



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



VANIA CELENE ALECRIM CAMPOS

**MICROPROPAGAÇÃO de *Amburana cearensis*
(ALLEMÃO) A. C. SMITH.**

FEIRA DE SANTANA- BAHIA

2009

VANIA CELENE ALECRIM CAMPOS

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C.
SMITH.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RANIERE FERREIRA DE SANTANA (UEFS)

FEIRA DE SANTANA-BA
2009

Ficha catalográfica: Biblioteca Central Julieta Carteado

Campos, Vania Celene Alecrim

C218m Micropropagação de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith /
Vania Celene Alecrim Campos. – Feira de Santana - BA, 2009.
102 f. : il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)–
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira
de Santana, 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a) Orientador (a)
Orientador (a) e Presidente da Banca

Feira de Santana-BA

2009

Ao meu pai Aderno (*in
memoriam*), com todo o amor
que houver nessa (e em outra)
vida!!!!

DEDICO

À mainha, vovó Tercina, Gu, Rô e Jack
pelo amor dedicado a mim em todos os
momentos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ensinar a cada dia a ouvir o Seu “silêncio”.

À mainha, por me entender, aceitar e me dedicar tanto amor.

Ao meu irmão, Rodrigo, pelo respeito, admiração e amor recíproco.

Ao meu sobrinho, Gustavo, por encher a minha vida de alegria e muito amor. Titia te ama, mais do que tudo na vida dela.

A minha cunhada, Jaqueline, por me incentivar a estar sempre de bem com a vida.

À vovó Tercina, pela sabedoria e lucidez do alto dos seus quase 93 anos.

Ao meu orientador, Raniere, pela oportunidade, atenção e orientação.

À minha amiga Carol, principalmente por ter me ajudado durante a seleção para esse mestrado. Devo esta conquista a você.

À Alone, minha mãe científica, meu muito obrigada, pelo apoio, conversas, conselhos e incentivo.

Às minhas amigas Day, Tai, Cau, Line, Cindy e Kari pelos excelentes momentos de confidências e distração.

À minha amiga Dani, pela amizade sem limites.

Ao meu amigo Bruno “fofinho” por contribuir para que meus dias fossem mais alegres, quando estavam tristes.

À minha amiga-irmã Tati e meu “cunhado” Xande, pela excelente companhia nos finais de semana em SSA.

À minha amiga Ciane e família pelos bons momentos.

Ao meu amigo Luciano, você é meu exemplo.

À Mônica pela cumplicidade e amizade.

A Marcelo pelo incentivo e amizade.

Ao meu amigo Marco, você é o meu “guru”.

À minha prima-irmã Mércia, Reinaldo e Davi, pela amizade e respeito.

Ao meu tio Edgard e minha prima Emília pela acolhida inicial.

À Luana, você é especial.

À Ingrid, sua amizade, foi a minha maior e melhor conquista nesses anos de mestrado.

À Geisa pela pronta disponibilidade em me ajudar com a estatística.

À Cristina pela atenção e disponibilidade em sanar minhas dúvidas e claro pelas boas gargalhadas.

Aos estagiários do LCTV: Bruno, Tecla, Priscila, Mara, Martina, Fernando e Danilo pelos excelentes momentos compartilhados.

Aos meus colegas de turma, hoje amigos, Sônia, Fred, Ivana, Lorena, Nayra, ACM, Jenner e Aguinaldo.

Aos companheiros de Horto: Betinha, Dona Zezé, Dona Edna, Janilza, Alberto, Cíntia, Cimille, Emília, Sheila, Sandra e Ivanete pelos momentos compartilhados.

Aos professores Claudinéia, Juan Ayala, Gabriela, Raniere, Carlos Ledo e Sandra, pelos conhecimentos adquiridos nas disciplinas do RGV.

Aos colegas do EOB: Fátima Rebêlo, Almira, Ana Regina, Neuma, Augusto, Adelaide, Edelazil, Maria da Cruz, Dna. Edite, Dna. Loura, as Ritas, Naná, Léo, Leninha, Liliane, tia Jardelina e os outros, obrigada pelo incentivo e apoio.

Aos amigos do clube de corrida: Nay, Dreamer, Júpiter, Gervásio, Thiago, Eliene e os outros, pela companhia maravilhosa nos nossos treinos.

Ao Governo do Estado da Bahia pela concessão da licença.

Aos que torceram contra e que gostariam de puxar o meu “tapete”...vocês fortaleceram minha caminhada.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista, meu muito obrigada!

Aos que acima estão citados e aos que não citei, mas que de alguma forma marcaram a minha vida, nestes dois anos do mestrado, com um simples gesto, palavra ou olhar, o meu singelo, mas eterno agradecimento!!!!!!!!!!!!!!

“Agradecer é admitir que houve um minuto que se precisou de alguém.

Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente.”

(autor desconhecido)

"Cipó caboclo tá subindo na virola
Chegou a hora do pinheiro balançar
Sentir o cheiro do mato da **imburana**
Descansar morrer de sono na sombra da
barriguda
De nada vale tanto esforço do meu canto
Pra nosso espanto tanta mata haja vão matar
(...)

Quem hoje é vivo corre perigo
E os inimigos do verde da sombra, o ar
Que se respira e a clorofila
Das matas virgens destruídas vão lembrar
Que quando chegar a hora
É certo que não demora
Não chame Nossa Senhora
Só quem pode nos salvar é (...)"

Matança (Xangai/ Jatobá)

RESUMO

Amburana cearensis (imburana-de-cheiro, camuru), família Fabaceae–Papiolionoideae, é uma espécie arbórea que ocorre naturalmente na Caatinga. Esta espécie é bastante explorada devido às propriedades medicinais do seu caule e sementes, como também por sua utilização madeireira. A exploração extrativista de *A. cearensis* levou esta espécie para a lista de plantas em extinção. Neste contexto, a cultura de tecidos é uma ferramenta importante para a preservação e multiplicação de espécies nativas, pois possibilita a produção de um grande número de plantas a partir de um único indivíduo. O objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologias para multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*. Foram avaliados a influência de diferentes reguladores de crescimento (ANA, BAP e TDZ) sobre a morfogênese *in vitro* em diferentes tipos de explante (folíolo, segmento nodal, segmento internodal, gema apical e segmento cotiledonar). Na etapa do enraizamento foram testadas diferentes concentrações do regulador de crescimento AIB, na presença e ausência de 1g/L de carvão ativado. O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o WPM acrescido de 30g/L sacarose e 7g/L de Ágar e o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. O segmento cotiledonar foi considerado o melhor explante para a etapa da multiplicação. Dos reguladores de crescimento testados, o BAP na concentração $4,44 \mu\text{M}$ foi o que promoveu o maior número de brotos (2,36). Os explantes folíolo e segmento internodal não apresentaram capacidade organogênica. Os brotos enraizaram melhor na ausência de carvão ativado. O maior número de raiz foi observado em meio suplementado com $10 \mu\text{M}$ de AIB. A taxa de sobrevivência das mudas na aclimatização foi de 40%.

Palavras-chave: Imburana-de-cheiro; cultura de tecidos; organogênese; citocininas; enraizamento.

ABSTARCT

Amburana cearensis (imburana-de-cheiro, camuru), belonging to the family Fabaceae-Papiolionoideae is a naturally occurring tree species in Caatinga. It is under threat due to over exploitation of its valuable timber and the medicinal use of its stem and seeds. The exploitation of extractive *A. cearensis* led this species to the list of endangered plants. In this context, the plant tissue culture is an important tool for conservation and propagation of native species, it enables the production of a large number of plants from a single individual. The objective the present work was to establish for *in vitro* protocol to multiplication of *A. cearensis*. It were evaluated the influence of different plant growth regulators (NAA, BAP and TDZ) on *in vitro* morphogenesis and different types of explants (leaflet, nodal segment, internodal segment, apical bud and cotyledonary segment). In the rooting stage were tested different concentrations of growth regulator IBA in the presence and absence of 1 g / L activated charcoal. The culture medium used in all experiments was the WPM supplied with 30g / L sucrose and 7g / L agar and pH adjusted to 5.7 ± 0.1 before autoclaving. The segment cotyledonary explant was considered the best for the stage of multiplication. Of the growth regulators tested, in the BAP concentration was 4.44 μM which gave the highest number of shoots (2.36). The explants leaflet and internodal segment showed no organogenic capacity. The rooted shoots better in the absence of activated charcoal. The highest number of roots was observed in medium supplemented with 10 μM of IBA. The survival rate of seedlings in acclimatization was 40%.

Keywords: Imburana-de-cheiro, plant tissue culture, organogenesis, cytokinins, rooting.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	Caatinga	5
2.2	Família Fabaceae	6
2.3	Ocorrência e distribuição da <i>A. cearensis</i>	7
2.4	Descrição botânica da <i>A. cearensis</i>	7
2.5	Propriedades da <i>A. cearensis</i>	7
2.6	Cultura de Tecidos Vegetais	11
2.7	Micropropagação	13
2.7.1	Tipos de explante	14
2.7.2	Multiplicação	15
2.7.3	Enraizamento	15
2.7.4	Aclimatização	16
2.8	Reguladores Vegetais	17
2.9	Plantas lenhosas e micropropagação	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Local de realização dos experimentos	22
3.2	Material vegetal, assepsia e condições de cultivo	22
3.3	Meio de cultura e condições de cultivo <i>in vitro</i>	22
3.4	Estabelecimento <i>in vitro</i>	23
3.5	Multiplicação <i>in vitro</i>	24
3.5.1	Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftaleno acético (ANA) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	25
3.5.2	Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	25
3.5.3	Efeito da citocinina tidiazuron (TDZ) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	25
3.5.4	Efeito da idade do explante segmento cotiledonar na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	26
3.5.5	Influência do tipo de orientação e fragmentação do explante na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	26
3.6	Enraizamento <i>in vitro</i> de brotos micropropagados de <i>A. cearensis</i>	27
3.7	Aclimatização de plantas micropropagadas de <i>A. cearensis</i>	27
3.8	Análise Estatística	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	29
4.1.1	Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftaleno acético (ANA) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	29

4.1.2	Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	35
4.1.3	Efeito da citocinina tidiazuron (TDZ) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	45
4.1.4	Efeito da idade do explante segmento cotiledonar na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	52
4.1.5	Influência do tipo de orientação e fragmentação do explante na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	53
4.2	Enraizamento <i>in vitro</i> de brotos micropropagados de <i>A. cearensis</i>	56
4.3	Aclimatização de plantas micropropagadas de <i>A. cearensis</i>	63
5	CONCLUSÃO	65
6	REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa dos biomas brasileiros. Fonte: IBGE, 2009. Feira de Santana, 2009. 4
- Figura 2 Espécie em estudo. Exemplar de *A. cearensis* (A e B); Detalhe do caule (C e F); Ramo com flores (D); Sementes (E); Fruto tipo vagem (G); Detalhe da flor (H). Fonte: Lorenzi e Matos, 2008 (A, D, G e H); autora (C, E e F). Feira de Santana, 2009. 8
- Figura 3 Material vegetal e assepsia. Sementes de *A. cearensis* (A); Sementes imersas em água estéril (B); Material utilizado para desinfestação (C); Material utilizado para inoculação (D). Foto: autora. Feira de Santana, 2009. 23
- Figura 4 Exemplar de *A. cearensis* estabelecida in vitro (A), fora do tubo de ensaio (B) e explantes utilizados: gema apical (C), folíolo (D), segmento nodal (E), segmento internodal (F) e segmento cotiledonar (G). Foto: autora. Feira de Santana, 2009. 24
- Figura 5 Brotos oriundos do explante segmento nodal (A, B e C) inoculados em meio WPM, suplementado com 0 ANA e 8,88 μ M de BAP. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009. 30
- Figura 6 Número médio de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP e ausência de ANA. Feira de Santana, 2009. 31
- Figura 7 Explante folíolo de *A. cearensis* com raiz (A); calo e raiz (B); necrosada (C). Explante segmento internodal entumescido e oxidado (D). A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009. 34
- Figura 8 Número médio de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009. 36
- Figura 9 Brotos oriundos dos explantes segmento nodal (A), ápice caulinar (B) e segmento cotiledonar (C) inoculados em meio WPM sem BAP. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009. 37
- Figura 10 Brotos oriundos dos explantes segmento nodal (A), ápice caulinar (B) e segmento cotiledonar (C) inoculados em meio WPM suplementado com 4,44, 2,22 e 4,44 μ M de BAP, respectivamente. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009. 37
- Figura 11 Comprimento da parte aérea de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. 40

	Feira de Santana, 2009.	
Figura 12	Número de folhas de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (CA) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.	42
Figura 13	Matéria seca da parte aérea de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.	43
Figura 14	Porcentagem de explantes responsivos para emissão de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.	43
Figura 15	Explantes de <i>A. cearensis</i> . Rizogênese (A); Calogênese (B); Detalhe da calogênese e clorose (C). A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.	44
Figura 16	Número médio de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.	46
Figura 17	Brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com 1 μ M de TDZ. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.	46
Figura 18	Número médio de folhas obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.	48
Figura 19	Comprimento da parte aérea de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.	48
Figura 20	Matéria seca da parte aérea obtida a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.	49
Figura 21	Porcentagem de explantes responsivos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de	50

	Santana, 2009.	
Figura 22	Explante folíolo inoculado em meio 0,0 TDZ (A); 1,0 μ M TDZ (B); 2,0 μ M TDZ (C) e 3,0 μ M TDZ (D). A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.	51
Figura 23	Número de brotos enraizados de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.	58
Figura 24	Porcentagem de brotos enraizados de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.	58
Figura 25	Número de raiz por broto de <i>A. cearensis</i> inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.	59
Figura 26	Brotos em meio de enraizamento (WPM + AIB + carvão ativado). (A) AIB 0,0 μ M (A); (B) AIB 2,5 μ M ; (C) AIB 5,0 μ M e (D) AIB 10,0 μ M. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.	60
Figura 27	Brotos em meio de enraizamento (WPM + AIB). (A) AIB 0,0 μ M; (B) AIB 2,5 μ M; (C) AIB 5,0 μ M e (D) AIB 10,0 μ M. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.	60
Figura 28	Comprimento da raiz por broto de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.	61
Figura 29	Matéria seca da raiz por broto de <i>A. cearensis</i> , inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.	62
Figura 30	Planta de <i>A. cearensis</i> micropropagada <i>in vitro</i> (A) e mudas micropropagadas de <i>A. cearensis</i> em substrato (terra vegetal+vermiculita) (B e C) com 30 dias. A barra representa 1 cm. Feira de Santana, 2009.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA) em relação às diferentes concentrações de ANA e BAP e tipos de explante. Feira de Santana, 2009.	29
Tabela 2	Médias para a variável número de brotos e matéria seca da parte aérea oriundos do explantes folíolo (FO), segmento nodal (SN) e segmento internodal (SI) em função das diferentes concentrações de ANA. Feira de Santana, 2009.	32
Tabela 3	Médias para número de folhas e comprimento da parte aérea oriundos dos explantes folíolo (FO), segmento nodal (SN) e segmento internodal (SI). Feira de Santana, 2009.	33
Tabela 4	Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e porcentagem de explantes responsivos (%ER) em relação às diferentes concentrações de BAP e tipos de explante. Feira de Santana, 2009.	35
Tabela 5	Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e porcentagem de explantes responsivos (%ER) em relação às diferentes concentrações de TDZ e tipos de explante. Feira de Santana, 2009.	45
Tabela 6	Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) em função da idade do explante segmento cotiledonar quando inoculado em meio WPM suplementado com 4,44 μ M BAP. Feira de Santana, 2009.	52
Tabela 7	Médias para a variável número de brotos por explante, em relação a idade do explante segmento cotiledonar inoculado em meio WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP. Feira de Santana, 2009.	53
Tabela 8	Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) em relação a orientação (O) e fragmentação (F) do explante segmento cotiledonar quando inoculado em meio WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP. Feira de Santana, 2009.	54
Tabela 9	Médias para as variáveis número de brotos por explante (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA) em função da fragmentação do explante segmento cotiledonar inoculado em meio de	54

	cultura WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP. Feira de Santana, 2009.	
Tabela 10	Médias para as variáveis número de brotos por explante (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA) em relação a orientação do explante segmento cotiledonar inoculado em meio de cultura WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP . Feira de Santana, 2009.	55
Tabela 11	Médias para a variável número de folhas por broto, em função da orientação e da fragmentação do explante segmento cotiledonar inoculado em meio de cultura WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP. Feira de Santana, 2009.	55
Tabela 12	Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes com raiz (%ER), número de brotos enraizados (BE), número de raiz (NR), comprimento da raiz (CR) e matéria seca da raiz (MSR) em relação às diferentes concentrações de AIB e presença ou ausência de carvão ativado (CA). Feira de Santana, 2009.	56

1 INTRODUÇÃO

A degradação ambiental do Semiárido é o resultado de centenas de anos da utilização dos recursos naturais de forma inadequada e descontrolada. A má utilização desses recursos está associada à falta de conhecimento científico sobre a caracterização e funcionamento da biota desse ecossistema (QUEIROZ et al., 2006). O Semiárido reúne informações vegetacionais complexas referentes à Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (GIULIETTI et al., 2004).

A vegetação da Caatinga é constituída, especialmente, de espécies lenhosas e herbáceas e a família que possui maior representatividade neste bioma é a Leguminosae, com cerca de 278 espécies, que corresponde a 18,4% do total de espécies descritas para essa região (QUEIROZ et al., 2006). Dentre as espécies das leguminosas, *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith, conhecida popularmente como imburana de cheiro, cumaru e amburana de cheiro, possui ampla distribuição no Brasil, ocorrendo no Norte, Nordeste e Centro-Oeste (MAIA, 2006; LEAL, 2006).

Esta espécie destaca-se devido a sua multiplicidade de usos, tais como forrageiro, alimentar, madeireiro, medicinal e cultural. Apresenta elevado valor comercial, devido às qualidades de sua madeira, e seu uso como planta medicinal, sendo explorada de forma extrativista, o que ocasionou sua inserção na lista de espécies consideradas em extinção. Outro problema relacionado com seu extrativismo é a coleta desordenada das sementes para fins comerciais, contribuindo para a redução significativa das populações, uma vez que impede a propagação natural da espécie, a qual é feita principalmente por sementes. Este é o principal fato que colabora para o processo de extinção da amburana (CARVALHO, 1994; HILTON-TAYLOR, 2000; IUCN, 2005; LEITE, 2005; MAIA, 2006; MMA, 2008). Dessa forma, considerando-se sua importância econômica e ecológica devem-se priorizar ações relativas à sua conservação *in vitro* e *in situ* o que acarreta na necessidade de determinar técnicas alternativas de propagação e conservação da *A. cearensis*.

Dentre essas técnicas encontra-se a cultura de tecidos vegetais que pode ser utilizada para a conservação e multiplicação de espécies que apresentam dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação, além das espécies com

interesse comercial e que são exploradas de forma irracional (SABÁ et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; RAJESWARI; PALIWAL, 2006; ZHU et al. 2007). De maneira simplificada, pode-se dizer que este ramo da biotecnologia compreende um conjunto de técnicas em que pequenos fragmentos de tecido vivo denominados explantes são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, em meio de cultura apropriado e incubado em condições ambientais controladas (AMARAL; SILVA, 2003; SANTANA et al., 2006).

A aplicação mais prática da cultura de tecidos, no que se refere ao potencial para a agricultura, é a micropropagação ou propagação *in vitro*. Esta técnica consiste na multiplicação e produção de novas plantas a partir de um único indivíduo e pode servir como estratégia para a conservação de espécies nativas ameaçadas e para estabelecer matrizes para a produção de sementes, bem como para a produção de mudas em larga escala (ROUT, 2005; ROCHA et al., 2007; GUO; LIU, 2007; PRATHANTURARUG et al.,2007). Uma via de regeneração muito utilizada em cultura de tecidos de plantas lenhosas é a organogênese direta, pois possibilita a obtenção de indivíduos com características comerciais desejáveis em um período relativamente curto de tempo e com uma alta taxa de multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PERES, 2002; SCHOENE; YEAGER, 2005).

