44	8,94
C.V.(2) (%)		13,27	19,36	8,72
Média		1,13	0,49	1,23

^{NS}, **, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Estudo detalhado foi proporcionado por eixos embrionários de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln) em experimentos de Levi et al., (1992). Observaram que a cultura de eixos embrionários em meio líquido favoreceu ao estudo de reativação e multiplicação de células na germinação, em detrimento das sementes intactas. A reativação do ciclo celular foi claramente antecipado em relação à utilização de sementes. A cultura de eixos embrionários pode ser usada para diversos tipos de pesquisas, na reativação do ciclo celular e mais precisamente, na antecipação da reativação do embrião na germinação.

Para a análise de germinação, observou-se que todos os eixos embrionários desenvolveram-se igualmente em todos os meios de cultura, pois uma porcentagem de sobrevivência de 100%.

Os meios de cultura utilizados para cultivos de eixos embrionários de sucupira branca, não foram suplementados com reguladores de crescimento, diferentemente do cultivo de eixos embrionários de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) visando regeneração, realizado por Mohamed, Read e Coyne (1992) que utilizaram meio básico de Gamborg, Miller e Ojima (1968), com ágar suplementado com BA. O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo para indução de multiplicação de gemas e regeneração das plantas através da cultura de tecidos de eixos embrionários.

O meio básico de Joy e Folkes (1965), modificado e em meio líquido foi novamente utilizado por Levi et al., (1993) em eixos embrionários de ervilha (*Pisum sativum* L.) para estudos do efeito do ácido abscísico na germinação, no entanto McKently (1995) utilizou ágar no cultivo de eixos embrionários de três variedades de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). A finalidade deste estudo foi avaliar a capacidade de regeneração via embriogênese somática a partir de eixos embrionários maduros. Diferenças significativas foram observadas entre os genótipos.

Neste experimento, os eixos embrionários de sucupira branca foram isolados de frutos recém colhidos, ou seja, com bom potencial germinativo. Sendo a sucupira branca uma planta arbórea, a produção de sementes ocorre apenas uma vez por ano. Portanto, é importante um estudo relacionado a eixos embrionários “in vitro”, visto que o eixo embrionário é a última estrutura da semente a ser deteriorada. A deterioração é um fator inerente a todas as sementes, independente de qualquer tipo ou classificação. Blackman et al., (1996) conduziram experimentos com sementes deterioradas de milho (*Zea mays* L.) provenientes de banco de germoplasma. Eixos embrionários ou embriões foram isolados e cultivados em meio de cultura básico, que consistia apenas de ágar, antibiótico, sacarose e GA₃. O método contribuiu para promover a germinação de sementes de baixa viabilidade, resgatando genótipos importantes do banco de germoplasma.

O cultivo de eixos embrionários atualmente apresenta-se com grandes perspectivas de futuro, visto que é amplamente utilizado em pesquisas visando plantas transgênicas.

4.1.7 Avaliação do crescimento de embriões em tubos de ensaio fechados com tampas plásticas ou com forminhas de papel alumínio tipo brigadeiro

O crescimento e desenvolvimento das plântulas ou explantes “in vitro” não dependem somente da composição dos nutrientes no meio, mas também podem ser afetados pela composição da atmosfera gasosa que os envolve. Geralmente, na cultura de tecidos, o uso de tampas se voltam à contaminação e dessecação do meio de cultura, fazendo muitas vezes com que o acúmulo de etileno desencadeie uma variedade de efeitos.

Nos resultados das análises de variância para os embriões de sucupira

branca, não verificam-se diferenças significativas entre tampas ($P < 0,01$). Foram observados diferenças significativas entre os dias de avaliação ($P < 0,01$) para crescimento de raiz, parte aérea e número de folhas, como mostra a Tabela 15.

TABELA 15: Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para comprimento de raiz (CR), número de folhas (N. Folhas), comprimento da parte aérea (P.A.) e índice de germinação (Índ. Germinação), quando embriões de sucupira branca foram cultivados em diferentes tipos de tampas meios e avaliados aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo. Dados transformados para número de folhas e parte aérea.

C. Variação	G.L.	C.R.(cm)	P.A.(cm)	N. Folhas	Índ. Germinação
Tampa	1	14,695 ^{NS}	0,597 ^{NS}	3,950 ^{NS}	0,003 ^{NS}
Resíduo 1	6	4,176	0,054	1,360	0,001
Dias Aval.	3	65,569**	2,078**	21,644**	0,033 ^{NS}
Tamp. x Dias	3	0,7665**	0,067**	0,471 ^{NS}	0,001
Resíduo 2	18	0,183	0,006	0,221	3,44
c.v.(1) (%)		33,89	13,28	34,70	3,44
c.v.(2) (%)		7,09	4,56	13,98	3,44
Média		6,03	1,75	3,36	0,99

^{NS}, *, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Nos diferentes tipos de tampas, observaram-se também diferentes comportamentos. Nos tubos de ensaio com tampas plásticas, estes apresentaram condensação nas suas paredes, provavelmente pela ausência de trocas gasosas e pelo acúmulo de gases.

Nas tampas plásticas, as plântulas de sucupira branca mostraram-se bem reduzidas no que se refere ao tamanho das folhas (Figura 15). As diferenças foram marcantes principalmente em termos qualitativos. Portanto, o número de folhas não foi afetado quantitativamente.

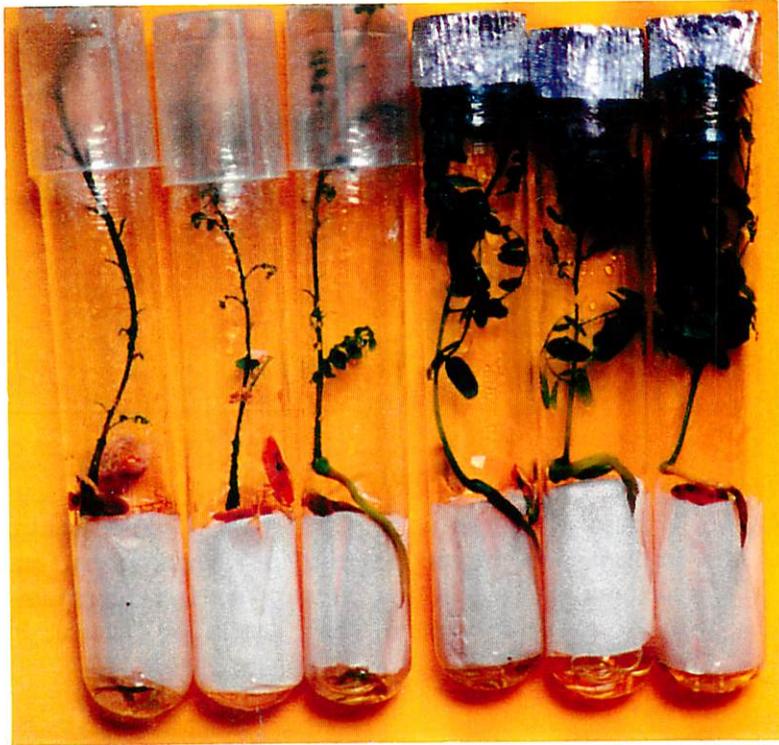


FIGURA 15: Desenvolvimento de embriões de sucupira branca em tubos de ensaio com tampas plásticas ou de papel alumínio tipo brigadeiro (30 dias).

As diferenças de tampas também não afetaram significativamente o comprimento de raízes em relação ao tempo, como mostra a Figura 16.

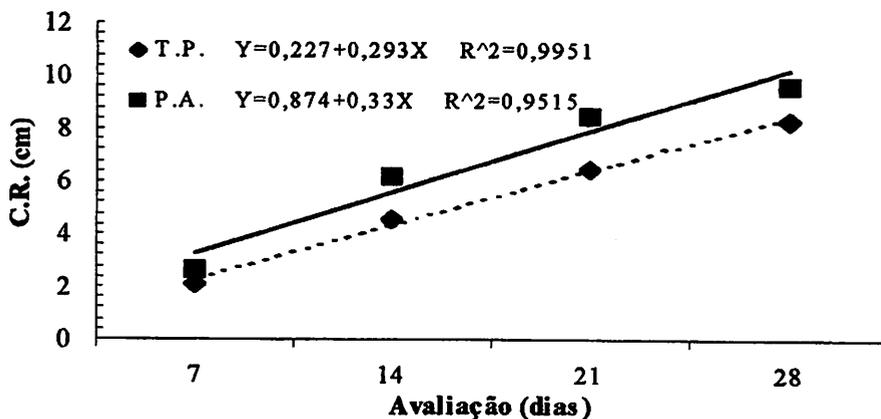


FIGURA 16. Gráfico e equação de regressão para o comprimento de raízes formadas em função dos dias de avaliação em embriões de sucupira branca cultivada "in vitro" em tubos com tampa plástica e de papel de alumínio. (T.P.: tampa de plástica; P.A.: papel alumínio).

É bem conhecido o efeito inibitório do etileno sobre o crescimento das plântulas e o desencadeamento da senescência.

McClelland e Smith (1990), em experimentos com segmentos nodais de cinco espécies lenhosas: *Amelanchier spicata* (Lam.) C. Koch, *Acer rubrum* L.; *Forsythia x intermedia* Zab.; *Malus x domestica* Borkh e *Betula nigra* L. observaram que o uso em três diferentes recipientes influenciaram o comportamento das plantas. O peso fresco foi maior nos dois maiores recipientes, ou seja, no frasco de "baby food" e em recipientes de polipropileno (tipo magenta) do que nos tubos de ensaio. Este fato deve-se a capacidade do maior frasco precisar de maior tempo para que haja concentração de etileno, enquanto os tubos de ensaio, de menor capacidade, logo ocorreu saturação dos gases inibindo o desenvolvimento das plantas. McClelland e Smith (1990) relataram que a área foliar em todas as espécies aumentaram conforme o tamanho do recipiente, de maneira semelhante, como ocorreu nos embriões de

sucupira branca inoculados nos tubos de ensaio, foi marcante a redução da área foliar e da parte aérea conforme mostra a Figura 17.