Neste contexto, a micropropagação além de possibilitar a rápida propagação de uma espécie, dá suporte a outras técnicas de biotecnologia vegetal, disponibilizando conhecimentos científicos que possam direcionar o manejo das espécies da Caatinga, bioma que é exclusivamente brasileiro e exhibe sérios problemas de conservação (ALBUQUERQUE, 2005).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo para micropropagação de plantas de *A. cearensis* através da indução de brotos adventícios em explantes derivados de plântulas estabelecidas *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caatinga

O Semiárido abrange uma área extensa da região do Nordeste do Brasil, com aproximadamente 900.000km², e uma ampla diversidade fisionômica e florística, decorrentes da significativa variação de solos, clima e relevo (QUEIROZ et al., 2006). Esta região reúne informações vegetacionais pertencentes à Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (GIULIETTI et al., 2004). Ocupando quase 11% do território nacional, cerca de 800 mil Km², a Caatinga é o principal ecossistema da Região Nordeste (Figura 1). Abrange os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, sul e leste do Piauí e norte de Minas Gerais (WWF, 2009; IBAMA, 2009).

No idioma tupi, Caatinga significa Mata Branca, uma analogia à vegetação sem folhas e aos troncos esbranquiçados e brilhantes que predominam nesse bioma ecossistema durante a época de seca (PRADO, 2003). Este bioma apresenta clima semiárido, solo raso e pedregoso, índices pluviométricos que variam de 300 a 800 milímetros/ano e altas temperaturas (médias entre 25 e 29^o C). Entretanto, o aspecto agressivo da vegetação contrasta com o colorido diversificado das flores emergentes no período de chuvas (WWF, 2009).

Cerca de 27 milhões de brasileiros vivem hoje na região coberta pela Caatinga. Essa ocupação vem desde os tempos do Brasil-Colônia, quando iniciou-se a exploração extrativista dos recursos naturais desse bioma. Segundo estimativas, aproximadamente 70% da área da Caatinga já se encontram alterados por ação antrópica e apenas 0,28% de sua área encontra-se protegida em unidades e parques de conservação (WWF, 2009; IBAMA, 2009).

A Caatinga é o único ecossistema exclusivamente brasileiro composto por um mosaico de florestas sazonalmente secas e arbustos espinhosos (SILVA; TABARELLI, 2003; LEAL et al., 2005). No passado, a biota da Caatinga foi interpretada como pobre, com poucas espécies endêmicas e, portanto, de baixa prioridade para conservação. No entanto, a descrição recente de inúmeras espécies de animais e plantas endêmicas para a região, indica que o

conhecimento zoológico e botânico da mesma era bastante precário (CASTELLETTI et al., 2004).



Figura 1. Mapa dos biomas brasileiros. Fonte: IBGE, 2009. Feira de Santana, 2009.

A vegetação da Caatinga, embora tenha sido considerada degradada, apresenta flora relativamente rica, pouco conhecida e com endemismos e está representada por mais de 1500 espécies (GIULIETTI et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006). Por isso, pode-se dizer que este é um bioma rico em recursos genéticos, além do fato de suas espécies apresentarem características fisiológicas que refletem adaptações complexas e peculiares às condições ambientais únicas (TROVÃO et al., 2007).

Essa desvalorização do conhecimento botânico da Caatinga é decorrente da crença injustificada de que esse bioma seria o resultado de modificações de outras formações vegetacionais, bem como da antropização desse bioma e de o julgarem com baixa diversidade vegetal e sem espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2004). Contudo, mesmo estando significativamente alterada, a Caatinga apresenta uma grande variedade de tipos vegetacionais, com elevado número de espécies e também remanescentes de vegetação ainda bem preservada, que incluem um número expressivo de táxons raros e endêmicos (GIULIETTI et al., 2004; MMA, 2008).

A flora nativa desta região tem importância indiscutível, devido a sua multiplicidade de usos, tais como energético, forrageiro, alimentar, medicinal, madeireiro e artesanal, assim como, para o equilíbrio ecológico. A exploração essencialmente extrativista exercida neste ecossistema, tem relação direta com o grau de utilidade das espécies, que resulta em problemas graves para as mais procuradas. Logo, é indispensável a realização de estudos básicos sobre as espécies que compõem este complexo vegetacional, de modo a ampliar o conhecimento sobre as mesmas (FELIX, 2007) com o propósito de estabelecer estratégias de conservação.

2.2 Família Fabaceae

A família com maior representatividade na Caatinga é a Fabaceae (Leguminosae), com cerca de 278 espécies, correspondendo a 18,4% do total de descritas para essa região. Os representantes da família Fabaceae caracterizam-se por hábitos variados desde ervas até subarbustos, arbustos, árvores ou lianas e estão presentes em diferentes formações vegetacionais (ANDRADE, 2008). De ampla distribuição no mundo, compreende cerca de 900 gêneros e 19.000 espécies e é subdividida em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae ou Faboideae (QUEIROZ et al., 2006).

Faboideae, com cerca de 400 gêneros, é a subfamília com maior representatividade (JOLY, 1998) e, por isso, é mais amplamente distribuída, ocorrendo desde florestas úmidas até desertos secos e frios (ANDRADE, 2008). Os seus representantes ocorrem preferencialmente em regiões temperadas, onde

se encontram a maioria das espécies herbáceas e em regiões tropicais, onde as plantas lenhosas são mais bem representadas (BARROSO, 1991).

2.3 Ocorrência e distribuição da *A. cearensis*

A. cearensis, subfamília Faboideae é conhecida popularmente no Brasil como amburana-de-cheiro, agelim, baru, cerejera-rajada, cumaru, cumaru-das-caatingas, cumaru-de-cheiro, camuru-do-ceará, cumaré cabocla, cerejeira, imburana, imburana-de-cheiro e umburana (CARVALHO, 1994; LORENZI; MATOS, 2002; MAIA, 2006; LORENZI; MATOS, 2008). Na Argentina é conhecida como roble criollo, na Bolívia, tumi, no Paraguai, palo trébol e, no Peru, ishpingo (MAIA, 2006).

A ocorrência dessa espécie abrange o norte da Argentina, Nordeste do Paraguai, Sul da Bolívia e Nordeste do Peru (CARVALHO, 1994; SALIS; CRISPIM, 2006; MAIA 2006). No Brasil, apresenta ampla distribuição e ocorre desde o Norte, Nordeste e Centro-Oeste, mais especificamente na Caatinga, até a floresta pluvial do Vale do Rio Doce e também em afloramentos calcáreos e matas decíduas do Sudeste do Brasil. No sudeste da região Amazônica, ocorre uma espécie com características muito próximas - *Amburana acreana* (Ducke) (LORENZI; MATOS, 2002; IPEF, 2009).

A. cearensis é considerada uma espécie pioneira, comum na vegetação secundária e apresenta certa plasticidade quanto aos solos. Prefere os solos franco e argilo-arenosos e profundos nas meias encostas da Caatinga, embora apresente comportamento satisfatório em solos férteis, bem como drenados e com textura argilosa (CARVALHO, 1994; MAIA, 2006).

Contudo, *A. cearensis* raramente forma populações densas em ambientes florestais, sendo encontrada normalmente compondo a vegetação de fazendas. Além disso, parece existir uma variabilidade genética na espécie, embora não tenha sido ainda definido em que pontos ocorrem tais diferenças (LEITE, 2005).

2.4 Descrição Botânica da *Amburana cearensis*

A. cearensis apresenta-se como uma árvore frondosa, podendo atingir até 20 m de altura (Figura 2). O súber do caule dessa espécie é liso, variando do amarelo-avermelhado ou vermelho-pardacento, soltando lâminas finas irregulares, ritidoma esfoliativo que se desprende em finas lâminas delgadas. Internamente a casca é amarelada, fibrosa, com aspecto gorduroso, de gosto amargo e forte odor de cumarina (CUNHA; FERREIRA, 2003; RAMOS et al., 2004; LEAL, 2006; MAIA, 2006; CANUTO; SILVEIRA, 2006 LORENZI; MATOS, 2008).

Suas folhas são compostas pinadas com folíolos pequenos, ovados e com ápice não agudo. As flores são branco-amareladas, muito aromáticas e formam ráculos. O fruto é uma vagem de deiscência longitudinal, achatada, escura por fora, amarela e lisa por dentro contendo uma semente (MAIA, 2006; LEAL, 2006; LORENZI; MATOS; 2008). A semente é achatada, rugosa, preta, alada e exala forte cheiro de cumarina e de sabor amargo e picante (RAMOS et al., 2004; MAIA, 2006).

A raiz da planta jovem desenvolve um tubérculo carnoso e vermelho onde provavelmente armazena água para sobreviver às adversidades do clima da Caatinga (CUNHA; FERREIRA, 2003; RAMOS et al., 2004; MAIA, 2006). Essa adaptação fisiológica possibilita o entendimento de como espécies vegetais conseguem se estabelecer em ambientes muitas vezes considerados como inhóspitos e inviáveis à sobrevivência (TROVÃO et al., 2007).

2.5 Propriedades da *A. cearensis*

A. cearensis apresenta elevado valor comercial devido à excelente qualidade de sua madeira, denominada cerejeira, que é explorada de forma extrativista. É muito utilizada na marcenaria em geral, na confecção de portas, janelas, caixotaria, taboados, balcões, esculturas e, especialmente móveis, por ser refratária ao ataque de insetos e ter reconhecida durabilidade (CUNHA; FERREIRA, 2003; RAMOS et al., 2004; MAIA, 2006; CANUTO; SILVEIRA, 2006). Além disso, extratos em pó da madeira, tem potencial aplicação como agente de envelhecimento em aguardentes (AQUINO et al., 2005).

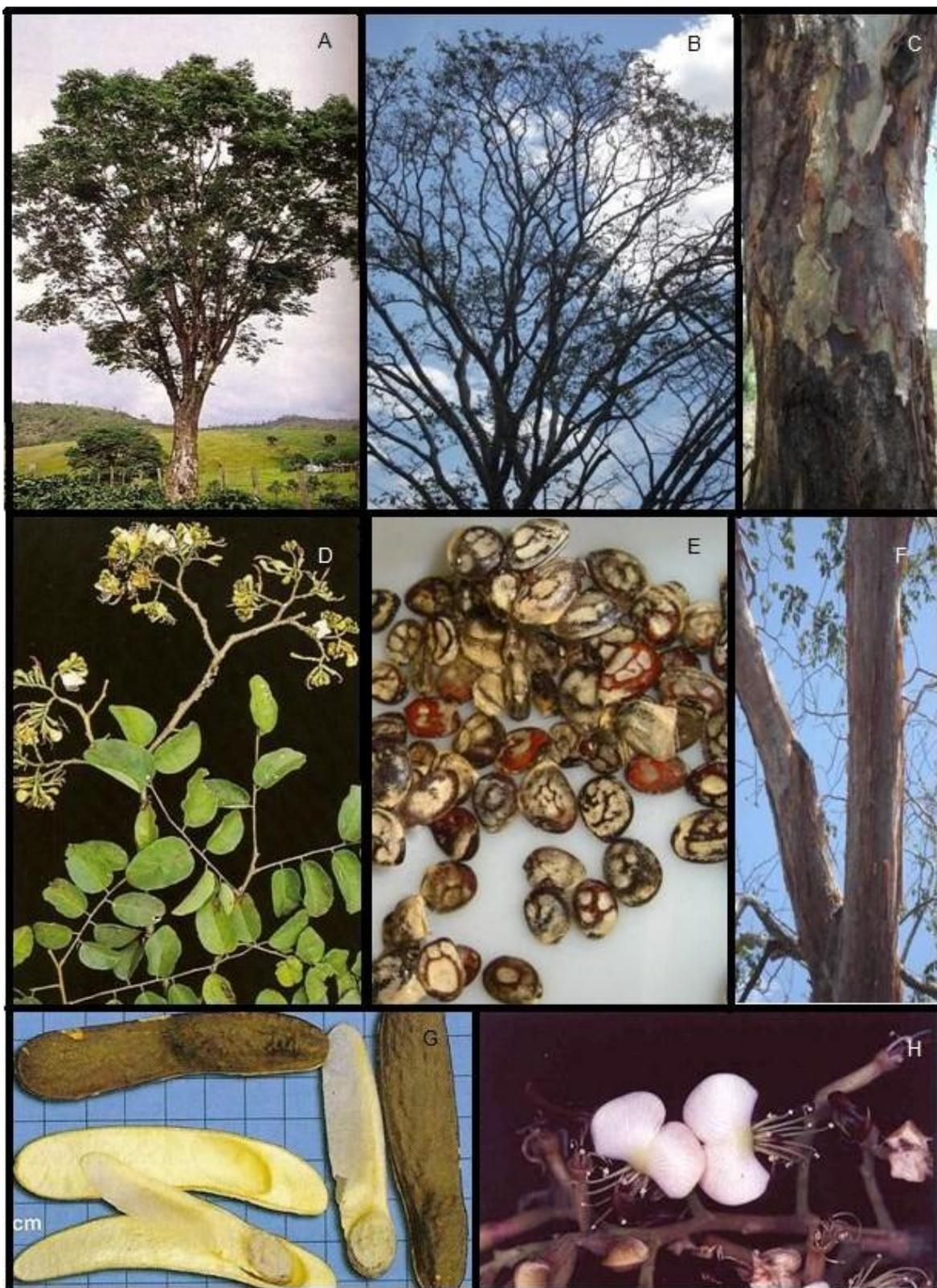


Figura 2. Espécie em estudo. Exemplar de *A. cearensis* (A e B); Detalhe do caule (C e F); Ramo com flores (D); Sementes (E); Fruto tipo vagem (G); Detalhe da flor (H). Fonte: Lorenzi; Matos, 2008 (A, D, G e H); autora (C, E e F). Feira de Santana, 2009.

Além da utilização de sua madeira em movelaria fina, esculturas e marcenaria em geral, as sementes e a casca da árvore apresentam propriedades medicinais (CUNHA; FERREIRA, 2003; RAMOS et al., 2004; MAIA, 2006). Existe ainda, uma importância cultural, pois, é bastante antiga a inclusão desta planta na cultura indígena e habitantes do nordeste (MAIA, 2006).

Índios kariri-shoko e shoko, mastigam a casca para aliviar dores de cabeça e tomam chás para cólicas menstruais (MAIA, 2006). As sementes e a casca do caule são amplamente utilizadas na medicina popular como antiespasmódicos, emenagogas, e para o tratamento de afecções pulmonares, coqueluche, doenças reumáticas, sinusite, asma e gripe. O uso medicinal da casca e sementes pode ser em forma de cozimento, xarope, maceração, lambedor e como “rapé” (aspiração) para descongestionar as vias nasais. (CUNHA; FERREIRA, 2003; RAMOS et al., 2004; MAIA, 2006; CANUTO; SILVEIRA, 2006; MANO, 2006; LEAL, 2006). As sementes servem como aromatizantes e repelentes de insetos para roupas e estantes (CUNHA; FERREIRA, 2003; CANUTO; SILVEIRA, 2006). Outras utilizações da planta podem ser na recuperação de solos e restauração de áreas degradadas, em sistemas agroflorestais, para forragem e como planta ornamental (MAIA, 2006).

Na indústria existe disponível o xarope de amburana-de-cheiro produzido pelo Programa Farmácias Vivas, Farmácia-Escola/ UFC e por algumas empresas privadas, em que o principal componente químico é a cumarina (CANUTO; SILVEIRA, 2006). A cumarina tem aplicação também na indústria alimentícia, de cigarros e de perfumes e na fabricação de sabões e sabonetes (MAIA, 2006; LEAL, 2006).

Além da cumarina, dados recentes da literatura, apontam para a existência de outras substâncias químicas presentes na casca de *A. cearensis*. Negri et al. (2004), por exemplo, isolaram e identificaram a partir de extratos da casca do caule dessa espécie, além da cumarina, fenilpropanóides, antraquinonas, terpenóides, esteróides e substâncias alifáticas, todas com comprovada importância medicinal. Já Canuto & Silveira (2006), isolaram 12 constituintes químicos do extrato etanólico da casca do caule dessa espécie. Dessas, a cumarina e o isocampferídio demonstraram excelente atividade antiinflamatória. O

isocampferídio juntamente com o campferol, exibiram significativa atividade citotóxica *in vitro*, contra linhagens de células tumorais leucêmicas humanas, células cancerosas de mama, pele e cólon. Além disso, extratos da casca do caule de *A. cearensis* inibem a atividade da acetilcolinesterase, o que torna esta planta forte candidata a um fármaco útil no tratamento da doença de Alzheimer (TREVISAN; MACÊDO, 2003).

Entretanto, o conhecimento popular sobre as propriedades das sementes de amburana-de-cheiro leva muitas pessoas a coletarem as sementes para fins comerciais, o que é observado principalmente em feiras livres. Esta coleta contínua das sementes contribui para a significativa redução de populações de ocorrência natural, pois impede a propagação natural da espécie, contribuindo dessa maneira para o processo de extinção.

A importância de *A. cearensis* é indiscutível, devido a sua multiplicidade de usos, tais como forrageiro, alimentar, madeireiro, medicinal e cultural. Entretanto, esta espécie, sofre com a exploração extrativista da sua madeira, uma vez que a planta não rebrota depois de cortada (CARVALHO, 1994; MAIA, 2006), e com a coleta indiscriminada de suas sementes. Além disso, é uma espécie que se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção (HILTON-TAYLOR, 2000; IUCN, 2005; LEITE, 2005; MMA, 2008). Esses aspectos aumentam a necessidade de técnicas alternativas de propagação (RAMOS et al., 2004; MAIA 2006). Portanto, em função do seu valor econômico e ecológico devem-se priorizar ações relativas à conservação *in vitro* e *in situ* desta espécie.

Dados sobre germinação, constituintes químicos, utilização na medicina popular de *A. cearensis*, são amplamente encontrados na literatura. Contudo, não há informações sobre trabalhos com multiplicação e regeneração *in vitro* dessa espécie. Por isso, estudos mais aprofundados sobre ecofisiologia, germinação e propagação por vias alternativas, para o estabelecimento de protocolos que permitam a utilização de espécies nativas em programas de recuperação de áreas degradadas, bem como para plantios comerciais são relevantes (CUNHA; FERREIRA, 2003, RAMOS et al., 2004; MAIA, 2006).

2.6 Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais envolve um conjunto de técnicas, em que explantes (partes isoladas de uma planta, tais como células, tecidos, órgãos ou protoplastos) são cultivados em condições assépticas e controladas, por período indeterminado, em meios nutritivos artificiais (OLIVEIRA, 2000; MROGINSKI et al., 2004; CYSNE, 2006;). É uma abordagem biotecnológica que permite o desenvolvimento de protocolos de laboratório para regenerar plantas intactas e férteis e, desse modo, controlar o processo da morfogênese (GIRI et al., 2004).

O pilar da cultura de tecidos vegetais está firmado no princípio da totipotência celular descrita por Haberlandt no início do século XX, que é a base teórica sobre as quais se sustentam todas as técnicas do cultivo *in vitro* (BARRUETO CID, 2001). Assim, segundo o fenômeno da totipotência das células somáticas vegetais, qualquer célula vegetal viva, possui informação genética suficiente para produzir uma planta completa, com todas as características e funções orgânicas da planta original, desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais adequadas (TORRES et al., 1998; KERBAUY, 1999).

As células cultivadas *in vitro* podem manifestar sua totipotência seguindo duas rotas alternativas: organogênese, que conduz a diferenciação dos meristemas em órgãos, e embriogênese somática, que conduz o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PERES, 2002).

Os eventos organogênicos ocorrem mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular, dependendo da retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas ou em um tecido calogênico desorganizado (ALVES et al., 2004). Dessa forma, durante a organogênese *in vitro*, células e tecidos vegetais passam por estádios de desenvolvimento distintos tais como competência morfogenética, determinação do desenvolvimento após aplicação exógena dos reguladores vegetais, e diferenciação morfológica (HICKS, 1994). No caso do explante já possuir células meristemáticas, ocorrerá a organogênese direta, apresentando alta fidelidade genética. Quando há necessidade de desdiferenciação do explante com a consequente formação de calo antes do estabelecimento das células competentes, ocorrerá a organogênese indireta

(GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PERES, 2002). A via organogênica direta é a mais recomendada para a micropropagação de plantas lenhosas como a amburana, por originar plantas geneticamente mais estáveis (SORAES, 2007).

A propagação via organogênese tem sido apontada como uma alternativa potencialmente viável para a produção de mudas, dado a possibilidade de se obter por esse processo altas taxas de multiplicação a partir de um único indivíduo. O desenvolvimento de uma metodologia de propagação por organogênese representa uma excelente ferramenta para trabalhos de regeneração de plantas manipuladas geneticamente (VANEGAS et al., 2002) e para estudos do mecanismo regulatório do desenvolvimento das plantas (HICKS, 1994). Além disso, a possibilidade de variação somaclonal durante a organogênese indireta pode ser apontada como uma vantagem quando se pretende aumentar a base genética das espécies para utilização em programas de melhoramento (RIBAS et al., 2005).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais tem prestado grandes contribuições aos estudos de biologia básica (fisiologia, bioquímica, histologia), embriogênese, genética e melhoramento, bem como na produção de metabólitos de interesse e também na obtenção de plantas resistentes a fatores adversos como pragas e doenças (TORRES et al., 1998; OLIVEIRA, 2000; SOUZA et al., 2006).

No decorrer dos últimos anos houve um maior interesse nas técnicas de cultura de tecidos. Estas são eficazes principalmente na propagação de várias espécies, sendo, sobretudo importante para aquelas que se encontram em risco de extinção (OLIVEIRA, 2000; HUBNER et al., 2007).

A cultura de tecidos possui um papel importante na conservação e multiplicação de espécies nativas que estejam em vias de extinção, bem como a propagação comercial de plantas com importância medicinal, como a amburana, pois pode possibilitar a rápida multiplicação da espécie a partir de um único indivíduo, em qualquer época do ano, além de permitir maior controle sobre a sanidade do material propagado (SABÁ et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; SANATOMBI; SHARMA, 2007; THAKUR; KARNOSY, 2007).

2.7 Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, tem grande impacto na cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Esta técnica foi desenvolvida há mais de 30 anos e viabiliza a clonagem de várias espécies, a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz (SOUZA et al., 2006a). Hoje, na cultura de tecidos, a micropropagação é a tecnologia de maior destaque, servindo de mecanismo de propagação eficiente e com aplicação prática reconhecida (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Limpeza clonal, melhoramento vegetal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), intercâmbio de germoplasma, lançamento de novas cultivares (SOUZA et al., 2006 a), obtenção de plantas com qualidade fitossanitária e conseqüente vigor híbrido, bem como manutenção e multiplicação de um elevado número de plantas em períodos de tempo e espaço físico reduzidos (SOUZA et al., 2006a; SARTORETTO et al., 2008), são algumas das aplicações práticas da micropropagação.

Nos últimos anos, a micropropagação tem sido utilizada por muitos autores para propagar espécies de plantas medicinais (PINTO et al., 1994; SABÁ et al., 2002; VENEGAS et al., 2002; NALAWADE et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003; NAIR; SEENI, 2003; MURCH et al., 2004; FEYISSA et al., 2005; BURDYN et al., 2006; BUENDÍA-GONZÁLEZ et al., 2007; HUBNER et al., 2007; BOPANA; SAXENA, 2008; HUSSAIN et al., 2008; PURKAYASTHA et al., 2008; JEONG et al., 2009; AMOO et al., 2009), devido a exploração extrativista dessas espécies, bem como dificuldades na propagação vegetativa (SABÁ et al., 2002; CORDEIRO et al., 2002) e incrementada com o objetivo de constituir parâmetros para a produção de uma progênie uniforme (DODE et al., 2003) e plantas com identidade genética, caracterização bioquímica e alta produção de metabólitos de interesse (MURCH et al., 2004).

O processo da micropropagação está intimamente relacionado com a divisão das fases de desenvolvimento da cultura em estádios, sendo cada fase representada por modificações no meio de cultura e controle das condições ambientais. Para a maioria das espécies, o processo de micropropagação

compreende quatro estádios padrões. O estágio I compreende o estabelecimento do explante no meio de cultura; no estágio II ocorre a multiplicação ou indução de brotos múltiplos; o estágio III equivale ao enraizamento e o estágio IV, a aclimatização com a transferência gradual das plantas para a condição *ex vitro* (HARTMANN et al., 1997; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Assim, o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis e o verdadeiro desafio está na manipulação do material vegetal. Esta inclui o manejo da planta matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de subcultura adotado, as condições ambientais e microambientais dentro do frasco de cultura e o transplântio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Portanto, o sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de grande número de variáveis, tais como: fonte de explante, composição mineral do meio de cultura, inclusive suas vitaminas e fontes de carbono, balanço hormonal e condições ambientais (PERES, 2002; ALVES et al., 2004; GE et al., 2006). Essas variáveis podem ser classificadas em determinantes e permissivas. Nas primeiras salientam-se a “condição fisiológica do explante” e o tipo e concentrações de reguladores vegetais a serem utilizados como sinal químico para a indução/ativação da morfogênese. As chamadas variáveis permissivas incluem a composição dos meios de cultura e as condições físicas (GUERRA et al., 1998; GIRI et al., 2004).

2.7.1 Tipos de Explante

Explante pode ser definido como o segmento ou órgão vegetal retirado de alguma parte da planta para iniciar o cultivo *in vitro* (VALOIS et al., 1996; SOUZA et al., 2006a).

Diversos explantes, tais como, cotilédones, folhas, ápice caulinar, hipocótilo, nó cotiledonar, segmento nodal, segmento internodal, segmentos radiculares, podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SOUZA et al., 2006a). Entretanto, teoricamente, levando-se em consideração a totipotência das células vegetais, qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante. Mas, o ideal é a utilização de explantes com uma maior proporção de tecido meristemático ou que

tenham maior competência para expressar a totipotência (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998).

Para a escolha do explante devem ser considerados dois aspectos primordiais, que são: o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1999). Contudo, a maior influência na resposta morfogênética está diretamente relacionada com o nível de diferenciação e a fase de desenvolvimento em que se encontra a planta matriz (SOUZA et al., 2006a).

2.7.2 Multiplicação

A fase de multiplicação é considerada uma das etapas mais longas no processo de micropropagação e tem como objetivo a obtenção do maior número de plantas, no menor período de tempo (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998; ERIG; SCHUCH, 2005).

Nessa etapa os explantes são transferidos para um meio de cultura com reguladores vegetais (SOUZA et al., 2006a) e consiste na reprodução dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos (SCHMILDT et al., 2008). Entretanto, não basta conseguir altas taxas de multiplicação, mas sim uma média satisfatória com um mínimo de variação de explante para explante, além da qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998).

Freqüentemente os brotos que proliferam nessa etapa de multiplicação não apresentam raízes. Então, faz-se necessário que sejam movidos para um meio de cultura ou a condições propícias ao enraizamento (HARTMANN et al., 1997).

2.7.3 Enraizamento

Em cultura de plantas lenhosas, o enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro* é uma limitação, nesta etapa, é indispensável o uso de reguladores vegetais como as auxinas, que tem a finalidade de promover a formação de raízes adventícias. Certas espécies, principalmente as lenhosas, enraizam com dificuldade ou não enraizam. Muitos fatores, como genótipo,

condições de cultivo e substâncias reguladoras de crescimento, dentre outras são relevantes para o enraizamento *in vitro* (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Entre os fatores que controlam o desenvolvimento de raízes adventícias *in vitro*, destaca-se os reguladores vegetais, alguns promovendo e outros inibindo o enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). As auxinas controlam uma ampla variedade de processos implicados no desenvolvimento das plantas, entre eles a iniciação de novos meristemas de raízes (ROCHA et al., 2007). O ácido indol butírico (AIB) tem sido utilizado na maior parte dos trabalhos, por não causar fitotoxicidade aos explantes, em uma larga faixa de concentração e ser eficiente para um número elevado de espécies (HARTMANN et al., 1997).

Geralmente, espécies lenhosas são beneficiadas com o uso do carvão ativado quando enraizadas *in vitro*. Esta substância é capaz de modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo substâncias promotoras de enraizamento, substâncias tóxicas, fenóis e/ou quinonas, produzidas durante a autoclavagem ou liberadas de explantes cujos tecidos sofreram injúrias, devido sua alta capacidade de adsorção. Outra propriedade benéfica atribuída ao carvão ativado, no processo de enraizamento *in vitro*, é à redução da intensidade luminosa na região de formação de raízes. Entretanto, concentrações elevadas de carvão podem impedir o processo de enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998) já que essa substância pode também adsorver além dos compostos tóxicos, nutrientes e os reguladores vegetais presentes no meio de cultura.

2.7.4 Aclimatização

Considerada a última fase do processo de propagação *in vitro*, é na aclimatização, que as plantas são transferidas da condição *in vitro* para a condição *in vivo*, em estufa ou casa de vegetação (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998).

Muitas espécies cultivadas *in vitro*, necessitam de um processo de aclimatização para assegurar a sua sobrevivência e o seu crescimento no ambiente externo. A aclimatização tem por objetivo reduzir o estresse causado pela enorme diferença entre as condições de cultivo *in vitro* e as condições

externas de crescimento (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998; SOUZA et al., 2006b). Por isso, esta fase representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação, uma vez que envolve a mudança das plantas de uma condição heterotrófica, para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese para sobreviver (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998)

Um dos principais problemas desta etapa se constitui na substancial perda de água, que pode provocar estresse hídrico e desidratação devido à evapotranspiração que ocorre nas plantas durante a transferência para casa de vegetação (SOUZA et al., 2006b). Por isso, a adaptação das plantas produzidas *in vitro* à condição *ex vitro* deve ser gradual e cercada de cuidados especiais, de forma a reduzir os estresses que podem culminar em danos ou morte da planta (SOUZA et al., 2006b).

A manutenção da umidade relativa do ar alta e de temperaturas amenas é necessário na fase de aclimatização. A umidade relativa alta no início da aclimatização faz com que a planta retome o crescimento e passe a realizar fotossíntese em níveis suficientes para estimular o desenvolvimento de um sistema radicular mais funcional, na absorção de água e nutrientes (MACIEL et al., 2000).

Portanto, alguns fatores determinam o sucesso da aclimatização. Entre eles, destaca-se a habilidade da planta de passar da condição heterotrófica para autotrófica, os fatores abióticos (luminosidade, umidade relativa, temperatura, tipo de substrato) a que a planta estará exposta, os fatores bióticos (pragas e doenças), a presença e a capacidade de produzir novas raízes e a nutrição da planta (HARTMANN et al., 1997).

2.8 Reguladores Vegetais

A organogênese e o crescimento *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias que ocorrem naturalmente na planta os hormônios, e os análogos sintéticos, reguladores vegetais adicionados ao meio de cultura (TERMIGNONI, 2005; GEORGE, 2008). Estes se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998).

Entretanto, a concentração e o tipo de regulador vegetal ideal dependem do tipo de tecido utilizado como explante, pois, diferentes partes da planta podem responder por reações diversas a um determinado regulador. Esta resposta está sujeita a presença do regulador na célula correta, do reconhecimento do grupo de células que respondem a ele e da ligação hormônio-receptor protéico, que deve desencadear as mudanças metabólicas que amplificam o sinal do regulador (TAGLIACOZZO, 1998).

A utilização de substâncias reguladoras de crescimento tem-se mostrado de grande importância para o estabelecimento da competência e determinação, condições estas necessárias à formação de meristemas caulinares e /ou radiculares. Isto é possível graças ao conceito de totipotência preconizada por Haberlandt em 1992, que dita que todas as células de um indivíduo possuem capacidade de gerar um novo indivíduo. Isto significa que as células vegetais são autônomas e tem a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (KERBAUY, 2008).

Os reguladores vegetais mais utilizados na organogênese são as auxinas e as citocininas. O balanço entre ambos determinam o desenvolvimento da planta nas diversas fases (ALVES et al., 2004; SOUZA et al., 2006).

As citocininas exercem papel importante na regulação da divisão, alongamento e diferenciação celular (TAIZ; ZEIGER, 2007), expansão foliar, quebra da dominância apical, formação de gemas adventícias (POZO et al., 2005), e são utilizadas assiduamente em todas as modalidades da cultura de tecidos: organogênese, fusão de protoplasto, suspensão celular e embriogênese somática (CID, 2000). Os tipos de citocininas e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. As mais utilizadas em cultura de tecidos são o 6-benzilaminopurina (BAP), a cinetina (KIN), a isopenteniladenina (2IP) e o tiadizuron (TDZ). E as concentrações geralmente variam entre 0,1 e 5,0 mg.L⁻¹ (CALDAS, et al. 1998; TAGLIACOZZO, 1998; ERIG; SCHUCH, 2005).

Embora outras citocininas tenham apresentado melhores repostas para algumas situações, o BAP é a mais utilizada (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Esta é uma das citocininas de menor custo, tem sido muito eficaz na multiplicação de diversas espécies e é a mais utilizada na multiplicação de espécies de plantas

lenhosas (BENNET et al., 1994; CERDAS et al., 1998; IBAÑES et al., 2003). Por exemplo, em trabalhos com *Myracrodron urundeuva* (ANDRADE et al., 2000), *Acassia mearnsii* (JÚNIOR, et al., 2004), *Olea europea* (DUTRA et al., 2004), *Holarrhena antidysenterica* (KUMAR et al., 2005), *Bixa orellana* (CARVALHO, et al., 2005), *Albizia odoratissima* (RAJESWARI; PALIWAL, 2006), *Caryocar brasiliense* (SANTOS et al., 2006), *Aloysia polyestachya* (BURDYN et al., 2006), *Rubus idaeus* (VILLA et al., 2006), *Ulmus parvifolia* (THAKUR; KARNOSKY, 2007), *Crataegus pinnatifida* (DAÍ et al., 2007), *Mallotus repandus* (PRATHANTURAU et al., 2007), *Cunninghamia lanceolata* (ZHU et al., 2007) e *Salix pseudolasiogyne* (PARK et al., 2008), o BAP promoveu resultados interessantes quando o objetivo foi promover a multiplicação *in vitro*. A razão de sua eficiência pode estar relacionada à capacidade dos tecidos vegetais em metabolizarem reguladores vegetais naturais mais rapidamente que os sintéticos (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Entre as auxinas mais utilizadas estão o ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido indolacético (AIA) (CALDAS et al., 1998). Estas substâncias estão envolvidas na regulação de vários processos fisiológicos como dominância apical, expansão celular, tropismo, formação e crescimento de raízes adventícias, abscisão foliar, indução de diferenciação vascular e desenvolvimento de gemas florais e do fruto (HINOJOSA, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2007).

As auxinas e citocininas interagem, e o sinergismo entre elas é o fator que direciona a diferenciação celular e morfogênese *in vitro* (SANTANA, 2003). Entretanto, o modo de interação entre ambos é frequentemente dependente da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (PIERIK, 1997). Contudo, concentrações altas de citocininas e baixas de auxinas favorecem, predominantemente, a proliferação de brotos. Ao passo que, a relação inversa favorece a formação de raízes e um balanço entre ambos reguladores a indução de calos (SANTANA, 2003; FERRI, 2008).

2.10 Plantas lenhosas x micropropagação

Inicialmente, a aplicação comercial da micropropagação era restrita às espécies herbáceas. No entanto, nas últimas duas décadas, tem sido considerada uma importante tecnologia para a propagação de diversas espécies lenhosas, possibilitando a multiplicação (RIBAS, 1999), a fixação de genótipos superiores em gerações subsequentes (HARTMANN et al., 1997), a utilização de menor quantidade de material vegetal, além de promover uma maior uniformidade das plantas (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998). Economicamente, as espécies lenhosas são extremamente importantes na obtenção de produtos e subprodutos da madeira, além dos projetos de reflorestamento (HARRY; THORPE, 1994 apud CYSNE, 2006).

Nos últimos anos, a micropropagação tem sido utilizada, principalmente com a finalidade de clonar materiais selecionados, para a produção em larga escala visando o reflorestamento, a revitalização de áreas depauperadas e a produção bioenergética (CORDEIRO et al., 2002; RAJESWARI; PALIWAL, 2006; PRATHANTURARUG et al., 2007; THAKUR; KARNOSKY, 2007). Além disso, as técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido aplicadas para propagar e multiplicar inúmeras plantas lenhosas, de interesse medicinal, como *Myracrodruon urundeuva* (ANDRADE et al., 2000), *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (OLIVEIRA et al., 2003), *Copaifera langsdorffii* (NOLETO; SILVEIRA, 2004), *Bixa orellana* (CARVALHO et al., 2005), *Hagenia abyssinica* (FEYISSA et al., 2005), *Taxus wallichiana* (DATTA et al., 2006) *Crataegus pinnatifida* (DAI et al., 2007) e *Pterocarpus marsupium* (HUSAIN et al., 2007).

De forma geral, explantes oriundos de tecidos jovens e com mais atividade metabólica são os mais competentes para estimular a morfogênese (PINTO et al., 1994). Em plantas lenhosas, a utilização de explantes provenientes de plantas adultas é vantajosa, uma vez que permite a multiplicação de genótipos conhecidos (BHOJWANI; RADAZAN, 1983 apud NOLETO; SILVEIRA, 2004). Porém, as plantas lenhosas apresentam maiores dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente por crescerem no campo por muitos anos e serem rotineiramente infectadas por microorganismos, interna e externamente, que são difíceis de controlar e a desinfecção pode trazer, simultaneamente, danos

ou morte ao tecido (BONGA; ADERKAS, 1992). Por isso, esses explantes apresentam uma maior dificuldade para o estabelecimento *in vitro*. Além disso, explantes provenientes de plantas adultas apresentam em geral, tecidos com baixa capacidade morfogenética, fato comum em leguminosas arbóreas (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

Sob o ponto de vista fisiológico e experimental, para estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* para espécies lenhosas é mais viável tecnicamente trabalhar com plântulas *in vitro*, pois nessas condições os explantes se encontram em estágio juvenil e possuem maior capacidade de crescimento e resposta dos tecidos à aplicação exógena de reguladores vegetais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PRADHAN et al., 1999; NOLETO; SILVEIRA, 2004). Portanto, explantes com maior proporção de tecidos juvenis, provenientes de plântulas germinadas *in vitro* e partes juvenis de plantas adultas, são favoritos e devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam submetidos a nenhum tipo de estresse, tais como seca, temperaturas excessivamente baixas ou altas, deficiência mineral e ataque de pragas ou doenças (PIERIK, 1990; JUNGHASN; SANTOS-SEREJO, 2006).

Assim, a micropropagação de espécies lenhosas pode ser dificultada por vários fatores, tais como baixa velocidade de multiplicação (PIERIK, 1990), contaminação endógena dos explantes e oxidação de compostos fenólicos do meio de cultura e explante (MELO et al., 1998; TEIXEIRA, 2001), recalcitrância para formação de brotos (DAÍ et al., 2007) e dificuldade de enraizamento das partes aéreas (NORMANLY, 1997; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal (UEHF) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), localizado no município de Feira de Santana-Bahia.

3.2 Material vegetal, assepsia e condições de cultivo

As sementes de *A. cearensis* foram provenientes do banco de germoplasma da Ebrapa Semiárido localizada em Petrolina-PE.

As sementes foram lavadas em água corrente (10 minutos) e posteriormente desinfestadas em câmara de fluxo laminar. Nesta, foram imersas em álcool a 70% durante um minuto e em seguida em solução de hipoclorito de sódio [NaOCl a 2,5% de cloro ativo], com duas gotas de detergente neutro, durante 10 minutos. Em seguida, foram lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada (Figura 3).

3.3 Meio de cultura e condições de cultivo *in vitro*

O meio de cultura utilizado para todos os experimentos foi o WPM (Wood Plant Medium, elaborado por LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com 3% de sacarose (Synth®) e solidificado com 0,7% de Agar (Himedia®).

O pH do meio de cultura foi aferido para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N antes da autoclavagem, que foi realizada a temperatura de 121°C e pressão de 1atm por 15 minutos.

Nos experimentos com a presença dos reguladores vegetais, estes foram adicionados ao meio de cultura antes da aferição do pH.

Todas as manipulações foram realizadas sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Os materiais utilizados nos procedimentos (tais como pinças, placas de Petri e béquer) foram previamente autoclavados antes de iniciar

os procedimentos. Em câmara de fluxo laminar, foram flambados por cinco vezes em álcool 100% e lamparina (Figura 3).