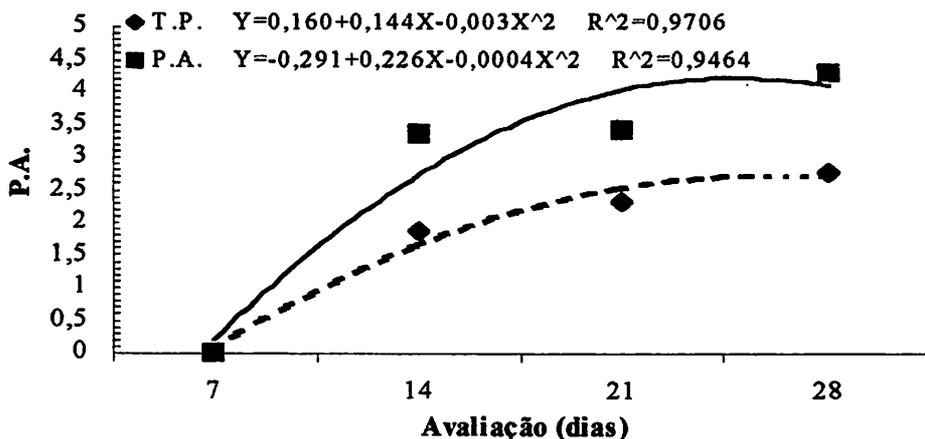


FIGURA 17: Gráfico e equação de regressão para o comprimento da parte aérea, em função dos dias de avaliação em embriões de sucupira branca cultivada "in vitro" em tubos com tampa plástica e de papel de alumínio. (T.P.: tampa de plástica; P.A.: papel alumínio).

McClelland e Smith (1990) relataram que o tipo de selagem afetou o desenvolvimento, recipientes selados com parafilm apresentaram-se com alta condensação, da mesma forma como foi descrita no experimento de segmentos nodais de sucupira branca. As espécies experimentadas por eles, principalmente em *Acer* e *Forsythia* mostraram-se flácidos e vitrificados. Estes sintomas devem ser consequências da alta umidade retida nos recipientes, como também da inibição de trocas gasosas.

Algumas plântulas de sucupira branca desenvolvidas em tubos de ensaio fechados com tampas plásticas apresentaram hipertrofia das lenticelas em seu caule e em alguns folíolos, quando o cultivo já se encontrava com aproximadamente um mês. De maneira semelhante Jackson et al., (1991) em experimentos com *Ficus lyrata* Warb., *Gerbera jamesonii* Bolus e *Solanum*

tuberosum L. cv. Red Craig's Royal, observaram que as plântulas de batata foram bastante sensíveis. Com recipientes bem fechados, na superfície dos microtubérculos apareceram as lenticelas provenientes das aberturas provocadas pela erupção das células. A hipertrofia das lenticelas deve ser a maior resposta fisiológica à sensibilidade do etileno, segundo os autores. Em *Ficus* o tamanho das folhas foram grandemente reduzidos, este liberou mais etileno do que *Gerbera*.

A emissão de gás etileno no recipiente do meio de cultura pode ser de origem biótica ou abiótica. Isso significa que pode haver produção de etileno conforme o tipo de tampa utilizada, foi o que ocorreu com rolhas de borracha feitas à base de butadieno. Em relação aos meios de cultura, observou-se que o ágar é fonte de emissão de etileno, quanto maior a concentração de ágar maior a concentração de etileno. O gélite libera menos etileno do que o ágar. Em meio líquido praticamente não ocorre liberação do gás (Mensuali-Sodi, Panizza e Tognoni 1992).

O crescimento da raiz não foi afetado, pois não houve diferença significativa na análise de variância e nem visualmente ocorreram quaisquer modificações. No entanto Marino e Ventura (1997) nos resultados de seus experimentos confirmaram maior importância ao acúmulo do etileno para promover enraizamento de segmentos nodais de híbrido de pêsego.

A tampa de forminha de papel alumínio tipo brigadeiro foi o melhor tipo de tampa no cultivo de arbóreas da Mata Atlântica como *Miconia* sp. (Jacatirão), *Dalbergia nigra* (jacarandá), *Plathymenia foliolosa* (vinhático), *Cordia trichotoma* (louro) e *Raphanea ferruginea* (capororoca) em relação as tampas plásticas, que provocaram inibição no desenvolvimento e redução da área foliar, Teixeira, Lemos e Coelho (1995). A tampa de papel alumínio tipo brigadeiro, provavelmente favorece as trocas gasosas. Ao contrário que foi observado por Carvalho et al (1995), estes utilizando tampa de papel alumínio, tipo comum,

comercialmente vendido em rolo, em experimento comparativo com tampa plástica relataram que a tampa plástica foi melhor do que a tampa de papel alumínio. Os segmentos caulinares de *Ipomea batatas* (L.) Poir, apresentaram maior peso fresco e maior peso seco da parte aérea, quando utilizou-se tampa plástica tanto nos frascos quanto nos tubos de ensaio.

4.2 Estabelecimento “in vitro” de segmentos nodais de sucupira branca

4.2.1 Estabelecimento “in vitro” de segmentos nodais de sucupira branca em meios básicos de MS (Murashige e Skoog, (1962) e WPM (Lloyd e McCown, 1981)

Neste experimento, comparou-se o comportamento dos segmentos nodais de sucupira branca em dois diferentes meios básicos, MS e WPM.

Os resultados da análise de variância apresentam diferenças significativas do meio ($P < 0,01$) para número de gemas formadas, para o índice de crescimento nodal. O número e altura de haste não foram afetados pelos meios. O tempo de avaliação foi significativo para o crescimento nodal. A interação avaliação x meio básico foi significativo ($P < 0,01$) para número de gemas e para crescimentos nodal, como mostra a Tabela 16.

TABELA 16: Resumo da análise de variância para segmentos nodais de sucupira branca, para os parâmetros número de gemas, crescimento nodal, número de hastes e altura da haste, quando cultivados em meios básicos MS e WPM.

C. variação	G.L	Nº G	Cresc. Nodal	Nº Haste	Alt. Haste
Meio básico	1	2,224**	0,224 **	0,298 ^{NS}	0,074 ^{NS}
Resíduo 1	10	0,160	0,017	0,030	0,011
Avaliações	2	0,022 ^{NS}	0,009**	0,003 ^{NS}	0,8*10 ^{-4NS}
M.B.x A.	2	0,081 **	0,007**	0,002 ^{NS}	0,003 ^{NS}
Resíduo 2	20	0,015	0,002	0,003	0,0013
c.v.(1) (%)		22,37	10,11	12,94	8,99
c.v.(2) (%)		6,98	3,12	4,60	3,11
Média		1,79	1,29	1,35	1,185

^{NS}, *, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Na Tabela 17, encontra-se a diferença de comportamento dos segmentos nodais de sucupira branca. Os segmentos nodais de sucupira branca apresentaram maior desenvolvimento em meio básico WPM. As Tabelas de interação (18 e 19) confirmam a superioridade do meio básico WPM. Os segmentos nodais de sucupira branca em meio básico MS apresentaram alto índice de mortalidade. Para o meio básico WPM, observou-se apenas uma leve oxidação na base do explante, embora tenha ocorrido bom desenvolvimento das hastes não houve enraizamento e nem presença de calos nos segmentos nodais de sucupira branca.

TABELA 17: Valores médio de número de gemas (NG), índice de crescimento nodal, número de hastes e altura da haste em função de dois meios básicos.

Meios básicos	Parâmetros			
	Nº G	Índice Nodal	Nº Haste	Altura de Haste (cm)
WPM	2,04 a	1,38 a	1,44 a	1,22 a
MS	1,54 b	1,22 b	1,26 b	1,13 b

Média seguida pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F (1%)

No meio básico MS não ocorreu o fenômeno da hiperhidratação, já no

meio básico WPM a ocorrência foi de apenas 2,7%.

Em cultura de tecidos, mais especificamente em plantas lenhosas, já foram utilizados mais de 60 tipos diferentes de meios básicos de cultura. Isto é devido à grande diversidade de espécies arbóreas e seus mais diversos comportamentos e balanceamentos nutricionais.

TABELA 18: Médias do número de gemas na interação meios x avaliações

Meios básicos	Avaliações (dias)		
	30	60	90
WPM	1,908 a	2,060 a	2,146 a
MS	1,567 b	1,570 b	1,483 b

Média seguida pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F (1%)

O meio básico de cultura mais utilizado é o meio “MS” (Murashige e Skoog (1962), Bonga citado por Rao e Lee (1986). No entanto, em 1981, McCown e Lloyd mostraram que tecidos de espécies lenhosas se desenvolviam melhor em meio de cultura com baixa concentração de sais. Como o meio básico MS possui as mais altas concentrações de sais em relação as outras formulações, acharam melhor reduzi-los pela metade, Rao e Lee (1986).

TABELA 19: Índice de crescimento nodal para a interação meios x avaliações.

Meios básicos	Avaliações		
	30	60	90
WPM	0,887a	0,943a	0,86a
MS	0,633b	0,470b	0,39b

Média seguida pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F (1%)

Os segmentos nodais de sucupira branca em meio MS tiveram alta porcentagem de mortalidade, como mostra a Figura 18, muito provavelmente porque o MS possui altas concentrações de sais. Houve um aumento médio de 0,12% na porcentagem de germinação para cada um dia na avaliação. Conforme

McCown e Sellmer (1982), a baixa concentração de sais no meio de cultura jamais é prejudicial por não ser o meio de cultura ótimo para o desenvolvimento do explante, como pode ser letal o uso de meio de cultura com altas concentrações de sais.