Figura 3. Material vegetal e assepsia. Sementes de *A. cearensis* (A); Sementes imersas em água estéril (B); Material utilizado para desinfestação (C); Material utilizado para inoculação (D). Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

3.4 Estabelecimento *in vitro*

Para a obtenção de plântulas assépticas, as sementes de *A. cearensis* foram desinfestadas, conforme procedimento descrito no 3.2.

Após a desinfestação em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 15mL de meio WPM.

Os tubos foram vedados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC) e mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, umidade relativa de 50-70% e densidade de fluxo de fótons

fotossinteticamente ativos $40 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes branco-frias.

3.5 Multiplicação *in vitro*

Para a multiplicação *in vitro*, a indução de brotos provocada em diferentes tipos de explantes: ápice caulinar (AC), folíolo (FO), segmento nodal (SN), segmento internodal (SI) e segmento cotiledonar (SC), retirados de plântulas, com 45 dias de idade, oriundas da germinação *in vitro* (Figura 4).

Aos 45 dias da inoculação, as variáveis analisadas foram: número de brotos por explante, número de folhas por broto, comprimento da parte aérea, matéria seca da parte aérea e porcentagem de explantes com brotos.

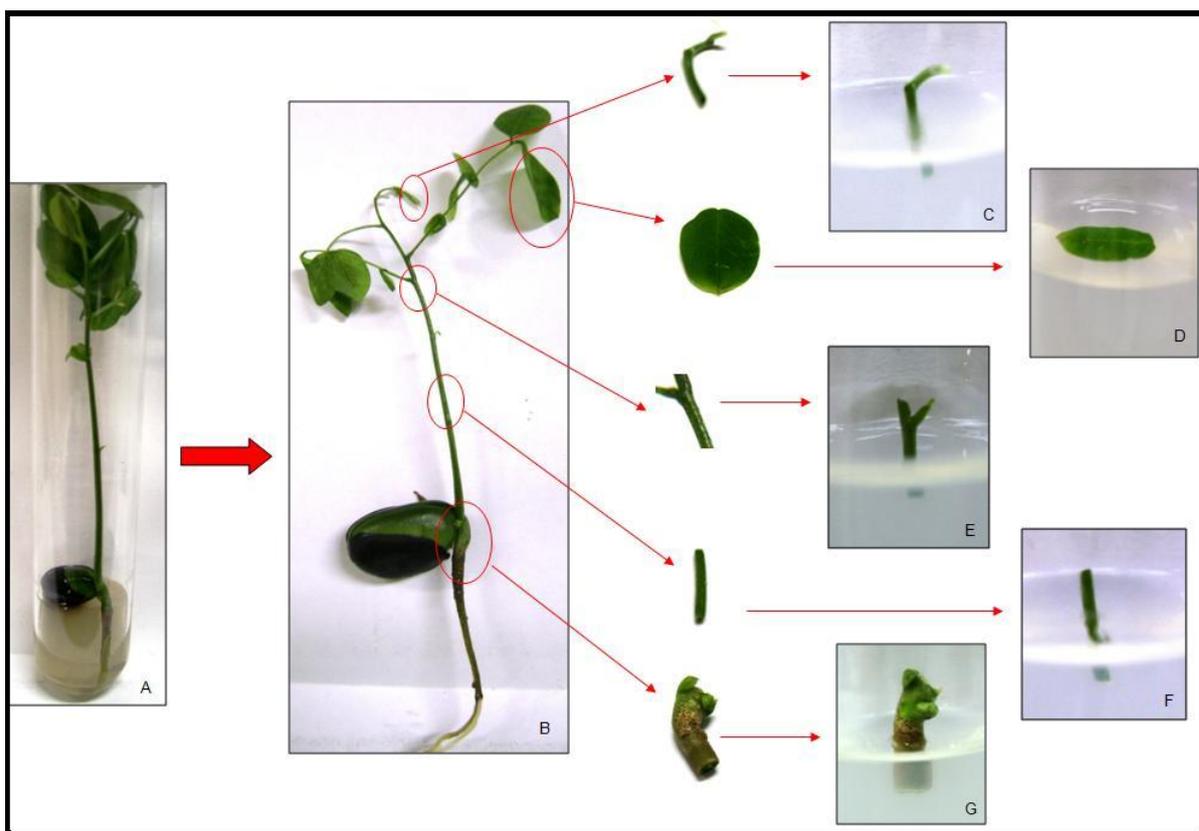


Figura 4. Exemplo de *A. cearensis* estabelecida *in vitro* (A), fora do tubo de ensaio (B) e explantes utilizados: ápice caulinar (C), folíolo (D), segmento nodal (E), segmento internodal (F) e segmento cotiledonar (G). Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

3.5.1 Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftaleno acético (ANA) na multiplicação *in vitro*.

Neste experimento foram utilizados três tipos de explantes (folíolo, segmento nodal e segmento internodal), inoculados verticalmente e diferentes doses de BAP (0,0; 2,22; 4,44; 8,88 μM) combinadas ou não com ANA (0,0; 0,5 μM).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3 x 2 x 4 (três tipos de explante, duas doses de ANA, quatro doses de BAP), totalizando 24 tratamentos com quatro repetições, sendo cada parcela composta por 10 tubos.

3.5.2 Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

A partir dos resultados obtidos no experimento anterior, instalou-se este experimento. Foram utilizados cinco tipos de explantes: folíolo, segmento nodal, segmento internodal, ápice caulinar e segmento cotiledonar, inoculados verticalmente em meio de cultura WPM suplementado com o regulador vegetal BAP em cinco concentrações (0,0; 2,22; 4,44; 8,88 e 17,76 μM).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 5 x 5 (cinco tipos de explante, cinco doses de BAP), totalizando 25 tratamentos com cinco repetições, sendo cada parcela composta por cinco tubos.

3.5.3 Efeito da citocinina tidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

Neste experimento foram utilizados cinco tipos diferentes de explantes: folíolo, segmento nodal, segmento internodal, ápice caulinar e segmento cotiledonar inoculados verticalmente em meio de cultura WPM suplementado com diferentes doses do regulador vegetal TDZ (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 μM).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 5 x 4 (cinco tipos de explante, quatro doses de TDZ), totalizando 20 tratamentos com cinco repetições, sendo cada parcela composta por cinco tubos.

3.5.4 Efeito da idade do explante segmento cotiledonar na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, instalou-se este experimento para avaliar a influência da idade do explante na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*, utilizando apenas o segmento cotiledonar, retirado de plântulas com idades de 15, 30 e 45 dias de germinadas e inoculado em meio WPM suplementado com 4,44 µM de BAP.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, totalizando três tratamentos com cinco repetições, sendo cada parcela composta por cinco tubos.

Aos 45 dias da inoculação, avaliou-se o número de brotos por explante, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea.

3.5.5 Influência do tipo de orientação e fragmentação do explante na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

Para avaliar a influência do tipo de orientação e fragmentação do explante na regeneração *in vitro* de *A. cearensis*, apenas o segmento cotiledonar foi utilizado, por ter sido o explante que proporcionou os melhores resultados nos experimentos anteriores, em meio WPM suplementado com 4,44 µM de BAP.

Quanto à orientação, o explante foi inoculado na posição horizontal e na posição vertical. Em relação a fragmentação, o segmento cotiledonar foi inoculado inteiro ou fragmentado longitudinalmente.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, totalizando quatro tratamentos com cinco repetições, sendo cada parcela composta por cinco tubos.

Aos 45 dias da inoculação, avaliou-se o número de brotos por explante, número de folhas por broto, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea.

3.6 Enraizamento *in vitro* de brotos micropropagados de *A. cearensis*.

Brotos regenerados (~2 cm de altura), provenientes do explante segmento cotiledonar inoculados em meio de cultura WPM contendo 4,44 μ M de BAP, foram transferidos para enraizamento em meio de cultura WPM acrescido de diferentes concentrações do regulador vegetal AIB (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μ M) e presença de 1g/L ou ausência de carvão ativado.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 2 (quatro doses de AIB, presença ou ausência de carvão ativado) totalizando seis tratamentos com cinco repetições sendo cada parcela composta por cinco tubos.

Aos 30 dias de experimento, avaliou-se o número de brotos enraizados, número de raiz por broto, comprimento do sistema radicular (cm), matéria seca da raiz (mg) e a porcentagem de brotos enraizados.

3.7 Aclimatização de plantas micropropagadas de *A. cearensis*.

Plântulas enraizadas foram retiradas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas em água corrente para remoção de resíduos do meio de cultura. Posteriormente, foram plantadas em copos plásticos (500mL), perfurados, para drenagem do excesso de água, contendo uma mistura de terra vegetal e vermiculita (1:1).

Os copos com as plantas foram mantidos em casa de vegetação a 70% de luminosidade e protegidas com uma garrafa plástica tipo pet para a manutenção da umidade relativa alta no microambiente.

As tampas das garrafas foram desenroscadas no segundo dia do transplântio e retiradas no quinto dia. No décimo dia as garrafas foram

completamente retiradas. Essa metodologia possibilita a aclimatização das plantas de forma gradual às condições da casa de vegetação.

Aos 30 e 60 dias da transferência foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística, mediante a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) e Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente utilizando o programa estatístico SISVAR v 5.0 (FERREIRA, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*

4.1.1 Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftaleno acético (ANA) na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) das interações “BAP x tipo de explante” e “ANA x tipo de explante” para a variável número de brotos e efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da interação “ANA x tipo de explante” para a variável matéria seca da parte aérea. Para as variáveis número de folhas e comprimento da parte aérea, apenas o fator explante isoladamente foi altamente significativo ($p \leq 0,01$) (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA) em relação às diferentes concentrações de ANA e BAP e tipos de explante. Feira de Santana, 2009.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		NB ^z	NF ^z	CPA ^z	MSPA ^z
ANA	1	0,025607*	0,000010 ^{ns}	0,139359 ^{ns}	0,705083*
BAP	3	0,016247*	0,033315 ^{ns}	0,008339 ^{ns}	0,174930 ^{ns}
EXPLANTE	2	0,910831**	2,816392**	12,839157**	10,230404**
ANA*BAP	3	0,002080 ^{ns}	0,022396 ^{ns}	0,069949 ^{ns}	0,169957 ^{ns}
ANA*EXPLANTE	2	0,025607**	0,000010 ^{ns}	0,139359 ^{ns}	0,705083**
BAP*EXPLANTE	6	0,016247**	0,033315 ^{ns}	0,008339 ^{ns}	0,174930 ^{ns}
ANA*BAP*EXPLANTE	6	0,002080 ^{ns}	0,023963 ^{ns}	0,069949 ^{ns}	0,169957 ^{ns}
RESÍDUO	72	0,004499	0,017350	0,078392	0,108500
CV(%)		6,11	11,25	20,50	24,83

* ** Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

^{ns} Não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$

Em todos os tratamentos com segmento nodal, a partir da terceira semana após inoculação, já foi possível a visualização dos brotos formados. Estes eram esverdeados, pequenos e apenas alguns apresentaram folhas completamente formadas (Figura 5).

Para todas as variáveis analisadas o explante segmento nodal foi o único que demonstrou expressão da competência morfogênica para a formação de brotos nas condições hormonais testadas e como consequência, apenas nos tratamentos com esse explante foi possível a avaliação das outras variáveis.

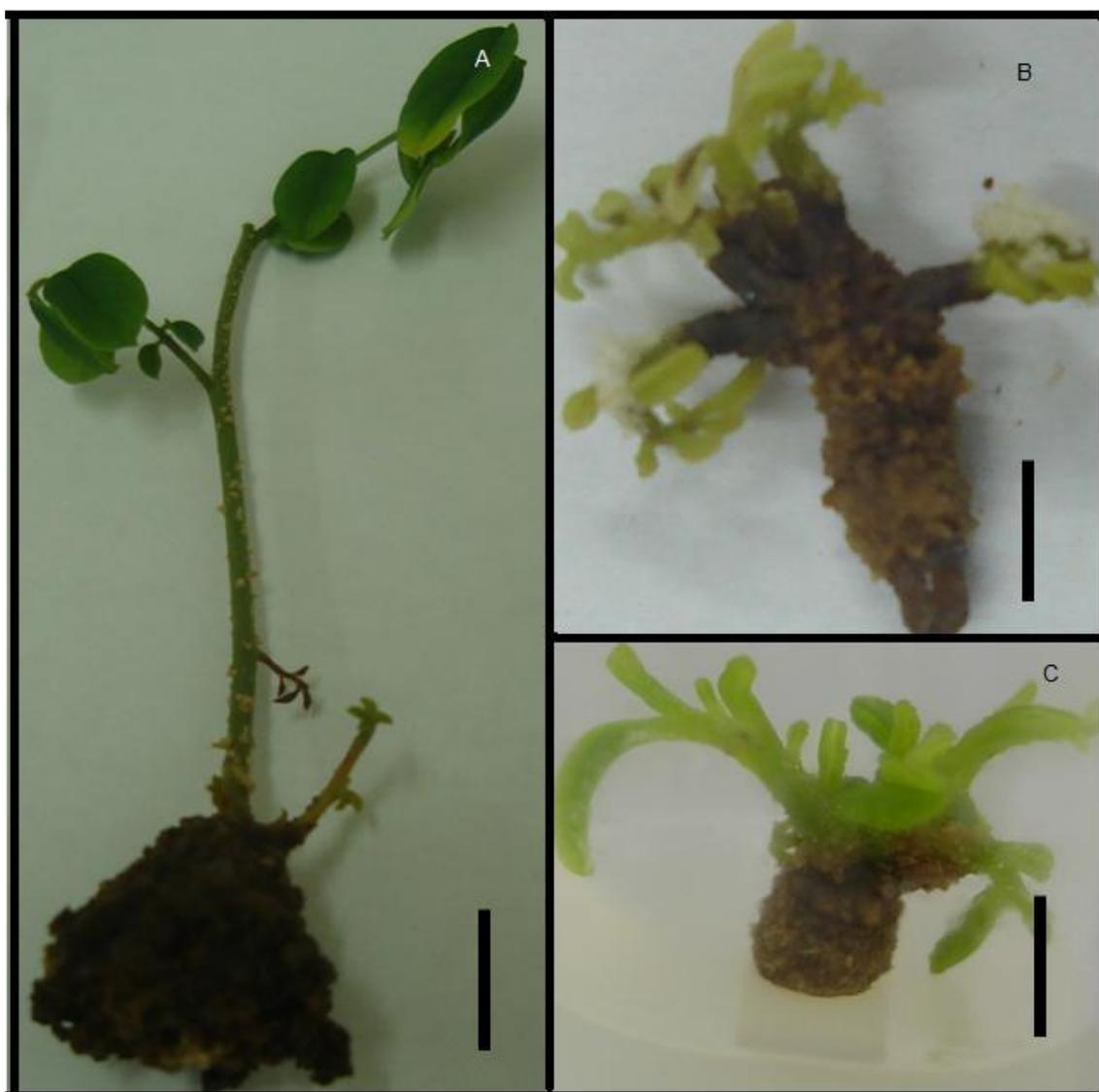


Figura 5. Brotos oriundos do explante segmento nodal (A, B e C) inoculados em meio WPM, suplementado com 0 ANA e 8,88 μM de BAP. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

Para a variável número de brotos, a interação “BAP x tipo de explante” foi altamente significativa e o modelo matemático mais representativo foi o linear, o qual demonstra uma tendência de aumento do número de brotos, com o incremento da concentração do regulador vegetal até um número máximo de brotos observados (0,94 brotos/explante), quando o explante segmento nodal foi inoculado em meio com 8,88 μ M de BAP (Figura 6).

Ainda para essa variável, pela interação “ANA x tipo de explante”, o maior número de brotos (0,82 brotos/explante) foi obtido em meio sem a presença da auxina (Tabela 2).

Embora a interação “ANA x tipo de explante”, tenha sido significativa, o maior número de brotos observados (0,94 brotos/explante), foi obtido quando segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura suplementado com 8,88 μ M de BAP. Resultados semelhantes foram obtidos com *Hancornia speciosa* Gomes (SOARES et al, 2007). Entretanto, em trabalhos com *Pilocarpus microphyllus* Stapf (SABÁ et al, 2002), o tratamento com 8,88 μ M de BAP demonstrou ser o menos eficiente para a regeneração de brotos.

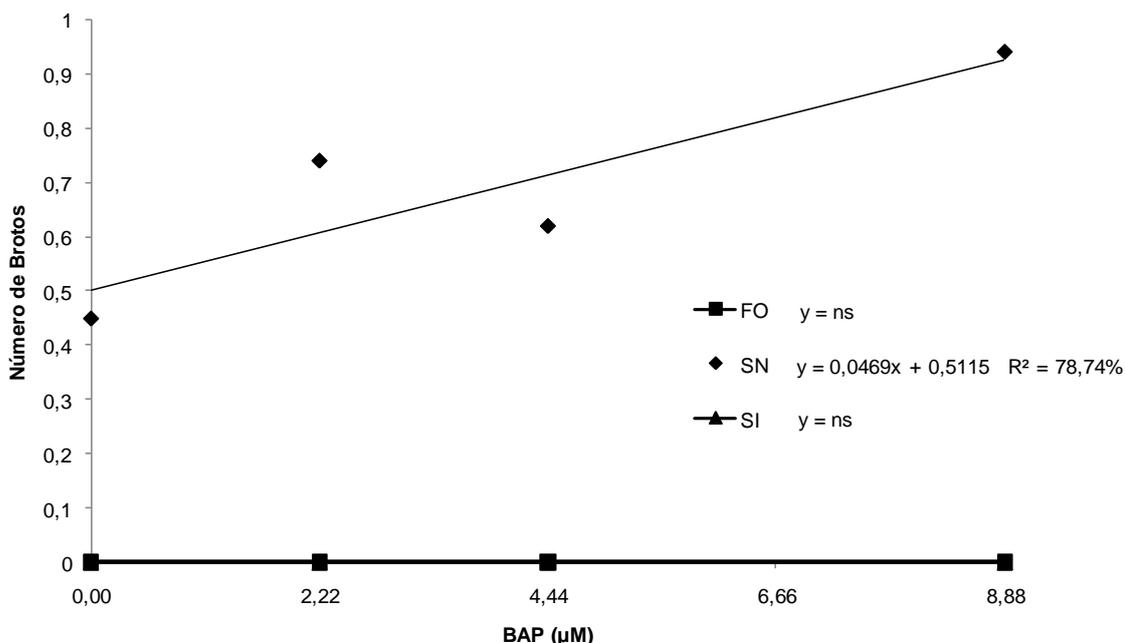


Figura 6. Número médio de brotos obtidos a partir dos explantes folíolo (FO), segmento nodal (SN) e segmento internodal (SI) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP e ausência de ANA. Feira de Santana, 2009.

Para a variável matéria seca da parte aérea, a interação “ANA x tipo de explante” foi altamente significativa e o maior incremento de matéria seca foi obtido quando o explante segmento nodal foi inoculado em meio sem auxina (Tabela 2).

Tabela 2. Médias para a variável número de brotos e matéria seca da parte aérea oriundos do explantes folíolo (FO), segmento nodal (SN) e segmento internodal (SI) em função da presença e ausência de ANA. Feira de Santana, 2009.

ANA (μM)	TIPO DE EXPLANTE		
	FO	SN	SI
Número de Brotos			
0	0,00 A ^z b ^w	0,82 Aa	0,00 Ab
0,5	0,00 Ab	0,55 Ba	0,00 Ab
Matéria Seca da Parte Aérea (mg)			
0	0,00 Ab	4,52 Aa	0,00 Ab
0,5	0,00 Ab	2,13 Ba	0,00 Ab

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

^w Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

Em relação às variáveis número de folhas e comprimento da parte aérea, houve efeito isolado da fonte de variação “tipo de explante”. Tanto o maior número de folhas (1,35 folhas/broto) como o maior broto (3,6 cm) foram obtidos quando se utilizou o explante segmento nodal (Tabela 3).

Os explantes folíolo e segmento internodal, não demonstraram competência morfogenética para a indução de brotos em nenhum dos tratamentos testados. Isso pode indicar que a utilização desses dois tipos de explantes para a multiplicação dessa espécie é inviável nas condições e combinações hormonais testadas.