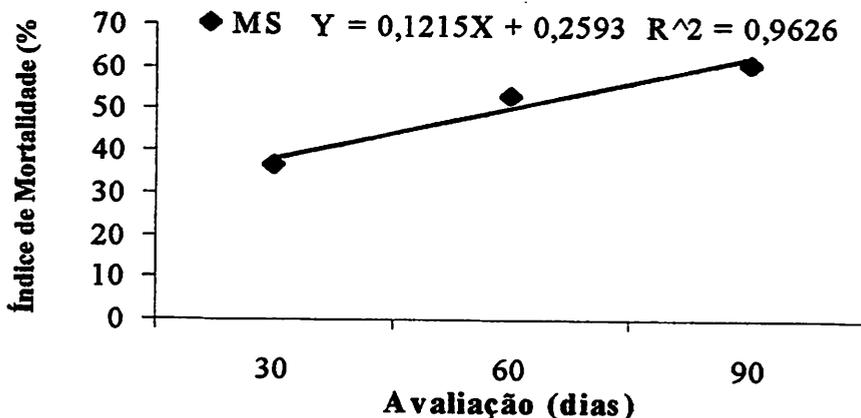


FIGURA 18: Índice de mortalidade nodal de sucupira branca em relação as avaliações mensais.

O MS e o WPM diferem principalmente em concentrações de macroelementos. Suspeita-se portanto, que para as espécies onde WPM não resulte em bom desenvolvimento, o meio de cultura deva ser suplementado com NH_4NO_3 na quantidade encontrada no meio básico MS. As espécies lenhosas também são muito sensíveis a NaCl, segundo McCown e Sellmer (1982).

Linington (1991) em experimentos com cultivo de embriões de *Dipterocarpus alatus* e *D. intricatus*, comparando os dois meios básicos de cultura, observaram que o meio WPM foi significativamente melhor para comprimento de raiz e número de folhas. Em ensaios utilizando apenas meio básico WPM, observou-se que o problema de oxidação fenólica foi controlado cultivando os embriões primeiramente em ponte de papel de filtro por 3 dias, em meio líquido, com carvão ativado e em seguida foram transferidos para meio com ágar.

No entanto, Normah, Nor-Azza e Aliudin (1995), em experimentos com mangostão (*Garcinia mangostana* L.), observaram que para proliferação de gemas através de segmentos de semente, que o meio MS apresentou maior proliferação do que o meio WPM. Ambos os meios básicos foram suplementados com reguladores de crescimento nas mesmas proporções, no MS o número de gemas atingiram 16,8 por segmento de semente. O baixo número de gemas deve-se provavelmente à baixa concentração de nitrogênio no WPM. Contudo no enraizamento, o meio básico WPM apresentou-se mais eficiente. A suplementação com carvão ativado reduziu a proliferação de gemas neste estudo. Provavelmente porque o carvão ativado adsorve reguladores de crescimento.

Para Berger e Schaffner (1995), que tinham como objetivo a indução de gemas através do primeiro nó, onde contém duas gemas axilares de *Swartzia madagascariensis*, leguminosa arbórea, relataram que obtiveram 35 gemas por explante no meio WPM, 36 no meio MS e apenas 15 gemas no meio B5. Todos os meios foram suplementados com 2,2 μ M de BAP.

Neste experimento os segmentos nodais de sucupira branca eram provenientes de plântulas cultivadas “in vitro” e na ocasião tinham apenas 3 meses e 13 dias, portanto explantes juvenis. No entanto, Quraishi e Mishra (1998), obtiveram maior proliferação de gemas em *Cleistanthus collinus* através de segmento nodal proveniente de plantas adultas em meio MS, que foi melhor do que os meios básicos B5 e WPM. Relataram ainda, que o maiores comprimentos de gemas foram atingidos com MS suplementado com 0,44 μ M de BAP.

Cerqueira Conde (1991), também em experimentos com segmentos nodais de sucupira branca em meio B5 (Gamborg, Miller e Ojima, 1968) e em meio básico MS, observou que o meio B5 proporcionou um número maior de folhas por explante (3,3) e maior altura (1,6cm), como também maior

sobrevivência 70%, em relação ao meio MS, em que a sobrevivência, foi de apenas 40%. Portanto, mais uma vez foi constatado que o meio MS causa alto índice de mortalidade, como apresenta a Figura 18.

4.2.2 Estabelecimento de segmentos nodais de sucupira branca em metade da força dos sais do MS suplementado com água de côco

A água de côco que é um dos aditivos na denominada “misturas complexas” é das mais utilizadas na cultura de tecidos. A água de côco é composta por aminoácidos, vitaminas, açúcares e principalmente por citocininas. Estimula o crescimento de calos, aumenta a formação de embriões somáticos e induz o desenvolvimento de embriões imaturos (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). Com todas estas características, a água de côco foi utilizada em segmentos nodais de sucupira branca e observado seu comportamento.

Pelos resultados da análise de variância (Tabela 20) não houve diferenças significativas entre os quatro tratamentos utilizados, ou seja, água de côco nas concentrações de 0, 5, 10, e 20%. Não houve diferenças também para número de gemas, número de hastes e comprimento de haste, para os segmentos nodais de sucupira branca inoculados. Diferenças significativas para avaliação ($P < 0,01$) em relação aos três parâmetros observados ao longo dos três meses e para a interação avaliação x concentração de água de côco.

TABELA 20: Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para número de gemas (Nºgemas), número de haste (Nºhaste) e comprimento da haste, quando segmentos nodais foram cultivados em meio MS (1/2 sais) com diferentes concentrações de água de côco.

C.variação	G.l.	Nº gemas	Nº haste	Compr. haste (cm)
Água côco	3	7,897 ^{NS}	0,125 ^{NS}	0,252 ^{NS}
Errol	24	7,530	0,208	0,194
Avaliação	2	68,751**	1,298**	0,518**
Aval. x Agua	6	2,829**	0,077 ^{NS}	0,055 ^{NS}
Erro2	48	0,842	0,043	0,029
Cv (1) (%)		55,81	39,48	61,29
Cv (2) (%)		18,66	17,96	23,87
Média		4,917	1,155	0,718

^{NS}, *, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

A água de côco não apresentou incrementos no desenvolvimento dos segmentos nodais de sucupira branca, em nenhum aspecto. No entanto Al-Khayri et al., (1992) observaram que a adição de 15% de água de côco no meio de cultura melhorou o crescimento de calos, a capacidade regenerativa de gemas e crescimento de gemas em discos foliares em espinafre (*Spinacia oleracea* L.). A suplementação de água de côco no meio de cultura fez com que ocorresse regeneração de gemas com 4 a 5 semanas comparadas com a 8 a 12 semanas em meio de cultura sem água de côco.

A água de côco também foi utilizada por Câmara, Oliveira e Dias Júnior (1997) em germinação "in vitro" de sementes de pau branco *Auxemma oncocalyx* Taub. As concentrações utilizadas foram 0, 25, 50, 75 e 100% no meio de cultura MS a 25%. Aos 21 dias, observou-se que a porcentagem de sementes germinadas não foi influenciada pelo tipo de meio de cultura utilizado. Pelo contrário, houve uma inibição da abertura dos cotilédones na presença de água de côco.

4.2.3 Indução de multibrotações em meio sólido

Pela análise de variância, observa-se que houve diferenças significativas para as concentrações de BAP e de ANA ($p < 0,01$) nos segmentos nodais de sucupira branca para formação de aglomerados e de brotos. A interação de BAP x ANA foi significativa ($P < 0,05$) somente para número de aglomerados, nos dados transformados da Tabela 21.

TABELA 21: Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para o número de aglomerado e número de brotos para segmentos nodais de sucupira branca cultivados em meio MS 50% da força dos sais em 4 concentrações combinadas de ANA e BAP.

F.V.	G.L.	Dados transformados	
		Nº de Aglomerados	Nº de Brotos
ANA	3	1,4939**	3,9931**
BAP	3	1,1881**	4,4042**
ANA*BAP	9	0,0832*	0,2767
Resíduo	48	0,0403	0,1692
Média		1,23	1,74
C.V.(%)		16,32	27,58

NS, *, ** não significativo e significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Observando a interação de BAP x ANA para a formação de aglomerados de brotos em segmentos nodais de sucupira branca (Tabela 22), verificam-se que maiores médias de aglomerados ocorreram nas concentrações de 5,0µM com 3,20 aglomerados por segmento nodal seguido da concentração de 2,5µM de BAP com 2,65 aglomerados por segmentos nodal, ambas as concentrações com 0,0 de ANA.

A média de número de brotos também foi maximizada quando utilizou-se BAP na concentração de 5,0µM e 0,0 de ANA com 7,65 brotos. Em seguida com 7,25 brotos com a concentração de 2,5µM e 0,0 de ANA como mostra a Tabela 23.

TABELA 22: Valores médios de números de aglomerados em função das concentrações de ANA e BAP.

BAP μM	ANA μM				Média
	0	1	3	5	
0	0,60 b A	0,20 b A	0,10 b A	0,05 b A	0,24 c
2.5	2,65 a A	1,70 a A	0,50 ab B	0,20 ab B	1,26 b
5	3,20 a A	1,75 a B	1,15 a B	0,90 a B	1,80 a
10	2,55 a A	1,50 a AB	1,05 a B	0,60 ab B	1,43 ab
Média	2,30 A	1,29 B	0,70 C	0,44 C	

Médias com letras iguais minúscula nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

TABELA 23: Valores médios de números de brotos em função das concentrações de ANA e BAP.

BAP μM	ANA μM				Média
	0	1	3	5	
0	1,55 b A	0,45 b A	0,30 b A	0,10 b A	0,60 b
2.5	7,25 a A	4,60 a A	1,40 ab B	0,81 ab B	3,52 a
5	7,65 a A	5,35 a AB	3,75 a BC	2,30 a C	4,76 a
10	4,90 a A	4,35 a AB	3,25 a AB	1,60 ab B	3,53 a
Média	5,34 A	3,69 B	2,18 C	1,20 C	

Médias com letras iguais minúscula nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

A Figura 19 apresenta o número médio de aglomerados e o número médio de brotos nas concentrações de BAP para 0,0; 2,5; 5,0 e 10 μM para a concentração de 0,0 de ANA. A concentração de 5,0 μM de BAP apresentou-se melhor quantitativamente e qualitativamente em relação as brotações surgidas (Figura 20).

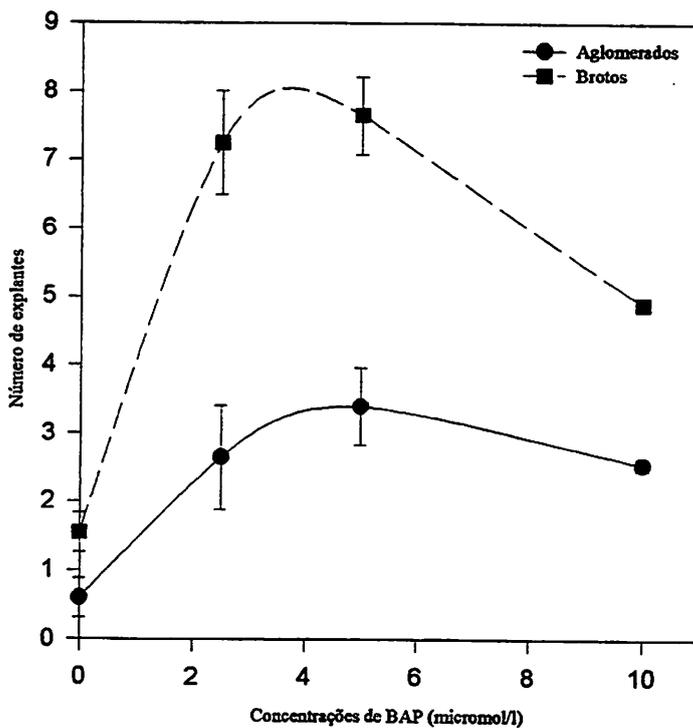


FIGURA 19: Número médio de aglomerados e de brotos formados a partir do cultivo de segmentos nodais de sucupira branca em meio MS 50% da força dos sais nas concentrações de 0,0; 2,5; 5,0 e 10 μ M de BAP.



FIGURA 20: Brotações em segmento nodal de sucupira branca inoculado em meio com $5,0\mu\text{M}$ de BAP (20 dias).

A presença de ANA causou muita formação de calos. A intensidade de calos foi diretamente proporcional à concentração de ANA. Observou-se, na Tabela 24, que nas concentrações de $3,0$ e de $5,0\mu\text{M}$ de ANA ocorreram maior presença de segmentos nodais com 100% da sua área coberta por calos.

TABELA 24: Quantificação da porcentagem de calos por segmento nodal nos tratamentos de BAP x ANA (dados originais).

BAP(μ M)	ANA (μ M)							
	0		1		3		5	
0	5*	A	12*	E	8*	I	1*	M
					1**		10**	
					3****		8****	
							1****	
2,5	8*	B	6*	F	2*	J	1**	N
			12**		5**		9***	
					5****		10****	
					7****			
5,0	10*	C	6*	G	1**	K	2*	O
			7**		7***		2**	
			4***		12****		7***	
							7****	
10,0	11*	D	1*	H	1**	L	2*	P
			6**		5***		3**	
			11***		11****		10***	
							3****	

A a P: representam os 16 tratamentos das combinações de BAP x ANA

Numeração quantificando segmentos nodais com calos

* 0 a 25% da área do segmento nodal com calo

** 25 a 50% da área do segmento nodal com calo

*** 50 a 75% da área do segmento nodal com calo

**** 75 a 100% da área do segmento nodal com calo

A formação de calos deve-se a um desbalanceamento nos níveis de reguladores de crescimento exógenos aplicados com os níveis de hormônios contidos nos explantes. Nos segmentos nodais de sucupira branca, as mais altas concentrações de ANA provocaram certa inibição no surgimento de aglomerados e brotos, conforme apresenta a Figura 21.

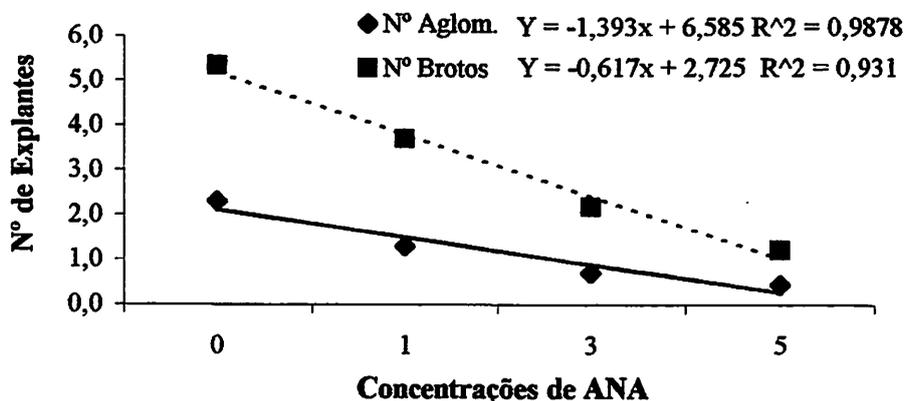


FIGURA 21: Equação de regressão para o número de aglomerados e de brotos formados a partir do cultivo de segmentos nodais de sucupira branca em meio MS 50% da força dos sais nas concentrações de 0, 1, 3 e 5 μM de ANA.

Os melhores resultados de multiplicação de brotos em segmentos nodais de sucupira branca foram aqueles onde tinham apenas concentrações de BAP. O mesmo foi observado por Barbosa et al., (1990) com macieira ‘Gala’ (*Malus* spp.), das concentrações experimentadas de 6,0 μM de BAP a 12,0 μM de BAP, o número de brotos visíveis após 60 dias de cultivo variou na faixa de 8,9 e 16,1 brotações por explante. A concentração ideal de BAP na cultivar ‘Gala’ foi de 10 μM a qual proporcionou a quantidade expressiva de 16,1 brotos por explante inoculado.

Diferentes concentrações de BAP também foram utilizadas por Pasqual e Barros (1991) para proliferação de brotação em segmentos nodais de café (*Coffea arabica* L.). Descreveram que a multiplicação de gemas foi mais estimulada por uso de BAP na concentração de 3.000 $\mu\text{g/L}$ e que o uso de ANA na concentração de 200 $\mu\text{g/L}$ foi prejudicial à proliferação de brotos. Para a arbórea do cerrado *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão),

Pasqual e Barros (1992) relataram que o melhor resultado para a proliferação de gemas de segmentos nodais foi na concentração de 4,0mg/L de BAP na ausência de ANA.

Pinto et al., (1994), em segmentos nodais e apicais de *Kielmeyera coriacea* Martius, arbórea, medicinal do cerrado, observaram que a maior taxa de multiplicação foi obtida com as concentrações de 0,5mg/L e 1,0mg/L de BAP no explante nodal e 0,5mg/L de BAP obteve-se 7,3 brotos por segmento nodal.

Brotações em segmentos nodais de abacateiro foram obtidos por Biasi, Koller e Kampf (1994) com aplicação de 3mg/L de BAP.

A espécie da planta submetida à multiplicação é fator importante para a concentração e tipo de regulador a ser utilizado.

A multiplicação de gemas em segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden por Carvalho (1988) foi obtida com BAP a 0,5 e 1,0mg/L na ausência e nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/L de ANA.

A *Hancornia speciosa* Gomez (mangaba) foi propagada através de multibrotação por Pereira-Netto (1996) utilizando-se meio MS suplementado com 4 μ M de BA e 2,5 μ M de IBA em segmentos nodais de 1cm de comprimento.

O BAP é provavelmente a citocinina mais empregada para a indução e alongação de gemas em arbóreas, especialmente nas espécies tropicais, Detrez citado por Pereira-Netto (1996).

Os resultados obtidos em sucupira branca estão de acordo com as observações de George (1993 – 1996b) de que em algumas plantas a formação direta de gemas é induzida somente pela citocinina, e há inibição com adição de auxina.

Os segmentos nodais de sucupira branca foram inoculados em posição horizontal no meio de cultura, da mesma forma que McClelland e Smith (1990) fizeram com explantes de cinco espécie arbóreas e observaram que na posição

horizontal os explantes produziram mais gemas, maximizaram a formação de brotos por explante.

Vieitez et al., (1993), objetivando proliferação de gemas em explantes de origem adulto e de origem juvenil de carvalho (*Quercus rubra* L.), relataram que a colocação em posição horizontal proporcionou significativo aumento de gemas por explantes, em todos os três clones utilizados, e proporcionou gemas de maiores comprimentos. Similarmente, Perez-Parron, Gonzalez-Benito e Perez (1994) observaram que multibrotações em freixo (*Fraxinus angustifolia* Vahl de explantes adultos e juvenis tiveram altas taxas de multiplicação, principalmente no material adulto quando os segmentos nodais foram colocados horizontalmente.