O balanço entre auxinas e citocininas controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos e órgãos

(PASQUAL, 2001), inclusive os fatores associados à falha na indução de organogênese *in vitro*. Quando um explante falha em desenvolver organogênese *in vitro*, esse fato se dá normalmente na etapa de aquisição de competência, a qual é a capacidade do explante responder ao estímulo hormonal necessário à indução da formação de um órgão (PERES, 2002).

Tabela 3. Médias para número de folhas e comprimento da parte aérea oriundos dos explantes folíolo (FO), segmento nodal (SN) e segmento internodal (SI). Feira de Santana, 2009.

TIPO DE EXPLANTE		
FO	SN	SI
Número de Folhas		
0,00 B ^z	1,35 A	0,00 B
Comprimento da Parte Aérea (cm)		
0,00 B	3,60 A	0,00 B

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

A partir da segunda semana da inoculação dos explantes, nos tratamentos com folíolo houve o aparecimento de raízes. Estas sempre se iniciaram na base do explante, na inserção com o pecíolo. Muitos folíolos sofreram clorose, oxidaram ou morreram. Nos tratamentos com ou sem presença de ANA, houve surgimento de calos em todo o explante ou apenas nas áreas que o explante tocava o meio de cultura (Figura 7).

A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação entre as auxinas e citocininas (KERBAUY, 2008). Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (TAIZ; ZEIGER, 2006).

O explante segmento internodal não demonstrou nenhuma competência morfogênética para formação de brotos ou calos em nenhuma das concentrações de reguladores utilizados. Entretanto, apresentou-se entumescido em todos os

tratamentos. Nos tratamentos com 4,44 e 8,88 μM de BAP com e sem presença de ANA, tornaram-se escurecidos (oxidados) (Figura 7). A oxidação do explante pode levar a não absorção dos nutrientes do meio, sobretudo os reguladores vegetais (ANDRADE et al, 2000).

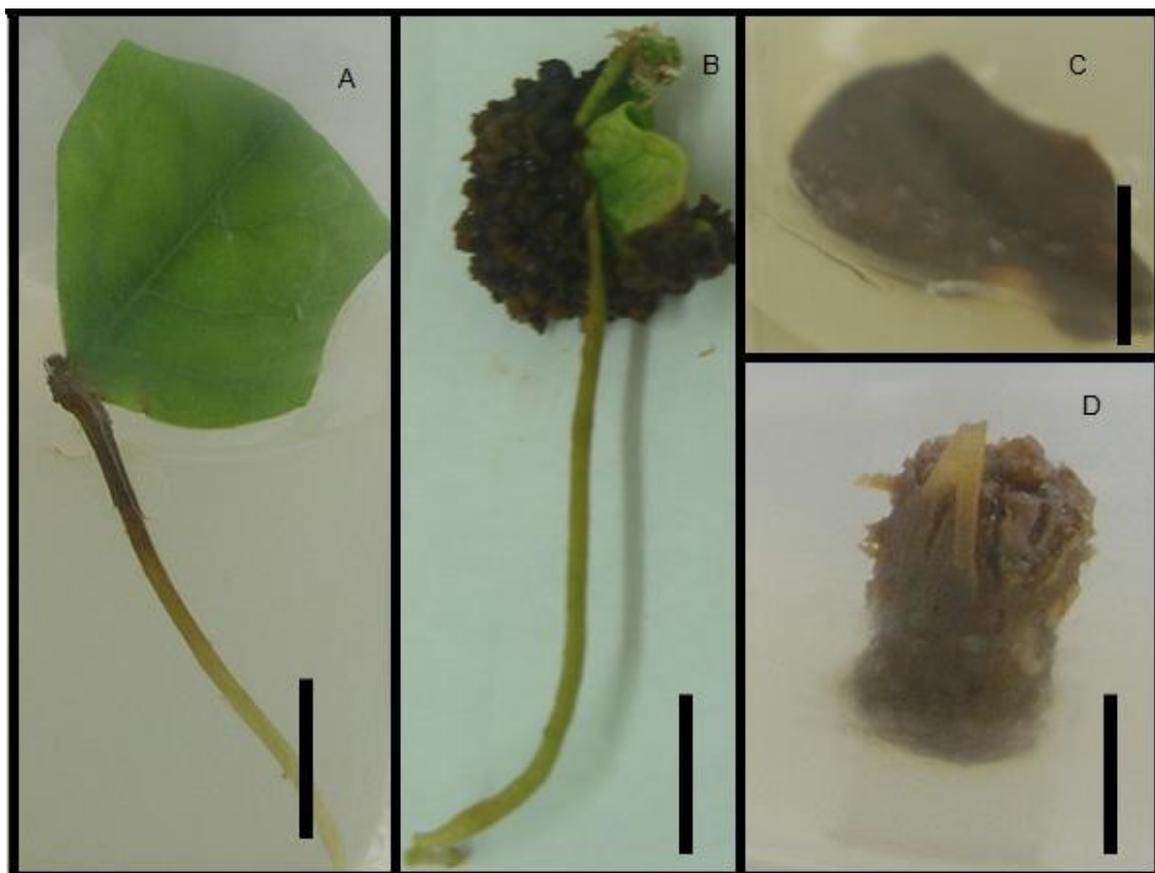


Figura 7. Explante folíolo de *A. cearensis* com raiz (A); calo e raiz (B); necrosada (C). Explante segmento internodal entumescido e oxidado (D). A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

4.1.2 Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da interação “BAP x tipo de explante” para as variáveis número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea e efeito significativo ($p \leq 0,05$) dessa mesma interação, para a variável porcentagem de explantes responsivos (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e porcentagem de explantes responsivos (%ER) em relação às diferentes concentrações de BAP e tipos de explantes. Feira de Santana, 2009.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		NB ^z	NF ^z	CPA ^z	MSPA ^z	% ER ^w
BAP	4	0,211052**	1,304243**	0,146930**	1,054694**	0,082519**
EXPLANTE	4	1,293022**	0,604335**	0,708991**	6,782957**	1,113245**
BAP*EXPLANTE	16	0,053104**	0,310822**	0,055885**	0,444674**	0,027180*
RESÍDUO	100	0,018017	0,055289	0,010277	0,123895	0,010486
CV(%)		10,79	20,38	8,60	22,13	8,33

*, ** Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

^{ns} Não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$

Para o explante segmento nodal, a análise de regressão indicou a equação quadrática como modelo mais representativo. Em relação aos valores observados, houve uma tendência ao aumento do número de brotos, desde o tratamento sem a citocinina BAP, até o tratamento com a concentração 4,44 μ M de BAP. A partir dessa concentração houve um decréscimo na quantidade de número de brotos emitidos por esse explante. O número máximo de brotos

observados para este explante (1,24 brotos/explante) foi observado em meio WPM contendo 4,44 μ M de BAP (Figuras 8, 9 e 10).

Em relação ao explante ápice caulinar, a análise de regressão demonstrou tendência linear para o número de brotos, sendo o maior número de brotos (1,16 brotos/explante), observado em meio WPM suplementado com 2,22 μ M de BAP e o menor (0,28 brotos/explante) em meio WPM contendo 17,74 μ M de BAP. Já para o explante segmento cotiledonar, a curva de regressão indicou comportamento quadrático sendo que o número máximo de brotos observado (2,36 brotos/explante) foi obtido em meio de cultura suplementado com 4,44 μ M de BAP. O aumento do número de brotos foi concomitante ao aumento da concentração de BAP até o nível de 4,44 μ M. A partir dessa concentração houve um decréscimo significativo na emissão de brotos até um mínimo observado de 0,48 brotos/explante no tratamento com 17,74 μ M de BAP (Figuras 8, 9 e 10).

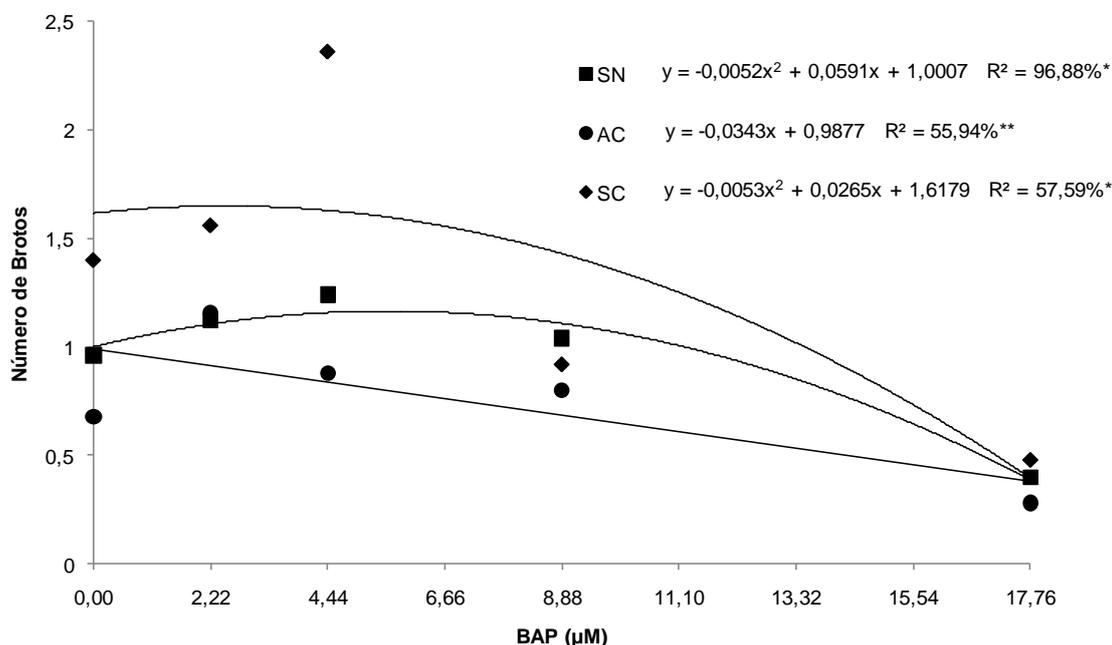


Figura 8. Número médio de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.



Figura 9. Brotos oriundos dos explantes segmento nodal (A), ápice caulinar (B) e segmento cotiledonar (C) inoculados em meio WPM sem BAP. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

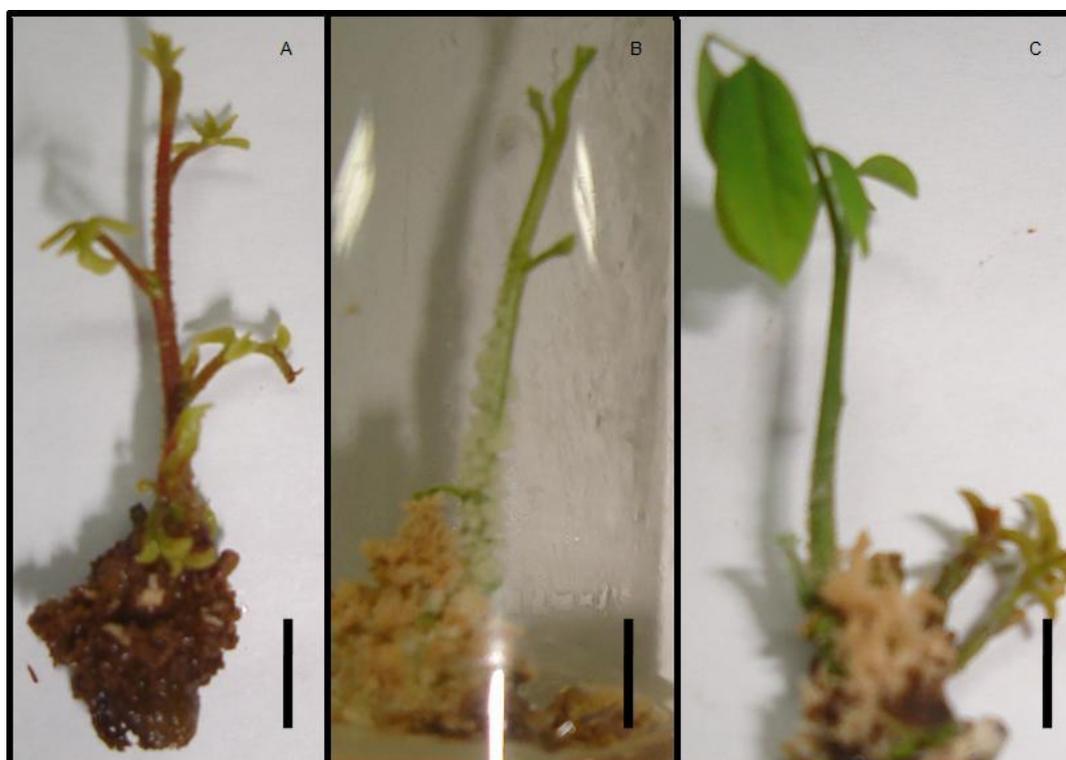


Figura 10. Brotos oriundos dos explantes segmento nodal (A), ápice caulinar (B) e segmento cotiledonar (C) inoculados em meio WPM suplementado com 4,44, 2,22 e 4,44 μM de BAP, respectivamente. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

O baixo número de brotos encontrados nesse experimento corroboram aqueles encontrados para *Bixa orellana* (CARVALHO et al., 2005), *Rubus idaeus* (VILLA et al., 2006), *Cabralea canjerana* (ROCHA et al., 2007) e *Erythrina velutina* (COSTA, 2009), nas quais também se verificou um número reduzido de brotações. Isso pode estar relacionado à recalcitrância que as espécies lenhosas possuem para a formação de brotos (DAÍ et al., 2007).

Entretanto, os resultados são inferiores aos obtidos para *Cunninghamia lanceolata* onde foi obtido uma média de 3,34 brotos/explante (ZHU et al., 2007), *Acacia mearnsii* com uma taxa de 3,5 gemas/explante (JUNIOR et al., 2004), *Terminalia arjuna* em que a taxa máxima de multiplicação foi 3,7 brotos/explante (PANDEY et al., 2006) e para *Feronia limonia* (L.) Swingle, em que o número médio de brotos foi de 11 brotos/explante (HIREGOUDAR et al., 2003).

Em relação a concentração da citocinina, em que o maior número de brotos foi observado em 4,44 μM de BAP, os resultados são semelhantes aos encontrados para *Feronia limonia* (L.) Swingle (HIREGOUDAR et al., 2003), *Rubus idaeus* (VILLA et al., 2006), e *Terminalia arjuna* (PANDEY et al., 2006), *Cunninghamia lanceolata* (ZHU et al., 2007), em que o maior número de brotos também foi obtido em meio de cultura suplementado com 4,44 μM de BAP. Entretanto, em outras espécies, tais como *Bixa orellana*, (CARVALHO et al., 2005), *Cabralea canjerana* (ROCHA et al., 2007), concentrações menores que 4,44 μM de BAP promoveram o maior número de brotações e, em *Aspidosperma polyneuron* (RIBAS et al., 2005), *Acacia mearnsii* (JUNIOR et al., 2004) e *Prunus salicina* (ROGALSKI et al., 2003), concentrações superiores a 4,44 μM de BAP promoveram o maior número de brotações.

Esta diversidade de resultados em relação às concentrações de BAP utilizadas, está de acordo com CALDAS et al. (1998), os quais sugerem que a concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos.

O aumento da concentração de BAP não influenciou significativamente o número de brotos por explante como esperado. Acima da concentração de 4,44 μM , houve um decréscimo na quantidade de brotações e na maior concentração de BAP (17,74 μM), foi observado um menor número de brotos para todos os

explantes (Figura 8). Concentrações elevadas de citocinina podem incrementar a ação da citocinina-oxidase, impedindo a atuação da citocinina sobre a divisão celular e, conseqüentemente, a indução de brotações (CID, 2000). Redução de brotos em concentrações superiores ao nível ótimo também tem sido relatado para diversas plantas medicinais (FAISAL et al., 2006; NAYAK et al., 2007; PANDEY et al., 2006). Em *Eucalyptus grandis*, por exemplo, o aumento do número de brotações foi inversamente proporcional ao aumento da dosagem e do tempo de exposição ao BAP, o que evidencia que as concentrações mais elevadas dessa citocinina foram inibitórias para o processo de multiplicação dessa espécie (ANDRADE et al., 2006).

A taxa de multiplicação é em grande parte controlada pela interação genótipo x citocinina (SANTOS-SEREJO et al., 2006). As citocininas têm função primordial na divisão e atuam na quebra da dominância apical e na indução e crescimento das brotações (KERBAUY, 2008).

Em relação aos explantes testados, o que demonstrou melhor competência morfogenética para emissão de brotos foi o segmento cotiledonar. Esses resultados corroboram aqueles encontrados para as espécies *Dalbergia sisso* (PRADHAN et al., 1998), *Copaifera langsdorffii* Desf. (NOLETO; SILVEIRA, 2004), *Bixa orellana* (CARVALHO et al., 2005), *Albizia odoratissima* (RAJESWARI; PALIWAL, 2006), *Mucuna pruriens* (FAISAL et al., 2006), *Prosopis laevigata* (BUENDÍA-GONZÁLEZ et al., 2007), *Pongamia pinnata* (SUGLA et al., 2007), *Aegle marmelos* (NAYAK et al., 2007), e *Crotalaria verrucosa* (HUSSAIN et al., 2008) em que a proliferação de brotos a partir de segmentos cotiledonares também apresentou os melhores resultados em relação aos demais explantes testados.

Para a variável comprimento da parte aérea, a análise de regressão indicou a equação quadrática como sendo a mais representativa em função da concentração de BAP para os explantes ápice caulinar e segmento cotiledonar. Já para o explante segmento nodal houve uma tendência linear. O comprimento da parte aérea foi influenciado tanto pelo tipo de explante, quanto pelas diferentes concentrações de BAP e o maior comprimento da parte aérea observado (1,64 cm) ocorreu em brotos provenientes do explante segmento cotiledonar inoculados em meio com 2,22 μ M de BAP (Figura 11).

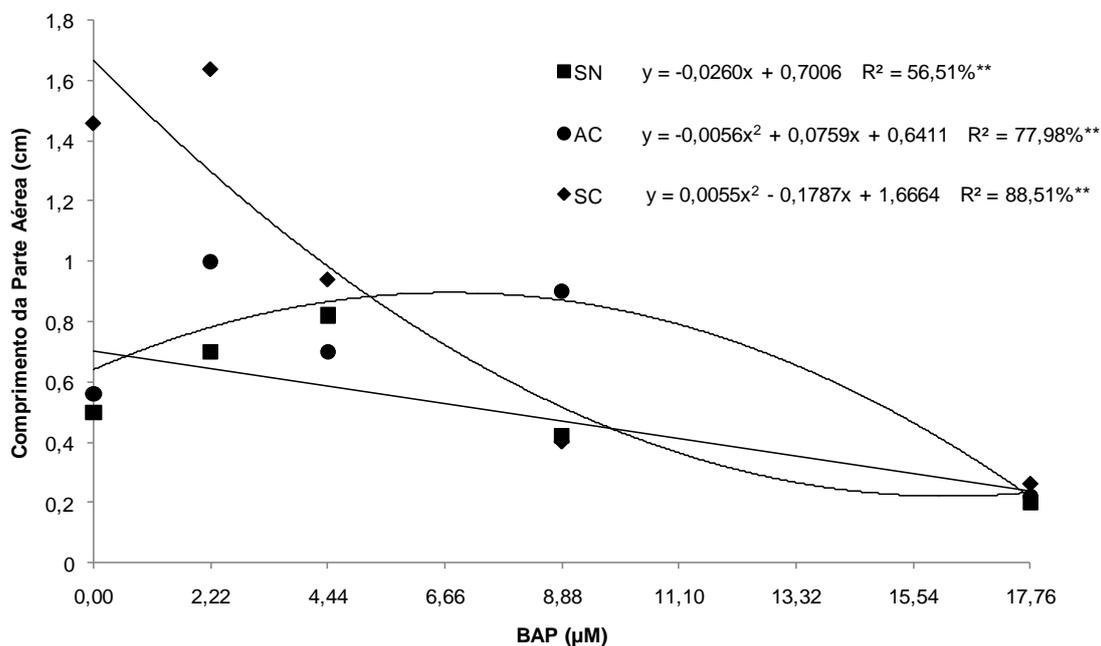


Figura 11. Comprimento da parte aérea de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.