Vieitez et al., (1994), em experimentos com *Quercus robur* L., arbórea com 70 a 300 anos de idade obtiveram proliferação de gemas através de inoculação de gemas apicais e segmentos nodais em meio GD (Gresshoff e Doy, 1972) suplementado com 0,89 μ M de BAP. Os explantes primeiramente foram colocados em posição vertical, nas subculturas seguintes, observaram que estavam reduzindo o número de brotos por cultivo, quando cultivaram os explantes em posição horizontal, ocorreu um aumento expressivo de brotações.

A inoculação dos segmentos nodais de sucupira branca em posição horizontal, muito provavelmente favoreceu a absorção dos reguladores de crescimento em toda a extensão do propágulo. Na posição horizontal houve redução de transporte de auxina fazendo com que ocorresse quebra da dominância apical.

A posição horizontal nos segmentos nodais remove a dominância apical, promove um crescimento sincronizado das gemas axilares, induz mais rapidamente a formação de brotos e proporciona a um maior número de gemas do que na posição vertical conforme George (1993c).

Os brotos provenientes dos aglomerados dos segmentos nodais de

sucupira branca foram isolados aos 20 dias em meio MS metade da concentração dos sais e suplementado com $5,0\mu\text{M}$ de BAP, após um mês obteve-se uma média de 5,4 brotos por cada broto inoculado (Figura 22).

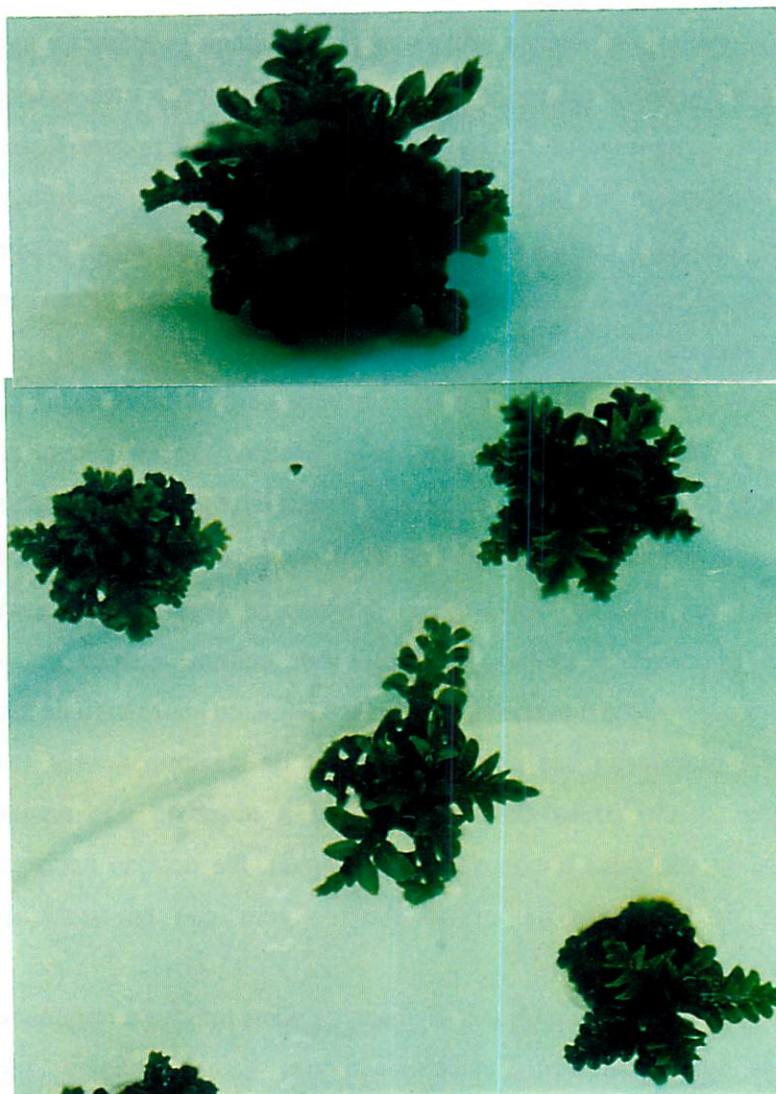


FIGURA 22: Multiplicação de brotos em meio com $5,0\mu\text{M}$ de BAP a partir do cultivo de broto isolado (30 dias).

5 CONCLUSÕES

- O cultivo do embriões apresenta plântulas “in vitro” com maior homogeneidade;
- O meio líquido favorece a rapidez de desenvolvimento dos embriões “in vitro”;
- Melhor suporte para germinação é: meio líquido, o ágar, o fitagel e ágar lavado respectivamente;
- A presença de luz é importante para evitar estiolamento;
- A tampa de papel alumínio tipo forminha de brigadeiro proporciona melhor desenvolvimento nas plântulas do que as tampas plásticas;
- o melhor meio básico para estabelecimento de de segmento nodais de sucupira branca foi o meio WPM;
- a concentração de 5,0 μM de BAP em segmentos nodais de sucupira branca proporcionou maior quantidade de aglomerados (multibrotações) em média de 3,2 aglomerados por segmento nodal;
- a concentração de 5,0 μM de BAP em segmentos nodais de sucupira branca proporcionou maior quantidade de brotos, média de 7,65 brotos por segmento nodal;
- a presença de calos nos segmentos nodais de sucupira branca foi diretamente proporcional a concentração de ANA, as maiores percentagens de calos apareceram nas concentrações de 3,0 e 5,0 μM ;
- não é recomendada a utilização de ANA para fins de obtenção de multibrotação em segmentos nodais de sucupira branca;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KHAYRI, J.M.; HUANG, F.H.; MORELOCK, T.E.; BUSHARAR, T.A. Spinach tissue culture improved with coconut water. *HortScience*, Alexandria v.27, n.4, p.357-358. 1992.
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.32, p.55-60. 1993.
- AMARAL, L.I.V.; PEREIRA, T.A. In vitro culture of forest trees. In: VASIL, J.K.; THORPE, T.A. (eds.) . *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht, 1994. cap.21, p.539-560.
- ANDRADE, A.C.S. de; LOUREIRO, M.B.; SOUZA, A.D. de O. & RAMOS, F.N. Quebra de dormência de sementes de Sucupira-preta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v.32, n.5, p.465-469, 1997.
- ANGOSTO TRILLO, T.; MATILLA CARRO, A. J. Germination, seed-coat structure and protein patterns of seeds from *Adenocarpus decorticans* and *Astragalus granatensis* growing at different altitudes. *Seed Science and Technology*. New Delhi - India. v. 21, p. 317-326. 1993.
- ÁQUILA, M.E.A. & FETT NETTO, A.G. Influência de processos de escarificação na germinação e crescimento inicial de *Leucaena leucocephala* (Lam.). De Wit. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, ano 10, n.1, p. 73-85. 1988.
- ARELLO, E.F. & PINTO, J.E.B.P. Propagação in vitro de *Kielmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.1, p.25-31, jan. 1993.

- ARRILLAGA, I.; MARZO, T.; SEGURA, J. Embryo culture of *Fraxinus ornus* and *Sorbus domestica* removes seed dormancy. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.4, p.371, apr. 1992.
- ASHUBURNER, G.R.; THOMPSON, W.K. & BURCH, J.M. Effect of α -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.35, p.157-163. 1993.
- ASSUMPCÃO, R.M.V. **Estudo químico de *Pterodon pubescens* e *Poecilanthe parviflora***. São Paulo: Universidade de São Paulo - Instituto de Química, 1972, 105p (Tese - Doutorado).
- ASSY-BAH, B. & ENGELMANN, F. Medium-term conservation of mature embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, p.19-24. 1993.
- ASSY-BAH, B.; DURAND-GASSELIN, T. & PANNETIER, C. Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.). **FAO/IBPGR Plant Genet. Res. Newsl.** v.71, p4-10. 1987.
- BALLARD, L. A. T. Physical barriers to germination. **Seed Science and Technology**. New Delhi – India, v.1, p. 285-303. 1973.
- BARBOSA, J.M.; BARBOSA, L.M.; PINTO, M.M.; AGUIAR, I.B. de. Efeito do substrato, temperatura e luminosidade na germinação de sementes de quaresmeira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, ano 10, n.3, p.69-77. 1988
- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M. & IGUE, T. Concentrações de 6-benzylaminopurina (BAP) na taxa de proliferação in vitro da macieira 'gala'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.5, p.747-751, mai. 1990.
- BARRADAS, M. M. & HANDRO, W. Algumas observações sobre a germinação da semente do barbatimão, *Stryphnodendron barbadetiman* (Vell.) Mart. (*Leguminosae* – *Mimosoideae*). **Boletim de Botânica**, São Paulo, v.2, p. 139-150. 1974.
- BARROS, M.A.G. Flora medicinal do Distrito Federal. **Revista Brasil Florestal**, Brasília, v.12, p.35-45. 1982.

- BARVE, D.M. & MEHTA, A.R. Clonal propagation of mature elite tree of *Commiphora wightii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.35, p.237-244. 1993.
- BERGER, K. & SCHAFFNER, W. In vitro propagation of the leguminous tree *Swartzia madagascariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.40, p.289-291. 1995.
- BHOJWANI, S.S.; & RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture theory and practice**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers. 1983.
- BIASI, L.A.; KOLLER, O.C. & KAMPF, A.N. Micropropagação do abacateiro "ouro verde" a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29.n.7, p.1051-1058, jul. 1994.
- BLACKMAN, S.A.; BROWN, K.L.; MANOLO, J.R.; ROOS, E.E. Embryo culture as a means to rescue deteriorated maize seeds. **Crop Science**, Madison, v.36, p.1693-1698, nov-dez. 1996.
- BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in forestry. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms**. 1ª edição. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishes, 1987c. 3º volume.
- BORGES, E. E. de L. & RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES – Comitê Técnico de Sementes Florestais. 1993. C. 3. P. 83-135.
- BRASIL - Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BURGOS, L. & LEDBETTER, C.A. Improved efficiency in apricot breeding: Effects of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.35, p.217-222. 1993.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos de plantas transformação genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, 1998. V.1, p.87-132.

- CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F.; DIAS JÚNIOR, M. Efeito da água de côco na germinação "in vitro" de sementes de pau-branco (*Auxemma oncocalyx* Taub.) In: RESUMOS DO VI CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, Belém, 1997. P.106.
- CAMPOS, P.S. & PAIS, M.S. In vitro micropropagation of the macaronesian evergreen tree *Persea indica* (L.) K, Spreng. In vitro Cellular Developmental Biology, Columbia, v.32, p.184-189, jul-sep. 1996.
- CANTOS, M.; CUERVA, J.; ZÁRATE, R.; TRONCOSO, A. Embryo rescue and development of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* and *macrocarpa*. Seed Science and Technology. New Delhi, v.52, p.177-181. 1998.
- CARVALHO, D. de. Micropropagação de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden através da cultura in vitro de segmentos nodais. Lavras:ESAL, 1988. 79p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 429 p.
- CARVALHO, R. de; FAVARETTO, N.; PINTO, J.E.B.P.; DESCHAMPS, C., INNECCO, R. Influência de fatores físicos no desempenho e crescimento "in vitro" de batata doce (*Ipomea batatas* (L.) Poir). Ciência e Prática, Lavras, v.19, n.2, p.158-164, abr./jun. 1995.
- CATALÁN, L.A. Laboratory germination conditions for seeds of *Prosopis flexuosa* D.C. and *P. chilensis* (Molina) Stuntz. Seed Science and Technology. New Delhi, v.20, p. 289-292. 1992.
- CATALÁN, L.A.; BALZARINI, M. Improved laboratory germination conditions for several arboreal *Prosopis* species: *P. chilensis*, *P. flexuosa*, *P. nigra*, *P. alba*, *P. caldenia* and *P. affinis*. Seed Science and Technology. New Delhi, v. 20, p. 293-298. 1992.
- CAVALCANTE, A. de M.B.; PEREZ, S.C.J.G. de A. Efeitos da escarificação química, luz e pH na germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* Lam. (De Wit). Revista Ceres, Viçosa, v.43, n.248, p.370-381. 1996.
- CERQUEIRA CONDE, R.C. Micropropagação de sucupira branca, *Pterodon pubescens*. In: ENCONTRO DE BOTÂNICOS DO CENTRO-OESTE, 1., 1991, Brasília. Resumos. Planaltina: EMBRAPA-CPAC/UnB. 1991, p.48.

- CHEE, R. & POOL, R.M. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of vitis. *Scientia Horti culturae*, Amsterdam, v. 32, p.85-95. 1987.
- CHEN, L.; HU, T. & HUANG, L. A protocol toward multiplication of the medicinal tree, *Eucommia ulmoides* Oliver. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, Columbia, v.31, p.193-198, oct. 1995.
- COHN, M.A. Chemical mechanisms of breaking seed dormancy. *Seed Science Research*, Wallingford, v.6, p. 95-99. 1996a.
- COHN, M.A. Operational and philosophical decisions in seed dormancy research. *Seed Science Research*, Wallingford v.6, p. 147-153. 1996b.
- CORSINI, C.A. Obtenção extensiva de mudas de faveiro (*Pterodon pubescens* - Benth). IIª Reunião Brasileira dos Cerrados. IPEACO - Sete Lagoas/MG. p.19. 1967.
- CRUZ, M.S.D.; PEREZ-URRIA, E.; MARTIN, L.; AVALOS, A. & VICENTE, C. Factors affecting germination of *Canavalia brasiliensis*, *Leucaena leucocephala*, *Clitoria ternatea* and *Calopogonium mucunoides* seeds. *Seed Science and Technology*, New Delhi, v.23, p.447-454. 1995.
- D'SILVA, I. & D'SOUZA, L. *In vitro* propagation of *Anacardium occidentale* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.29, p.1-6. 1992.
- DANTHU, P.; ROUSSEL, J.; DIA, M. & SARR, A. Effect of different pretreatments on the germination of *Acacia senegal* seeds. *Seed Science and Technology*, New Delhi - Índia, v.20, p.111-117. 1992.
- DAVEY, M.R.; KUMAR, V.; HAMMATT, N. *In vitro* culture of legumes. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (eds). *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht: Kluwe Academic Publishers. 1994. Cap.13, p.313-329.
- DEBERGH, P.C. Improving mass propagation of *in vitro* plantlets. In: **Organizing Committee of Int. Symp. High Technology in Protected Cultivation**. *Horticulture in high technological era: special lectures*. Tokyo, p.47-57, 1988.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.

- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C. and ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation. Technology and application.** Netherlands: 1991, p.1-13.
- DECLERCK, V. & KORBAN, S.S. Effects of source of macronutrientes and plant growth regulator concentrations on shoot proliferation of *Cornus florida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.38, p.57-60, 1994.
- DIAS, F. da L. **Estudo da genotoxicidade in vivo e in vitro dos cercaricidas naturais óleo de sucupira e cremantina em células de mamíferos.** Ribeirão Preto Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 1993. 105p. (Tese-Doutorado).
- DRIVER, J.A. & KUNYUKI, A.H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, Alexandria, v.19, p.507-509. 1984.
- DRUART, Ph; WULF, O. de. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.32, p.97-99. 1993.
- DUARTE, I.D.G.; FERREIRA-ALVES, D.L.; NAKAMURA - CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. **Life Sciences**, v.50, p.891-897. 1992.
- DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.40, p.231-235. 1995.
- DUNSTAN, D.I.; THORPE, T.A. Regeneration in forest trees. In: VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants. Plants Regeneration and genetic variability.** Florida: Academic Press, Incorporation. 1986. v.3, cap.11, p.223-241.
- EEUWENS, C.J. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro* **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 42, p. 173-178. 1978.

- EIRA, M. T. S.; FREITAS, R. W. A.; MELLO, C. M. C. Superação da dormência de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morang. – *Leguminosae*. *Revista Brasileira de Sementes*. Brasília, v.15, n. 2, p. 177-181. 1993.
- EMERSHAD, R.L. & RAMMING, D.W. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grown in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.37, p.55-59. 1994.
- FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de *Mimosa bimucronata*. (DC.) OK. (Maricá) – I. Efeito da escarificação e do pH. *Ciência e Cultura*, Santa Maria, v. 28, n. 10, p. 1200-1204, out. 1976.
- FERREIRA, A. G.; JOÃO, K. H. L.; HEUSER, E. D. Efeitos de escarificação sobre a germinação e do pH no crescimento de *Acacia bonariensis* Gill e *Mimosa bimucronata* (D. C.) O. K. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.4, n.1, p. 63-65. 1992.
- FOLEY, M. E.; FENNIMORE, S. A. Genetic basis for seed dormancy. *Seed Science Research*. Wallingford, v. 8, p. 173-182. 1998.
- FRANÇA, S.C.; DUARTE, I.B.; MORAES, R.M.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.42, p.291-293. 1995.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp.Cell Res.*, v.50, p.151-158. 1968.
- GEORGE, E.F. Plant growth regulators. In: GEORGE, E.F. (ed.). *Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology*. 2.ed. Edington:Exegetics, 1993a. Cap.11. p.420-479.
- GEORGE, E.F. Appropriate regulants and media. In: GEORGE, E.F. (ed.). *Plant propagation by tissue culture: part 2 In practice*. 2.ed. Edington:Exegetics, 1993/1996 b. Cap.12. p.575-638.
- GEORGE, E.F. Factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E.F. (ed.). *Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology*. 2.ed. Edington:Exegetics, 1993c. Cap.8. p.231-272.

- GHASHGHAIE, J.; BRECKMANN, F.; SAUGIER, B. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.82, p.73-78, jan. 1991.
- GIBA, Z.; GRUBISIC, D.; KONJEVIC, R. The effect of white light, growth regulators and temperature on the germination of blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) seeds. *Seed Science and Technology*, New Delhi, v.21, p.521-529. 1993.
- GIORGINI, J.F. & COMOLI, E. Effect of embryo and exogenous GA₃ on endospermic endo-β-mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.8,n.1, p.43-49. 1996.
- GONZALEZ-MELERO, J. A.; PEREZ-GARCIA, F.; MARTINEZ-LABORDE, J. B. Effect of temperature, scarification and gibberellic acid on the seed germination of three shrubby species of *Coronilla* L. (*Leguminosae*). *Seed Science and Technology*, New Delhi – India, v.25, p. 167-175. 1997.
- GOSLING, P.G.; SAMUEL, Y.K. & JONES, S.K. A systematic examination of germination temperature, chipping and water temperature/soak duration pretreatments on the seeds of *Leucaena leucocephala*. *Seed Science and Technology*, New Delhi, v.23, p.521-532. 1995.
- GRESSHOFF, P.M.; DOY, C.H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta*, New York, v.107, p.161-170. 1972.
- GURGEL FILHO, D.A. O faveiro: ensaio sobre a germinação e transplante. Secretaria da Agricultura Serviço Florestal do Estado. São Paulo: 34 publicação nº 2, 1947.
- HADRAMI, I. EL.; HOUSTI, F.; MICHAUS-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.P.; DÁUZAC, J. Effects of gelling agents and liquid medium on embryogenic potential, polyamines and enzymatic factors in browning in *Hevea brasiliensis* Calli. *Journal Plant Physiology*. Stuttgart, v.141,p.230-233, 1993.
- HAGON, M. W.; BALLARD, L. A. T. Reversibility of strophliolar permeability to water in seeds of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Aust. Journal Biology Science*. v.23, p. 519-528. 1969.