A redução do comprimento das brotações com o aumento da concentração de BAP também foi observado para outras espécies. Em *Lychnophora pinaster* Mart. (SOUZA et al., 2003), e *Rubus idaeus* (VILLA et al., 2006), o maior comprimento das brotações foi obtido em concentrações abaixo de 2,22µM de BAP enquanto que em *Hancornia speciosa*, o maior comprimento de parte aérea foi obtido em tratamento com 4,44µM de BAP (SOARES et al., 2007). Outras citocininas podem também ter o mesmo efeito, como relatado para *Stryphnodendron adstringens* em que o maior comprimento de brotações de ocorreu quando se utilizou uma concentração baixa de cinetina ou na ausência da mesma (NICIOLI et al. 2008). As citocininas utilizadas durante a fase de propagação *in vitro*, de forma geral, promovem formação de partes aéreas, mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em relação à variável número de folhas, a análise de regressão indicou a equação quadrática como a mais representativa. A ausência de citocinina favoreceu o aparecimento do maior número de folhas para todos os explantes competentes morfogeneticamente. E, a partir da concentração de 4,44 μM de BAP, provavelmente houve um efeito fitotóxico da citocinina para essa variável. Para os explantes segmento nodal e ápice caulinar, o controle e o tratamento com 2,22 μM de BAP apresentaram os melhores resultados observados, a passo que para o explante segmento cotiledonar, o maior número de folhas ocorreu na ausência de BAP (5 folhas/explante) e tendeu a reduzir conforme aumentou-se a concentração de BAP (Figura 12). Resultados semelhantes foram obtidos por Villa et al. (2005), em trabalhos com a amora-preta *Ébano* que demonstrou queda no número de folhas com o aumento da concentração de BAP. Isso pode se atribuído ao fato do regulador vegetal BAP estimular a formação do maior número de brotos, porém de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas (LEITZKE, 2007).

A análise de regressão para variável matéria seca da parte aérea demonstrou significância ($p \leq 0,05$) para o explante segmento nodal. Contudo, o coeficiente de correlação (valor de R), foi inferior a 50%. De acordo com os pontos observados na figura 13, verifica-se uma tendência para o aumento na incorporação de matéria seca conforme foi-se aumentando a dose de BAP até 4,44 μM . Para os explantes ápice caulinar e segmento cotiledonar, as equações de regressão demonstraram comportamento quadrático. Para o explante ápice caulinar, o maior incremento de matéria seca observado (5,78mg) ocorreu em meio acrescido de 2,22 μM de BAP. Já para o explante segmento cotiledonar o maior valor observado para a incorporação de matéria seca (5,46mg) foi observado em meio sem o regulador vegetal. Contudo, a curva de regressão se apresentou com a concavidade voltada para cima o que pode indicar que uma dose desse regulador, superior às que foram testadas pode favorecer o incremento de matéria seca nos brotos oriundos do explante segmento cotiledonar (Figura 13).

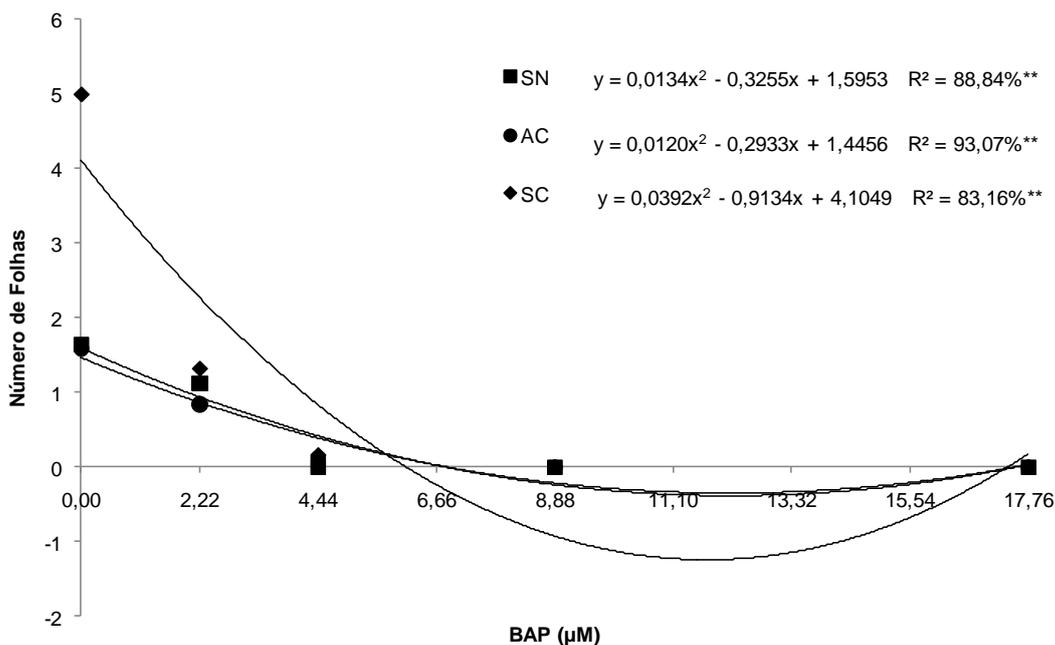


Figura 12. Número de folhas de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.

Para a variável porcentagem de explantes responsivos, a análise de regressão indicou a equação quadrática como a mais representativa para os explantes segmento nodal e ápice caulinar. A maior porcentagem observada para essa variável ocorreu em 4,44 e 2,22 µM de BAP, para segmento nodal e ápice caulinar, respectivamente. Para o explante segmento cotiledonar, a análise de regressão demonstrou tendência linear decrescente observando-se que a porcentagem de explantes responsivos foi inversamente proporcional à concentração de BAP utilizada (Figura 14).

O explante folíolo não demonstrou nenhuma competência morfogenética para a formação de brotos. Entretanto, nos primeiros 15 dias após inoculação, esse explante em todos os tratamentos, com exceção do meio sem regulador, já apresentava um pequeno calo na base da folha, no ponto de inserção do pecíolo.

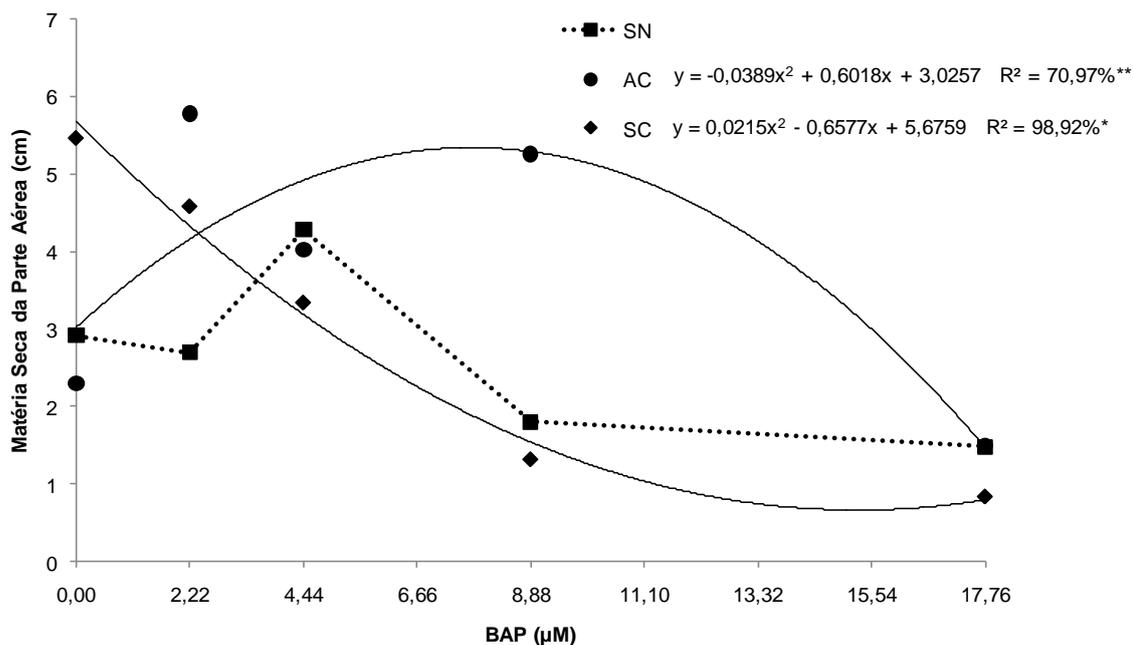


Figura 13. Matéria seca da parte aérea de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.

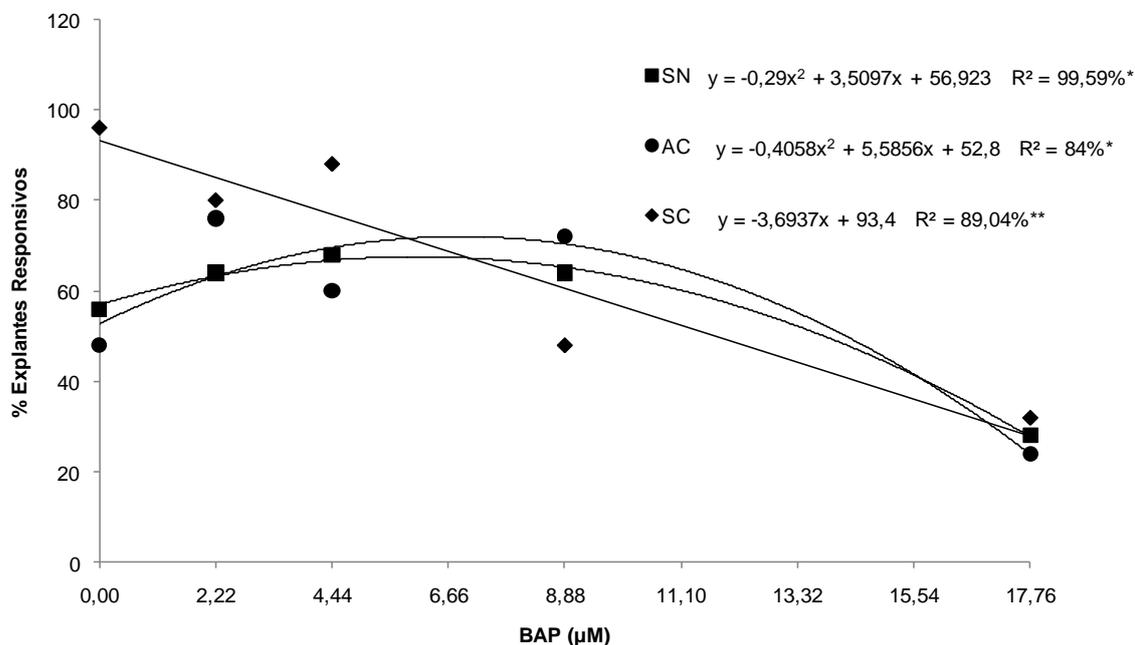


Figura 14. Porcentagem de explantes responsivos para emissão de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. Feira de Santana, 2009.

Em algumas situações, o calo aparecia em toda a extensão do disco foliar, principalmente na face abaxial, a qual estava em contato direto com o meio de cultura. O aspecto desse calo variou principalmente, na coloração (amarelado ou marrom). Entretanto, nenhum desses calos demonstrou ser friável. Alguns folíolos, também nesses tratamentos, sofreram clorose ou morreram. No tratamento na ausência do BAP, houve a formação de raiz (Figura 15).

Estes resultados podem estar relacionados à interação e balanço entre os hormônios endógenos e os reguladores vegetais exógenos (ERIG; SCHUCH, 2005). A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação entre as auxinas e citocininas (SKOOG; MILLER, 1957). Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, favorece a formação de raízes. Na situação oposta, ou seja, quando o nível de citocinina em relação ao de auxina é elevado, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (HINOJOSA, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006; GUERRA; NODARI, 2006).

O explante segmento internodal, apresentou-se entumescido e escuro (oxidado) em todos os tratamentos. Contudo, na ausência de BAP ou presença de $4,44\mu\text{M}$ de BAP, houve formação de brotos e, nesta última, também houve a formação de calo na base do explante (dados não mostrados). A oxidação do explante pode levar a não absorção dos nutrientes do meio, sobretudo os reguladores vegetais (ANDRADE et al., 2000).

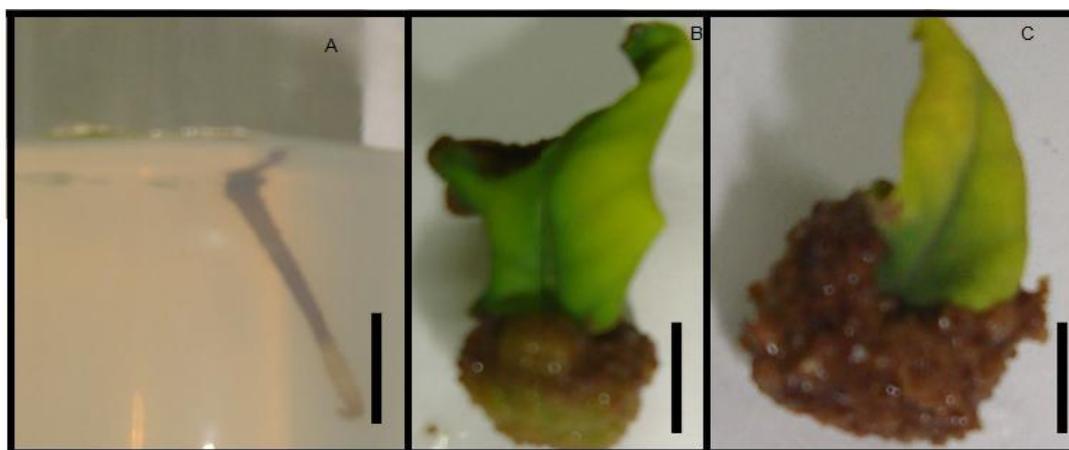


Figura 15. Explantes de *A. cearensis*. Rizogênese (A); Calogênese (B); Detalhe da calogênese e clorose (C). A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

4.1.3 Efeito da citocinina tidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da interação TDZ x tipo de explante para as variáveis número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea e efeito significativo ($p \leq 0,05$) para a variável porcentagem de explantes responsivos (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e porcentagem de explantes responsivos (%ER) em relação às diferentes concentrações de TDZ e tipos de explante. Feira de Santana, 2009.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		NB ^z	NF ^z	CPA ^z	MSPA ^z	% ER ^w
TDZ	3	0,033458*	0,551249**	0,140471**	1,119732**	0.036630*
EXPLANTE	4	0,673480**	5,259437**	2,257962**	14,681986**	0.641827**
TDZ*EXPLANTE	12	0,026768**	0,378587**	0,088703**	0,803892**	0.020092*
RESÍDUO	80	0,010690	0,132845	0,022813	0,173372	0.010531
CV(%)		8,99	25,51	12,38	25,37	8,75

*, ** Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

^{ns} Não significativo

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$

^w Dados transformados em arco seno $(\%)^{0,5}$

Para a variável número de brotos, houve uma tendência ao aumento desses, desde o tratamento com a ausência do TDZ até um número máximo de brotos (1,72 brotos/explante), quando o explante segmento cotiledonar foi inoculado em meio de cultura contendo 1 μ M de TDZ. A partir dessa concentração

houve uma tendência a diminuição na emissão de brotos para esse explante, até um mínimo (0,96 brotos/explante) na presença de 2 μM de TDZ (Figuras 16 e 17).

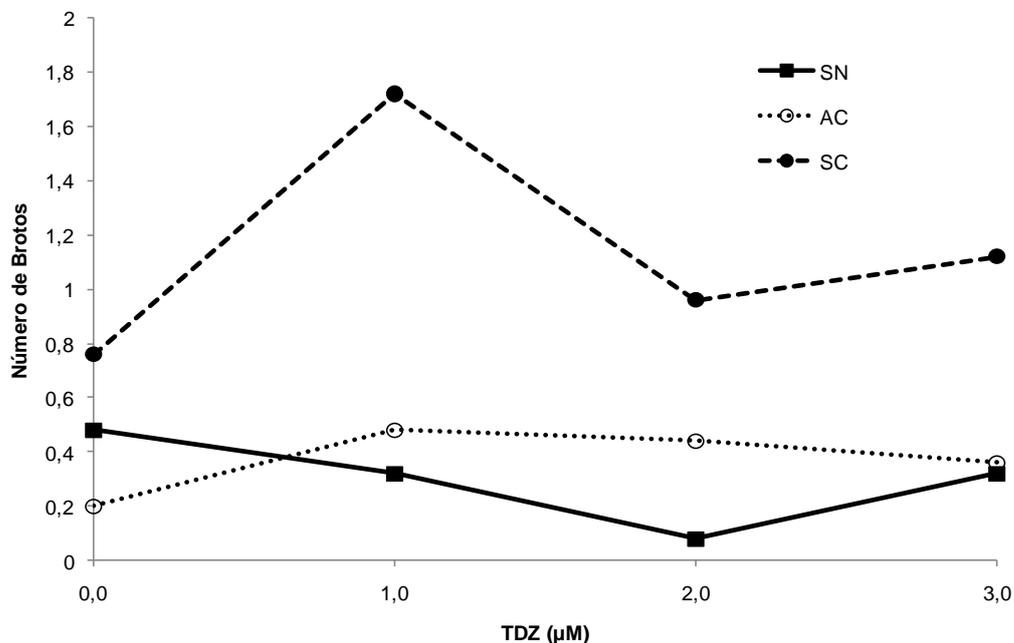


Figura 16. Número médio de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.

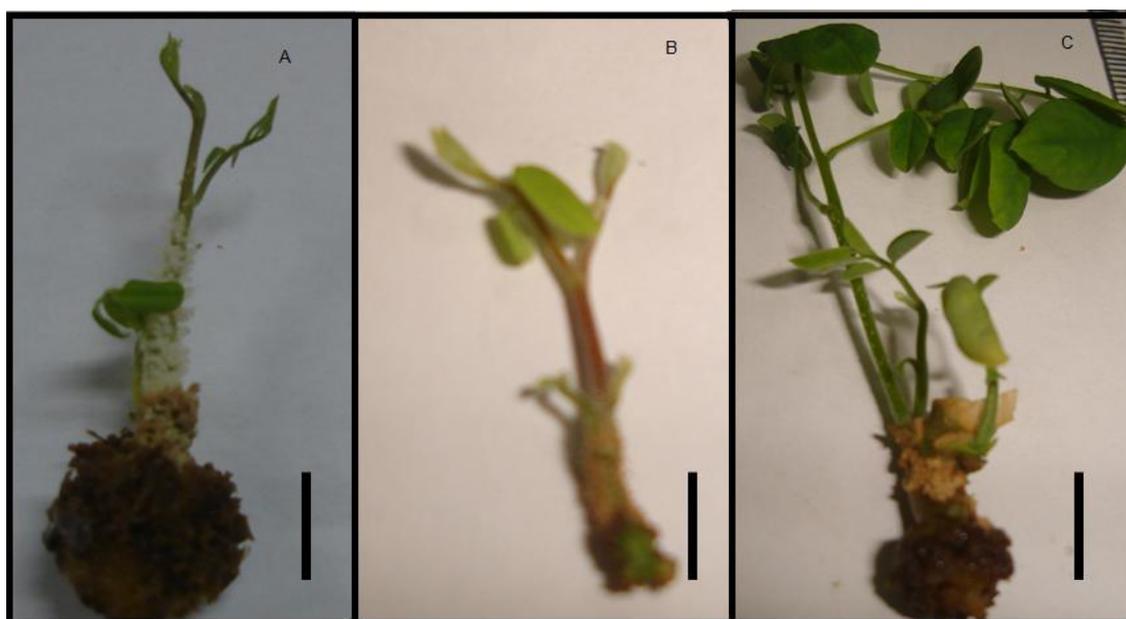


Figura 17. Brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (A), ápice caulinar (B) e segmento cotiledonar (C) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com 1 μM de TDZ. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

O número de brotos obtidos nesse experimento foi abaixo do esperado, já que o TDZ é uma potente substância com alta atividade citocinínica, sendo mais ativo em baixas concentrações do que o BAP, por isso recomendado para a fase de multiplicação (ERIG; SCHUCH, 2005; GRAÇA et al., 2001) e por ser muito efetivo na indução de brotações em espécies lenhosas (HUETTEMAN; PREECE, 1993). A grande efetividade do TDZ pode estar relacionada à sua alta atividade citocínica e a uma provável ação diferente das outras citocininas durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular (KANEDA et al., 1997).