- HALLIDAY, J.; NAKAO, P. Technical note on the germination of leguminous tree seeds, *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.19, s/n, p. 231-234, jun. 1984.
- HARADA, H. & MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus nume*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.46, p.265-267. 1996.
- HARRY, I.S.; THORPE, T.A. In vitro culture of forest trees. In: VASIL, J.K.; THORPE, T.A. (eds). *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht, 1994. Cap.21, p.539-560.
- HERINGER, E.P. Flora micológica do Cerrado e suas implicações no ecossistema dessa Flora. *Revista Cerrado*, Brasília, nº 12. 1971.
- HERINGER, E.P.; FERREIRA, M.B. Sucupiras - O Gênero *Pterodon vogel*. *Revista Cerrado*, Brasília, ano V, nº 18, p.22-26. 1972.
- HU, C.Y. & FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.71-85.
- HUANG, F.H.; AL-KHAYRI, J.M. & GBUR, E.E. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, Columbia, v.30, p.70-74, jan. 1994.
- INFORME AGROPECUÁRIO. Cerrado: composição florística e potencialidade II. Belo Horizonte, v.16, n.173, 1992.
- JACKSON, M.B.; ABBOTT, A.J.; BELCHER, A.,R.; HALL, K.C.; BUTLER, R.; CAMERON, J. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Annals of Botany*, London, v.67, p.229-237, 1991.
- JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 11ª edição. São Paulo: Editora Nacional, 1993. 777p
- JOY, K.W. & FOLKES, B.F. The uptake of aminoacids and their incorporation into the proteins of excised barley embryos. *Journal Experimental Botany*, Oxford, v.16, p.646-666. 1965.

- KANNAN, V.R. & JASRAI, Y.T. Micropropagation of *Gmelina arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.269-271. 1996.
- KRISTIANSEN, K. Micropropagation of *Ficus benjamina* clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.28, p.53-58. 1992.
- LABOURIAU, L. G. A germinação das sementes. OEA: Washington, 1983. 174p.
- LAMEIRA, O.A. Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). Lavras:UFLA, 1997. 88p. (Tese de Doutorado em Fitotecnia).
- LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; CARDOSO, M. das G. Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.2, p. 189-192. 1997.
- LAURA, V.A.; ALVARENGA, A.A. de; ARRIGONI, M. de F. Effects of growth regulators, temperature, light, storage and other factors on the *Muntingia calabura* L. seed germination. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v.22, p.573-579. 1994.
- LAZARIDOU, T.B.; ROUPAKIAS, D.G. & ECONOMOU, A.S. Embryo rescue in *Vicia faba* and *Vicia narbonensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, p.297-301, 1993.
- LEDO, A. A. Produção de sementes, mudas e tratos culturais em essências para reflorestamento e arborização. Recife, PE, UFRPE, 1979. 113p.
- LEMO FILHO, J.P. de; GUERRA, S.T.M.; LOVATO, M.B.; SCOTTI, M.R.M.M.L. Germinação de sementes de *Senna macranthera*, *Senna multijuga* e *Stryphnodendron polyphyllum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.4, p.357-361, abr. 1997.
- LEVI, M.; BRUSA, P.; CHIATANTE, D. & SPARVOLI, E. Cell cycle reactivation in cultured pea embryo axes. Effect of abscisic acid. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.29, p.47-50, april. 1993.

- LEVI, M.; PASINI, E.; BRUSA, P.; CHIATANTE, D.; SGORBATI, S. & SPARVOLI, E. Culture of pea embryo axes for studies on the reactivation of the cell cycle at germination. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.28, p.20-24, January. 1992.
- LI, X.Y.; HUANG, F.H.; GBUR JR, E.E. Effect of basal medium, growth regulators and phytagel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v.17, p.298-301. 1998.
- LIMA, C.M.R. de; BORGHETTI, F. & SOUZA, M.V. de. Temperature and germination of the *Leguminosae Enterolobium contortisiliquum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasilia, v.9, n.2, p.97-102. 1997.
- LIMA, D. de & GARCIA, L.C. Avaliação de métodos para o teste de germinação em sementes de *Acacia mangium* Willd. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, n.2, p. 180-185. 1996.
- LININGTON, I. M. In vitro propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.27, p.81-88. 1991.
- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organica growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.18, p.100-127. 1965.
- LIU, N. Y.; KHATAMIAN, H.; FRETZ, T. A. Seed coat structure of three woody legume species after chemical and physical treatments to increase seed germination. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.5, p. 691-694. 1981.
- LLOYD, G. & McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceeding International Plant Propagators Society**. v.30, p.421-427. 1981.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 1ª ed. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum, 1992. 352p.

- MAENE, L.; DEBERGH, P. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.5, p.23-33, 1985.
- MALAVASI, M. de M. Germinação de sementes. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. **Manual de Análise de Sementes Florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. c.3. p.25-40.
- MANNING, J. C. & VAN STADEN, J. The functional differentiation of the testa in seed of *Indigofera parviflora* (Leguminosae: Papilionoideae). **Botanical Gazette**. Chicago, v.148, n. 1, p. 23-34. 1987.
- MARINO, G.; VENTURA, M. The influence of ethylene on in vitro rooting of GF 677 (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*) hybrid peach rootstock. In **Vitro Cellular Development Biology**, Columbia, v.33, p.26-29, jan.1997.
- MARTINS-LOUÇÃO, M.A.; DUARTE, P.J. & CRUZ, C. Phenological and physiological studies during carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germination. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v.24, p.33-47. 1996.
- MASCARENHAS, A.F.; KENDURKAR, S.V.; GUPTA, P.K.; KHUSPE, S.S.; AGRAWAL, D.C. Teak. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds). **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 1987. v.3, cap.23, p.300-315.
- MATHUR, J. & MUKUNTHAKUMAR, S. Micropropagation of *Bauhinia variegata* and *Parkinsonia aculeata* from nodal explant of mature trees. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.28, p.119-121. 1992.
- MATHUR, N.; RAMAWAT, K.G. & NANDWANI, D. Rapid in vitro multiplication of jujube through mature stem explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.43, p.75-77. 1995.
- McCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L. Vessel type, closure, and explant orientation influence in vitro performance of five wood species. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.7, p.787-800, 1990.
- McCOWN, B.H.; SELLMER, J.C. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in Forestry**. Dordrecht, 1982. V.1, cap.2, p.5-16.

- McKENTLY, A.H. Effect of genotype on somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.42, p.251-254. 1995.
- MELO, J.T. de; RIBEIRO, J.F.; & LIMA, V.L.G. de F. Germinação de sementes de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Sementes*, v.1, n.2, p.8-12. 1979.
- MELO, J.T. de; SILVA, J.A. da; TORRES, R.A. de A.; SILVEIRA, C.E. dos S. da; CALDAS, L.S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. de. (eds). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1998. 556p. Cap.V. p.195-231.
- MENSUALI-SODI, A.; PANIZZA, M.; TOGNONI, F. Quantification of ethylene losses in different container-seal system and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in cultured tissues. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.84,p.472-476, 1992.
- MILES, G.E. Robotic transplanting. In: Organising Committee. *Int. Symp. High Technology in Protected Cultivation (ed) Horticulture in high technology era*. Tokyo: 1988, p.75-86.
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D.P. Plant regeneration from in vitro culture of embryonic axis explants in common and topary beans. *Journal American Society Horticulture Science*, Alexandria, v.117, n.2, p.332-336. 1992.
- MONTEIRO, P.P.M.; RAMOS, F.A. Beneficiamento e quebra de dormência de sementes em cinco espécies florestais do cerrado. *Revista Árvore*, Viçosa, v.21, n.2, p.169-174. 1997.
- MOREL, G. La culture in vitro du meristeme apical. *Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales*. v. 27, p.307-314. 1964.
- MORS, W.B.; PELLEGRINO, J.; SANTOS FILHO, M.F. dos. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira branca, *Pterodon pubescens* Benth., contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Suplemento)*, Rio de Janeiro, v.38, p.325-330, dez. 1966.

- MOURA, I. & CARNEIRO, M.F.N. In vitro culture of immature embryos of *Howea forsteriana* Becc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.31, p. 207-209, 1992.
- MOURA-COSTA, P.H.; VIANA, AM.M.; & MANTELL, S.H. In vitro plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.35, p.279-286. 1993.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annu Rev Plant Physiol**. Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974a.
- MURASHIGE, T. Propagation through tissue culture. **Hort.Science**, Alexandria, v.9, p.2-3, 1974b.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with the bacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NORMAH, M.N.; NOR-AZZA, A.B.; ALIUDIN, R. Factors affecting in vitro shoot proliferation and ex vitro establishment of mangosteen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.43, p.291-294. 1995.
- OFFORD, C.A.; CAMPBELL, L.C. & MULLINS, M.G. Micropropagation of *Telopea speciosissima* R.Br. (Proteaceae). 1: Explant establishment and proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.215-221. 1992.
- PARRA, R. & AMO-MARCO, J.B. Factors affecting in vitro shoot proliferation of *Myrtus communis* L.: a comparison of adult and seedling material. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.34, p.104-107, apr-jun. 1998.
- PASQUAL, M. & BARROS, I. de. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos in vitro em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.7, p.1017-1019, jul. 1992.
- PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeito de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na proliferação e alongação de brotações micropropagadas em *Coffea arabica* L. "in vitro". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.26, n.2, p.201-204, fev. 1991.

- PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; RAMOS, J.D. Influência do GA₃ e do carvão ativado sobre o enraizamento in vitro de embriões de laranja 'Natal'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v.25, n.10, p.1477-1482, out. 1990.
- PASSOS, M.A.A.; LIMA, T.V. de. & ALBUQUERQUE, J. de L. Quebra de dormência em sementes de *Leucena*. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, ano 10, n.2, p. 97-102. 1988.
- PEREIRA-NETTO, A.B. In vitro propagation of *Hancornia speciosa*, a tropical fruit tree. In *Vitro Cellular Development Biology Plant*, Columbia, v.32, p.253-256, oct-dec.1996.
- PEREZ-PARRON, M.A.; GONZALEZ-BENITO, M.E. & PEREZ, C. Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.37, p.297-302. 1994.
- PIERIK, R.L.M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Tradução por Luís Ayerbe Mateo-Sagasta. 3ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p. cap.12, Tradução de: In vitro culture of higher plants.
- PIERIK, R.L.M.; OOSTERKAMP, J.; MANSCHOT, G.A.J.; BARTH, T.; SCHOLTEN, H.J. Agar brand, a dominating factor for shoot growth of juvenile and adult *Quercus robur* L. 'Fastigiata' in vitro. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, Rehovot, v.3, n.1, p.27-31, mar. 1997.
- PINTO, A.C.Q.; BYRNE, D.H. & ROGERS, S.M.D. Influence of ovule perforation, plant growth regulators, and α -glutamine on in vitro growth of immature peach embryos. In *Vitro Cellular Developmental Biology*, Columbia, v.29, p.55-58, apr. 1993.
- PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P. & BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação in vitro de brotos de *Kielmeyera coriacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.6. p.867-873, jun. 1994.
- PINTO, M.N. Caracterização geomorfológica. In: Pinto, M.N. (org.). *Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas*. 2ª edição. Brasília, Editora Universidade de Brasília, 1993. p.285-320.

- POPINIGIS, F. *Fisiologia da semente*. 2ª ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.
- PRASAD, P.; NAUTIYAL, A.R. Physiology of germination in *Bauhinia*: involvement of seed coat in inhibition of germination in *B. racemosa* Lam. seeds. *Seed Science and Technology*, New Delhi, v.24, p.305-308. 1996.
- PUGA, N.T.; NASS, L.L.; AZEVEDO, J.L. de. *Glossário de Biotecnologia Vegetal*. 1ª ed. São Paulo: Manole, 1991. 87p.
- QUOIRIN, M. & LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. *Acta Horticulture*, Lewven, v.78, p.442-473. 1977.
- QURAIISHI, A.; KOCHÉ, V. & MISHA, S.K. In vitro micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.45, p.87-91. 1996.
- QURAIISHI, A.; MISHRA, S.K. Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. *Plant Cell Reports*, New York, v.17, p.430-433, 1998.
- RADHAMANI, J.; MALIK, S.K.; CHANDEL, K.P.S. Seedcoat characteristics in relation to the physiology of seed germination in *Citrus* and its allied genus. *Seed Science and Technology*. New Delhi, v.19, p.611-621. 1991.
- RANCILLAC, M.; NOURISSEAU, J.G.; ROUDEILLAC, P. Influence de la multiplication in vitro sur le comportement du plant de fraisier en France. In: BOXUS, P.; LAVOR, P. *In vitro culture of strawberry plants*. CEC Directorate General, p.55-73. 1987.
- RAO, A.N.; LEE, S.K. Na overview of the in vitro propagation of woody plants and plantation crops. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications*. Nottingham: Butterworths, 1986. Cap.12, p.123-138.
- REIS, G.G. dos & RENA, A.B. Estudos sobre a dormência de sementes de sucupira (*Pterodon pubescens* Benth): Viabilidade, perda e absorção de água, respiração e presença de inibidores. *Revista Árvore*, Viçosa, v.11, n.2, p.105-118., jul/dez. 1987.

- REIS, G.G. dos. Estudos sobre a dormência de sementes de sucupira (*Pterodon pubescens* Benth). Viçosa: UFV, 1976. 41p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- REIS, G.G. dos; DRUNE, A. & RENA, A.B. Estudos sobre a dormência de sementes de sucupira (*Pterodon pubescens* Benth): tratamento para superação da dormência. *Revista Árvore*, Viçosa, v.9, n.1, p.49-57, jan/jul. 1985.
- RIBAS, L.L.F.; FOSSATI, L.C. & NOGUEIRA, A.C. Superação da dormência de sementes de *Minosa bimucronata* (d.C.) O. Kuntze (Maricá). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.18, n.1, p. 98-101. 1996.
- RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; OLIVEIRA JÚNIOR, A.F. de & CARVALHO, G.R. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo in vitro de embriões de laranjeira pêra. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.32, n.11, p.1147-1152, nov. 1997.
- RODRIGUES, E.H. de A.; AGUIAR, J.B. de & SADER, R. Quebra de dormência de sementes de três espécies do gênero *Cassia*. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, ano 12, n.2, p.17-27. 1990.
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autochaving effects. *American Journal of Botany*, Lancaster, U.S.A., v.58, n.2, p.131-140, fev. 1971.
- SANTARÉM, E.R. & ÁQUILA, M.E.A. Influência de métodos de superação de dormência e do armazenamento na germinação de sementes de *Senna macranthera* (Colladon) Irwin e Bameby (*Leguminosae*). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.17, n.2, p.205-209. 1995.
- SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: Chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports*, New York, v.17, p.230-235. 1998
- SCHUCH, M.W. & PETERS, J.A. Multiplicação in vitro de brotações de macieira cultivares marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh) e megumi (*Malus domestica*, Borkh). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.4, p.433-437, abr. 1993.

- SCOTT, M.A. Weaning of cultured plant. In: ALDERSON, P.G.; DULFORCE, W.M. (Eds.) **Micropropagation in horticulture: practice and commercial problem.** Proc.Univ. Nottingham, 1987, p.173-182.
- SENAWI, B.M.T. Evaluation of the difficulties in "in vitro"propagation of *Theobroma cacao* L. and *Cocos nucifera* L. Belgium: State Univ. Gent., 1985, 124 (tese Ph.D).
- SERRATO VALENTI, G.; MODENESI, P.; ROTI-MICHELOZZ, G.; BEVILACQUA, L. Structural and histochemical characters of the *Prosopis tamarugo* Phil seed coat, in relation to its hardness. *Acta Botanica Neerlandica.*, Netherlands, v.35, n.4, p. 475-487. 1986.
- SINGHA, S.; TOWNSEND, E.C. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured in vitro on varying concentrations of three commercial agars. *Journal American Society Horticultural Science*, Alexandria, v.110, n.3, p.407-411. 1985.
- SIQUEIRA, E.R. de., INOQUE, M.T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* Brasília, v.26, n.7, p.949-953, jul. 1991.
- SMITH, C.A.; BAILEY, C.H. & HOUGH, L.F. Methods for germinating seeds of some fruit species with special reference to growing seedlings from immature embryos. *N.J.Agr.Exp.Sta.Bul.* 823. 1969
- SOMMER, H.E.; WETZSTEIN, H.Y. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (eds). **Handbook of plant cell culture. Crop species.** New York: Macmillan Publishing Company. 1984. v.3, cap.19, p.511-540.
- SOUZA, R.P.; PEREIRA, M. de F.D.A. Interação de luz, GA₃ e estratificação na germinação de sementes de *Impatiens wallerana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.4, n.1, p.21-25. 1992.
- STEWART, J.M. & HSU, C.L. In ovule embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta*, Berlim, v.137, p.113-117. 1977.
- TEIXEIRA, J.B.; LEMOS, J.I.; COELHO, M.C.F. Micropropagação de espécies lenhosas da Mata Atlântica. In: RESUMOS DO V CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL. Lavras, 1995. P.132.

- THIAGARAJAN, M.; MURALI, P.M. Optimum conditions for embryo culture of *Azadirachta indica* (A. Juss). **Indian Forester**, Tamil Nadu, v. 120, n.6, p.500-503, Jun. 1994.
- TODD-BOCKARIE, A.H.; DURYEY, M.L.; WEST, S.H. & WHITE, T.L. Pretreatment to overcome seed coat dormency in *Cassia sieberiana*. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v.21, p.383-398. 1993.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA, CNPH, 1990. 433p.
- UPRETI, J. & DHAR, U. Study on seed germination of a leguminous liana - *Bauhinia vahlii* Wigh e Arnott. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v.25, p.187-194. 1997.
- VARELA, V.P.; BROCKI, E. & SÁ, S.T. de V. Tratamentos pré-germinativos de sementes de espécies florestais da Amazônia: IV. Faveira Camuzê - *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hoch *Leguminosae*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.13, n.2, p.87-90. 1991.
- VIEITEZ, A.M.; CONCEPCIÓN SÁNCHEZ, M.; AMO-MARCO, J.B.; BALLESTER, A. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.37, p.287-295. 1994.
- VIEITEZ, A.M.; FERRO, E.M.; BALLESTER, A. Micropropagation of *Fagus sylvatica* L. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.29, p.183-188, oct. 1993.
- VIEITEZ, A.M.; PINTOS, F.; SAN-JOSÉ, M.C.; BALLESTER, A. In vitro shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. **Tree Physiology**, Victoria, v.12, p.107-117, 1993.
- VOGELMANN, J.C.; BORNMAN, C.H.; NISSEN. Uptake of benzyladenine in explants of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, p.513-517, 1984.
- WATAD, A.A.; KOCHBA, M.; NISSIM, A.; GABA, V. Improvement of *Aconitum napellus* micropropagation by liquid culture on floating membrane rafts. **Plant Cell Reports**, New York, v.14, p.345-348. 1995.

WERBROUK, S.P.O.; DEBERGH, P.C. Applied aspects of plant regeneration. Micropropagation. In: **DIXON, R.A. e GONZALES, R.A.** **Plant Cell Cultura: a practical approach.** United States: The practical approach series 1994, p.127-135.

WHITE, P.R. **A Handbook of Plant Tissue Culture.** Jacques Cattell, Lancaster, P.A. 1943.