Em algumas espécies de plantas lenhosas, tais como, *Hagenia abyssinica* (FEYISSA et al., 2005), *Pterocarpus marsupium* (HUSSAIN et al., 2007), *Cunninghamia lanceolata* (ZHU et al., 2007), concentrações menores que 1 μM do TDZ promoveram um número significativo de brotações. Já em *Malus domestica*, o número de brotos obtidos não diferiu estatisticamente entre as concentrações de 4,54 e 13,62 μM de TDZ. Em *Acacia crasscarpa*, a maior proliferação de brotos ocorreu com a combinação de 1,6 μM de TDZ mais 2,6 μM de ANA (YANG et al., 2006).

Para os explantes segmento nodal e segmento cotiledonar, o número de folhas por broto diminuiu linearmente com o aumento da concentração de TDZ. Em brotos oriundos do explante segmento nodal, o maior número de folhas observado (3,24 folhas/broto) foi encontrado em meio WPM suplementado com 1,0 μM de TDZ. Bem como para o explante segmento cotiledonar, em que o maior número de folhas observado (6,60 folhas/broto), também foi encontrado em meio WPM contendo 1 μM de TDZ (Figura 18).

Com relação aos explantes ápice caulinar e segmento cotiledonar não houve definição de uma curva de regressão representativa para a variável comprimento da parte aérea. Todavia, para o explante segmento nodal houve uma tendência linear decrescente para o comprimento da parte aérea e os brotos oriundos desse explante, bem como do explante ápice caulinar o comprimento da parte aérea não ultrapassou a média de 1 cm (Figura 19).

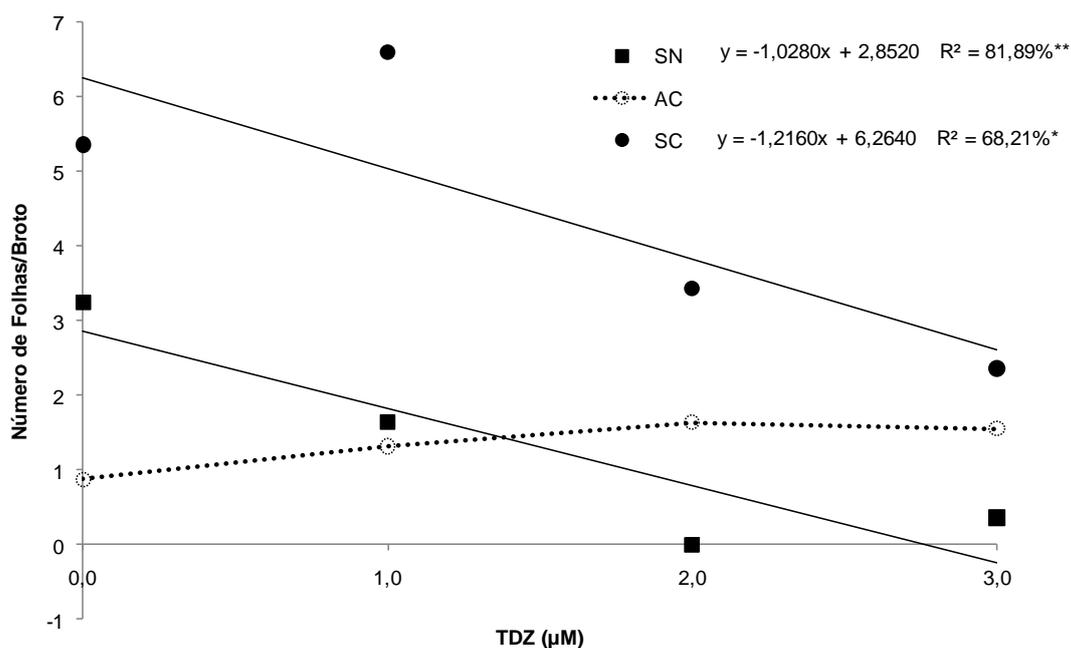


Figura 18. Número médio de folhas obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.

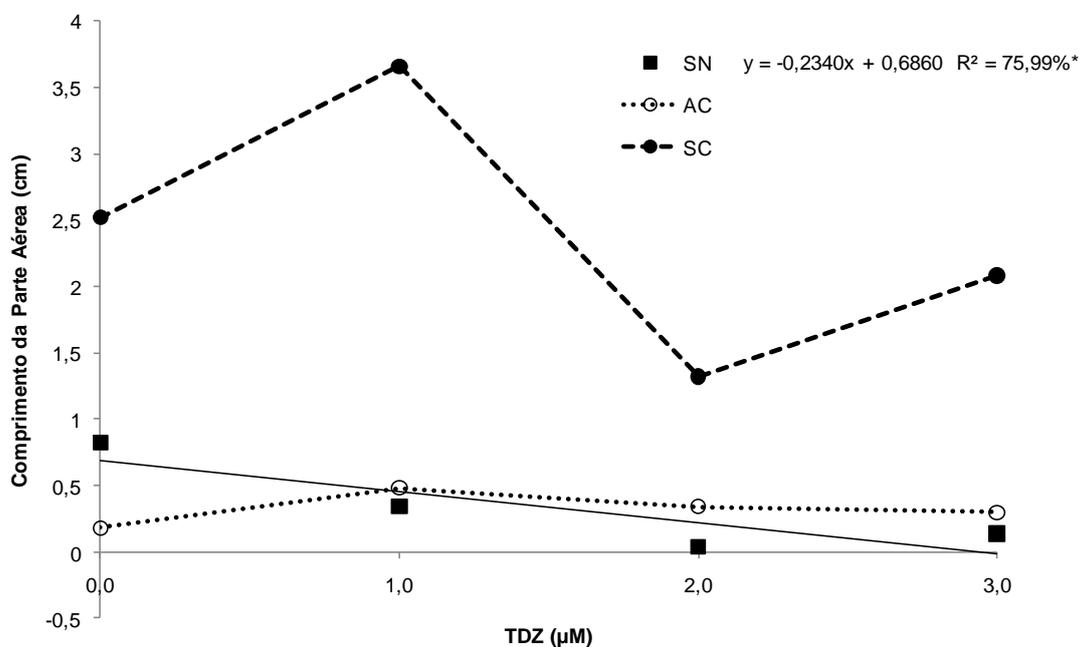


Figura 19. Comprimento da parte aérea de brotos obtidos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.

Em relação à variável matéria seca da parte aérea, houve uma tendência linear decrescente para os brotos obtidos do explante segmento nodal, sendo o maior incremento da matéria seca observado (4,02 mg), quando esse explante foi inoculado em meio WPM na ausência do TDZ. Contudo, o maior incremento de matéria seca (15,64 mg) ocorreu em brotos oriundos do explante segmento cotiledonar quando inoculado em meio de cultura contendo 1 μM de TDZ (Figura 20).

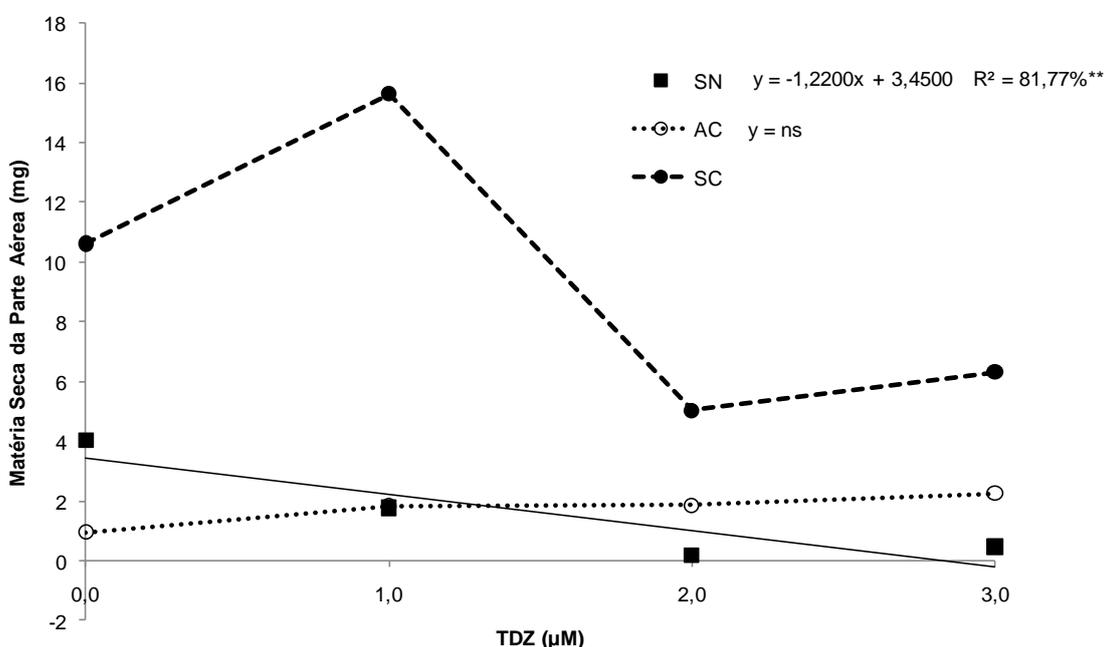


Figura 20. Matéria seca da parte aérea obtida a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.

Para a variável porcentagem de explantes responsivos, houve uma tendência ao aumento dos mesmos para os explantes ápice caulinar e segmento cotiledonar, quando inoculados em meio WPM sem TDZ até um máximo de explantes responsivos obtidos em meio com 1,0 μM de TDZ e depois um decréscimo até a concentração de 2,0 μM de TDZ. Já para o explante segmento nodal, houve uma tendência decrescente para a porcentagem de explantes responsivos desde a inoculação em meio WPM sem o TDZ até com 2,0 μM de

TDZ e, a partir desse ponto, houve um aumento no número dos mesmos. (Figura 21).

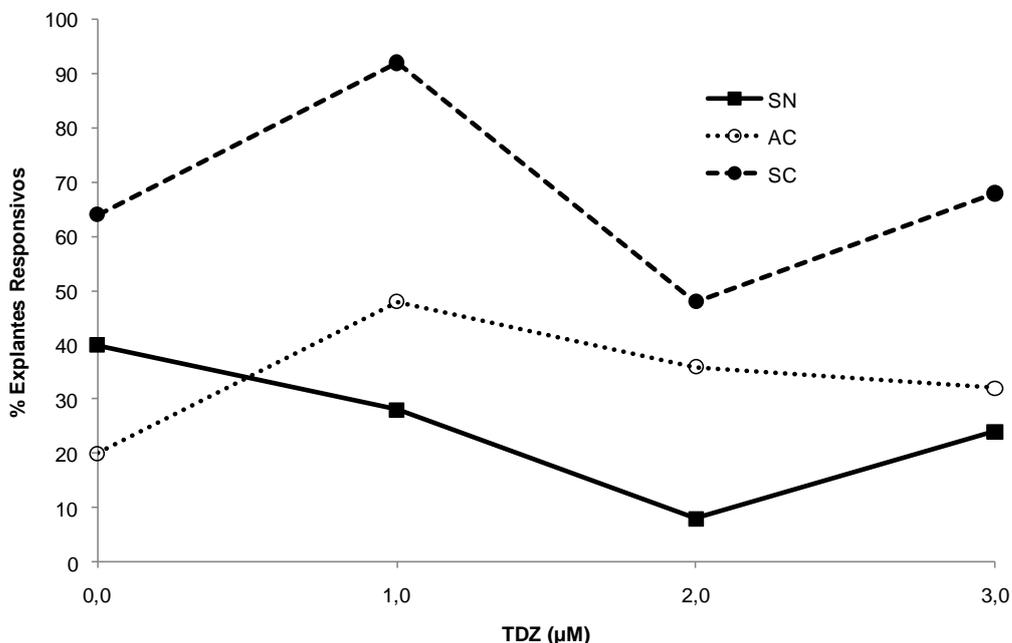


Figura 21. Porcentagem de explantes responsivos a partir dos explantes segmento nodal (SN), ápice caulinar (AC) e segmento cotiledonar (SC) de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de TDZ. Feira de Santana, 2009.

Os explantes folíolo e segmento internodal não demonstraram nenhuma competência morfogenética para emissão de brotos. Contudo, nos tratamentos com a presença da citocinina TDZ, o explante folíolo formou pequenos calos na base, onde seria a inserção com o pecíolo e também na face abaxial, que estava em maior contato com o meio de cultura (Figura 22).

Estes resultados podem estar relacionados à interação e balanço entre os fitorreguladores endógenos e os reguladores vegetais exógenos (ERIG; SCHUCH, 2005). Pois, as citocininas e auxinas endógenas do tecido vegetal apresentam efeito sinérgico na indução da divisão e diferenciação celular para o crescimento da planta, formação de seus órgãos e reconstituição de seus tecidos. O balanço interno de auxinas e citocininas constitui-se fator determinante na diferenciação celular e tipos de tecidos e órgãos formados. Se a proporção de auxina para citocinina aumenta, há a tendência de ocorrer maior formação de raízes, contudo, se a proporção de auxina para citocinina diminui, há a tendência

de ocorrer maior formação de brotos; porém, se for intermediária, há maior tendência de formação de calo. (VILLA et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006; KERBAUY, 2008). O TDZ é uma potente substância com efeito de citocinina para estimular calos em explantes lenhosos, especialmente quando usado em concentração igual ou superior a $1\mu\text{M}$ (HUETTMAN; PREECE, 1993).

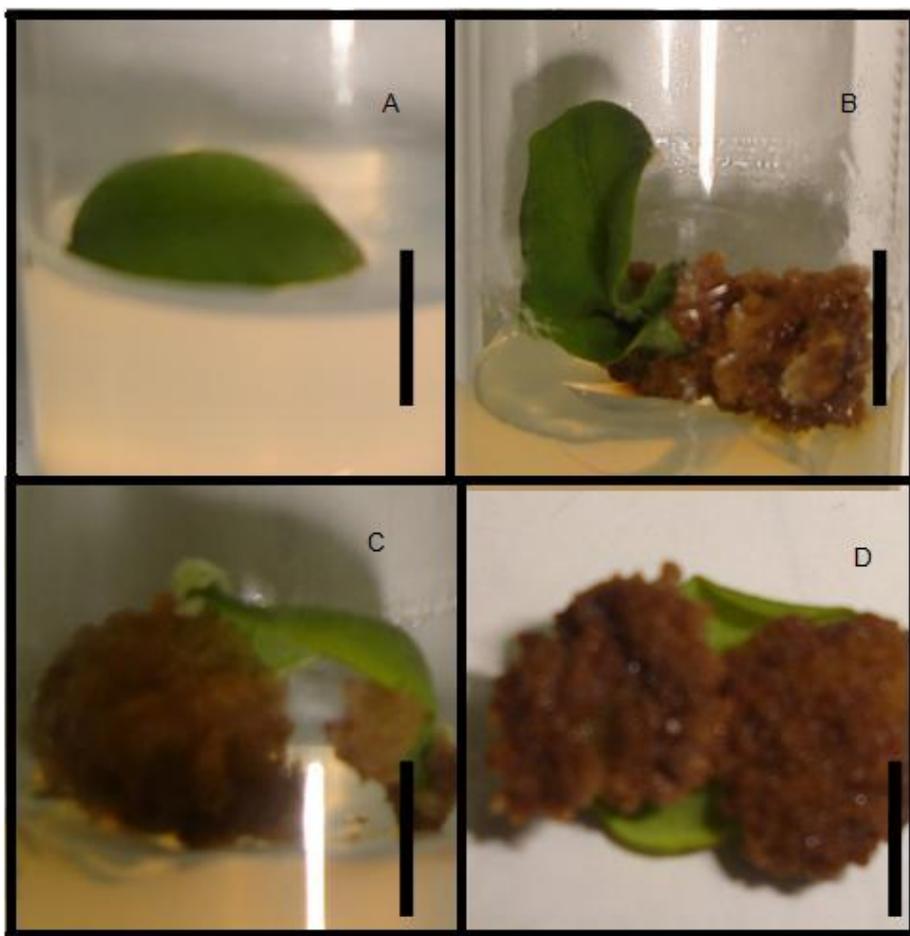


Figura 22. Explante folíolo inoculado em meio de cultura suplementado com 0,0 TDZ (A); $1,0\ \mu\text{M}$ TDZ (B); $2,0\ \mu\text{M}$ TDZ (C) e $3,0\ \mu\text{M}$ TDZ (D). A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

Os resultados obtidos nesse experimento podem estar relacionados com características genéticas da *A. cearensis*, além de que a morfogênese, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, requer uma constante regulação da divisão e diferenciação celular. Ambos os processos estão sob o controle dos reguladores vegetais auxinas e citocininas e, a aplicação do TDZ resulta em uma variedade de respostas em tecidos cultivados *in vitro*. Mas as bases bioquímicas e fisiológicas

da modulação da resposta morfogênica induzida pelo TDZ são ainda pouco compreendidas (MURTHY et al, 1998).

4.1.4 Efeito da idade do explante segmento cotiledonar na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

Observou-se efeito significativo ($p \leq 0,05$) da idade do explante segmento cotiledonar para a variável número de brotos, enquanto que para as variáveis comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea o efeito da idade do explante não foi significativo ($p \geq 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) em função da idade do explante segmento cotiledonar quando inoculado em meio WPM suplementado com 4,44 μ M BAP. Feira de Santana, 2009.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		NB ^z	CPA ^z	MSPA ^z
Idade	2	0,058026*	0,059799 ^{ns}	0,437482 ^{ns}
Resíduo	12	0,013901	0,032664	0,189729
CV%		6,87	12,22	18,65

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

^{ns} Não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$

O maior número de brotos/ explante foi obtido com o explante segmento cotiledonar oriundo de plântulas com idade de 45 dias. Entretanto, este resultado não diferiu estatisticamente do encontrado para as outras idades avaliadas, provavelmente por que o valor de F foi próximo a 5% (Tabela 7).

A idade do explante desempenha um papel significativo para a indução de múltiplos brotos em uma série de plantas (HUSSAIN et al, 2007), bem como a sua sensibilidade a um determinado regulador vegetal (OLMOS et al., 2004).

Os resultados encontrados neste experimento podem estar relacionados com o potencial genético da espécie. Os explantes mais aptos a clonagem são os mais jovens, pois à medida que a especialização avança durante o desenvolvimento do tecido ou órgão, a resposta aos estímulos fornecidos durante o cultivo se tornam menos intensas, diminuindo o número de divisões celulares e a capacidade de regeneração (XAVIER et al, 2002; PIERK, 1990).

Hussain et al (2007), demonstraram que segmento cotiledonar de *Pterocarpus marsupium* com 18 dias de idade foram os explantes que apresentaram maiores porcentagem de brotos. Já Feyissa et al (2005), em trabalhos com *Hagenia abyssinica*, encontraram que plantas de diferentes idades exigem diferentes concentrações de reguladores vegetais.

Tabela 7. Médias para a variável número de brotos por explante, em relação a idade do explante segmento cotiledonar inoculado em meio WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP. Feira de Santana, 2009.

Idade (dias)	Número de Brotos/explante
15	1,92 a ^z
30	1,60 a
45	2,36 a

^z Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

4.1.5 Influência do tipo de orientação e fragmentação do explante na multiplicação *in vitro* de *A. cearensis*.

Observou-se efeito significativo ($p \leq 0,05$) da interação “orientação x fragmentação” para a variável número de folhas. Para as variáveis, número de brotos, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea, observou-se efeito isolado da fragmentação e da orientação do explante (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) em relação a orientação (O) e fragmentação (F) do explante segmento cotiledonar quando inoculado em meio WPM suplementado com 4,44 μ M BAP. Feira de Santana, 2009.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		NB ^z	NF ^z	CPA ^z	MSPA ^z
O	1	0,072123*	0,551461**	0,523454*	0,783782*
F	1	0,604004**	0,362771*	0,948463**	7,999346**
O*F	1	0,011535 ^{ns}	0,362771*	0,160444 ^{ns}	0,338260 ^{ns}
Resíduo	16	0,014948	0,051843	0,036662	0,140959
CV %		10,11	19,53	14,84	22,31

** , * Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

^{ns} Não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$

O maior número de brotos bem como o maior comprimento e matéria seca da parte aérea e foi obtido quando o explante segmento cotiledonar foi inoculado inteiro no meio de cultura (Tabela 9).

Tabela 9. Médias para as variáveis número de brotos por explante (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA) em função da fragmentação do explante segmento cotiledonar inoculado em meio de cultura WPM suplementado com 4,44 μ M BAP. Feira de Santana, 2009.

Fragmentação do Explante	NB	CPA (cm)	MSPA (mg)
Inteiro	0,94 a ^z	1,36 a	4,76 a
1/2	0,08 b	0,19 b	0,16 b

^z Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

Quando um órgão completo é seccionado em pedaços, os vários segmentos diferem na sua capacidade morfogênica (SANTANA, 2003). Dessa maneira, um segmento de tecido cortado, pode favorecer a perda da unidade fisiológica, redistribuindo então, algumas substâncias, como por exemplo, auxinas

(HARTMANN et al., 1997). Cada porção isolada de uma planta tem sua própria reserva hormonal e um aumento da superfície de absorção pelo corte do explante pode aumentar também a absorção de nutrientes e reguladores (PIERIK, 1990).

A orientação vertical do explante segmento cotiledonar, demonstrou ser a mais favorável para as variáveis número de brotos/explante, comprimento e matéria seca da parte aérea (Tabela 10).

Tabela 10. Médias para as variáveis número de brotos por explante (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA) em relação à orientação do explante segmento cotiledonar inoculado em meio de cultura WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP. Feira de Santana, 2009.

Orientação do Explante	NB	CPA (cm)	MSPA (mg)
Vertical	1,27 a ^z	1,25 a	3,26 a
Horizontal	1,14 b	0,30 b	1,66 b

^z Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

No que se refere a variável número de folhas, os melhores resultados foram obtidos quando o explante segmento cotiledonar foi inoculado inteiro e na posição vertical (Tabela 11).

Tabela 11. Médias para a variável número de folhas por broto, em função da orientação e da fragmentação do explante segmento cotiledonar inoculado em meio de cultura WPM suplementado com 4,44 μ M de BAP. Feira de Santana, 2009.

Orientação	Fragmentação	
	Inteiro	1/2
Horizontal	0,00 B ^z a ^w	0,00 B a
Vertical	1,72 A a	0,14 A b

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

^w Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott.

A posição do explante sobre o meio de cultura parece desempenhar função importante na morfogênese *in vitro* (GEORGE, 2008). Em trabalhos com *Citrus reshni*, a orientação em que o explante foi inoculado no meio de cultura não demonstrou diferença significativa. É possível que esta resposta seja devido ao potencial genético desta espécie (SILVA et al., 2005). A quebra da dominância apical exercida pela auxina é provocada visando a obtenção de novas plantas, pois, a mudança na orientação do ápice, bem como a sua decaptação, favorecem a retomada de crescimento de gemas laterais (KERBAUY, 2008).

4.2 Enraizamento *in vitro* de brotos micropropagados de *A. cearensis*.

Observou-se efeito significativo ($p \leq 0,05$) da interação “carvão ativado x AIB” para as variáveis número de brotos enraizados, e efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) para as variáveis número de raiz por broto, comprimento da raiz e matéria seca da raiz (Tabela 12).

Tabela 12. Resumo da análise de variância para porcentagem de brotos enraizados (%BE), número de brotos enraizados (BE), número de raiz (NR), comprimento da raiz (CR) e matéria seca da raiz (MSR) em relação às diferentes concentrações de AIB e presença ou ausência de carvão ativado (CA). Feira de Santana, 2009.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		%BE ^w	BE ^z	NR ^z	CR ^z	MSR ^z
AIB	3	0.000709*	0,103356**	1,482308**	0,261643*	15,559874**
CA	1	0.000173 ^{NS}	0,015085 ^{NS}	0,229318**	0,053072 ^{NS}	3,625346**
AIB*CA	3	0.000507*	0,034753*	0,404871**	0,352224**	4,125961**
RESÍDUO	32	0.000128	0,009218	0,039405	0,061595	0,271236
CV(%)		1,09	7,67	13,24	15,97	23,09

*, ** Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

^{NS} Não significativo

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$

^w Dados transformados em arco seno $(\%)^{0,5}$

Para a variável número de brotos enraizados e porcentagem de brotos enraizados, na ausência de carvão ativado, a análise de regressão demonstrou comportamento quadrático em função da concentração de AIB. Os brotos enraizaram em meio WPM contendo desde as primeiras concentrações do regulador vegetal AIB e o enraizamento foi semelhante para as outras concentrações testadas do AIB (Figuras 23 e 24). A presença do carvão ativado, provavelmente inibiu o efeito do AIB. Resultados semelhantes foram encontrados por Erig et al (2004), trabalhando com *Pyrus serotina* cv. Carrick. Dzazio, Santos et al (2005) com *Caryocar brasiliense* e Erig et al, (2004) com *Pyrus communis*, em que a presença do carvão ativado não favoreceu o aumento do número de brotos enraizados. Já com *Copaifera angsdorffii* os tratamentos com e sem carvão ativado não diferiram estatisticamente entre si (NOLETO; SILVEIRA, 2004). E em trabalhos com *Cydonia oblonga* (Erig et al., 2004), a maior porcentagem de enraizamento foi observada em meio de cultura contendo 10 μ M de AIB.

Para a variável número de raiz por broto, a análise de regressão demonstrou comportamento quadrático em relação à concentração de AIB. O maior número de raiz por broto observado (3,12 raiz/broto) foi obtido em meio WPM suplementado com 10 μ M de AIB seguido do tratamento com 5 μ M AIB (2,52 raiz/broto) (Figuras 25, 26 e 27).

Resultados semelhantes foram relatados por Carvalho et al. (2005) em trabalho com *Bixa orellana*, em que o melhor resultado para a formação de raiz ocorreu na presença de 5 μ M de AIB e por Rocha et al. (2008), que relataram que a maior porcentagem de enraizamento em genótipos de *Genipa americana* ocorreu em 9,8 μ M de AIB, ambos na ausência de carvão ativado. Já o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta foi estatisticamente igual com e sem AIB (AUGUSTO et al, 2006). Existem várias evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada, pois há bastante variação entre as espécies (ASSIS; TEIXEIRA, 1999).

Espécies lenhosas, em geral, são beneficiadas com o uso de carvão ativado, entretanto, esta substância possui alta capacidade de adsorção e pode reter parte dos elementos que compõem o meio de cultura, inclusive substâncias promotoras do enraizamento, como provavelmente foi encontrado nesse experimento (ASSIS; TEIXEIRA, 1999).

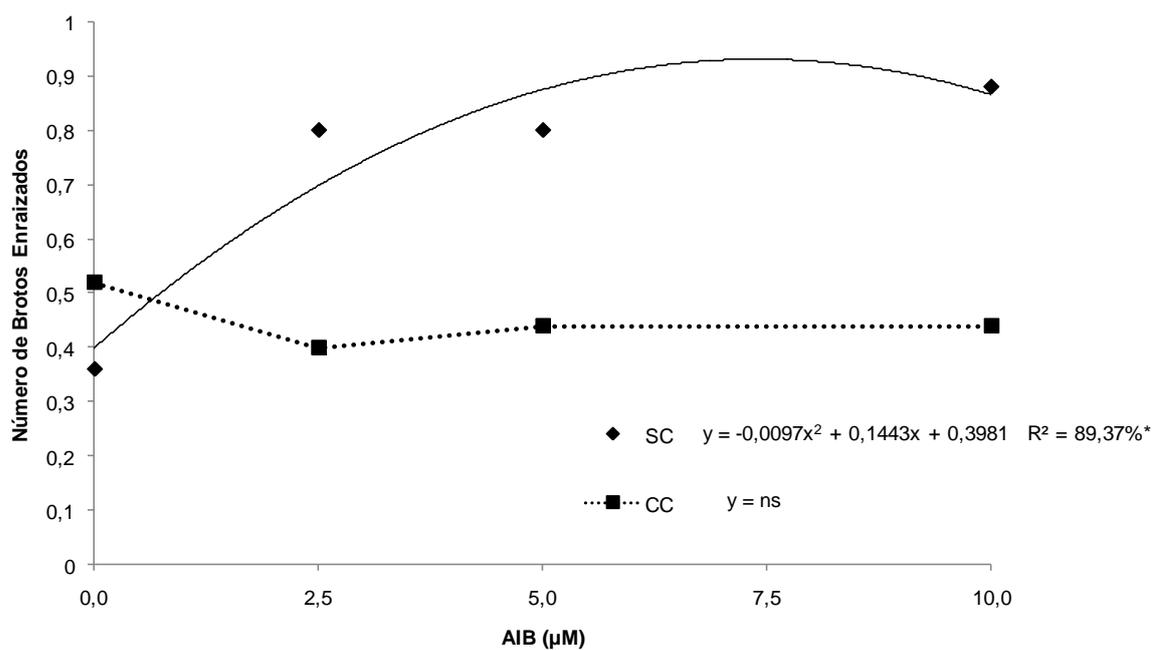


Figura 23. Número de brotos enraizados de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.

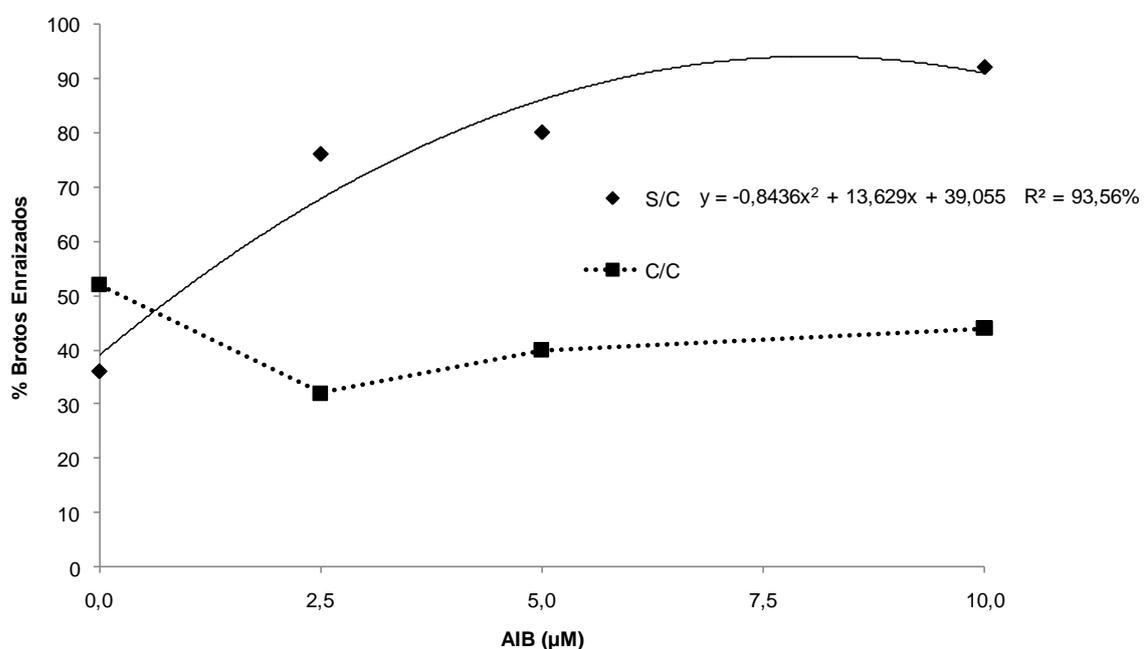


Figura 24. Porcentagem de brotos enraizados de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.

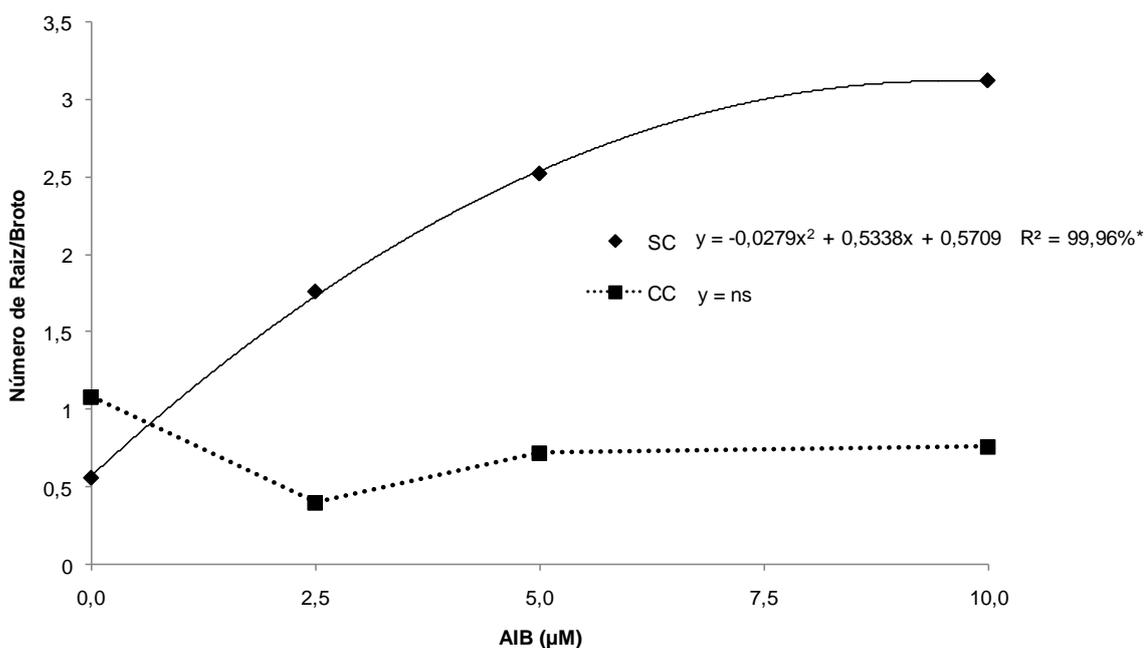


Figura 25. Número de raiz por broto de *A. cearensis* inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.

Para variável comprimento da raiz, a presença do carvão ativado não trouxe benefício. Observou-se apenas um pequeno acréscimo no comprimento da raiz quando os brotos foram inoculados em meio WPM sem carvão ativado e na presença da mais alta concentração de AIB testada (10 µM) (Figura 28).

Esses resultados diferem dos encontrados para outras espécies. Em *Garcinia indica*, uma importante planta medicinal, o maior comprimento das raízes (5,88 cm) foi obtido com 9,9µM de AIB (MALIK et al., 2005) e em *Caryocar brasiliense*, o maior número de raízes e o comprimento da maior raiz foi obtido em meio de cultura suplementado com 14,7µM de AIB (SANTOS et al., 2006).

Em relação à concentração de AIB, esses resultados são semelhantes aos encontrados para outras espécies, em que concentrações próximas a 10 µM de AIB favoreceram o comprimento das raízes (ROCHA et al., 2008; SANTOS et al., 2006; MALIK et al., 2005).

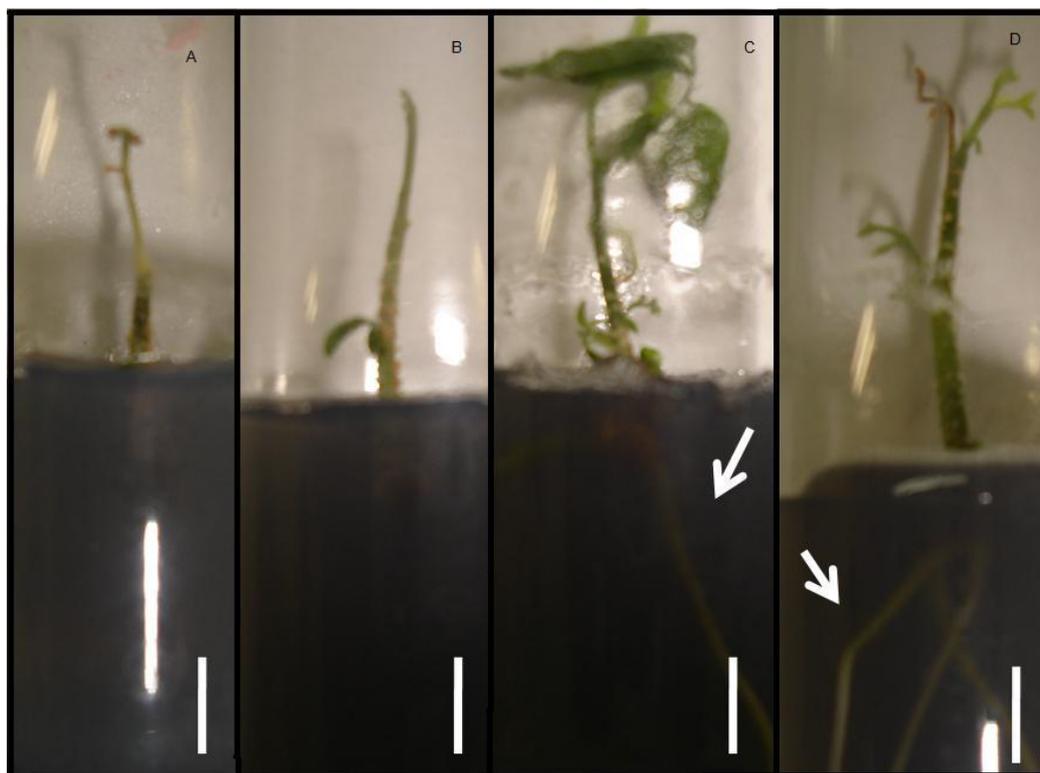


Figura 26. Brotos em meio de enraizamento (WPM + AIB + carvão ativado). (A) AIB 0,0 μM (A); (B) AIB 2,5 μM ; (C) AIB 5,0 μM e (D) AIB 10,0 μM . A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

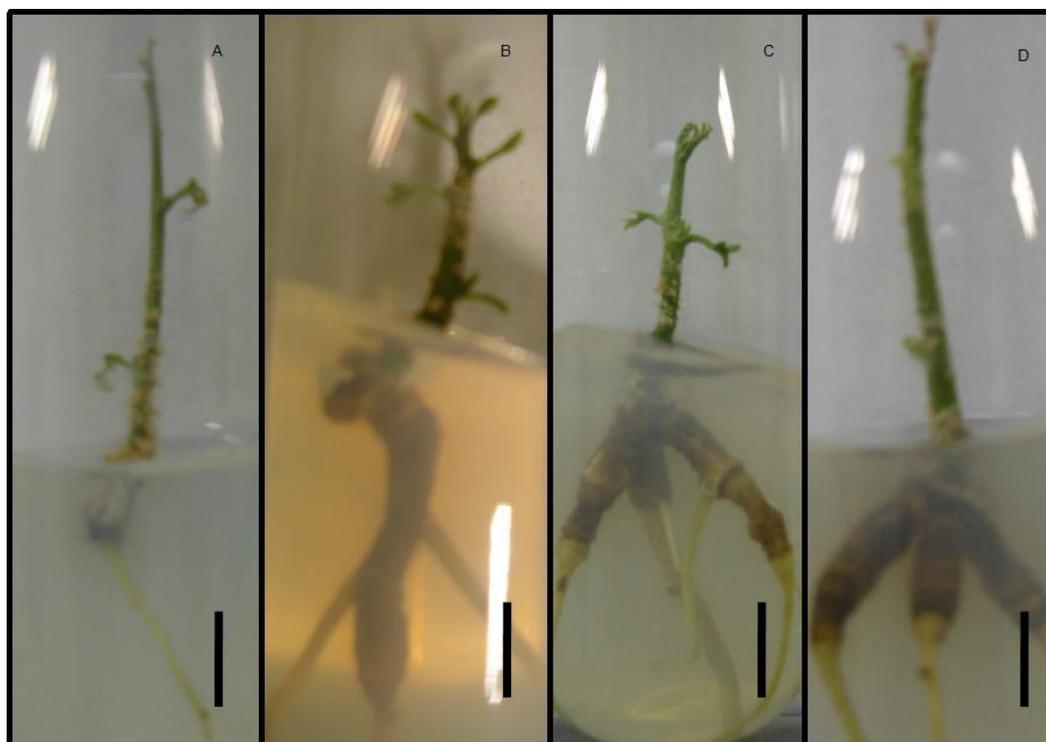


Figura 27. Brotos em meio de enraizamento (WPM + AIB). (A) AIB 0,0 μM ; (B) AIB 2,5 μM ; (C) AIB 5,0 μM e (D) AIB 10,0 μM . A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

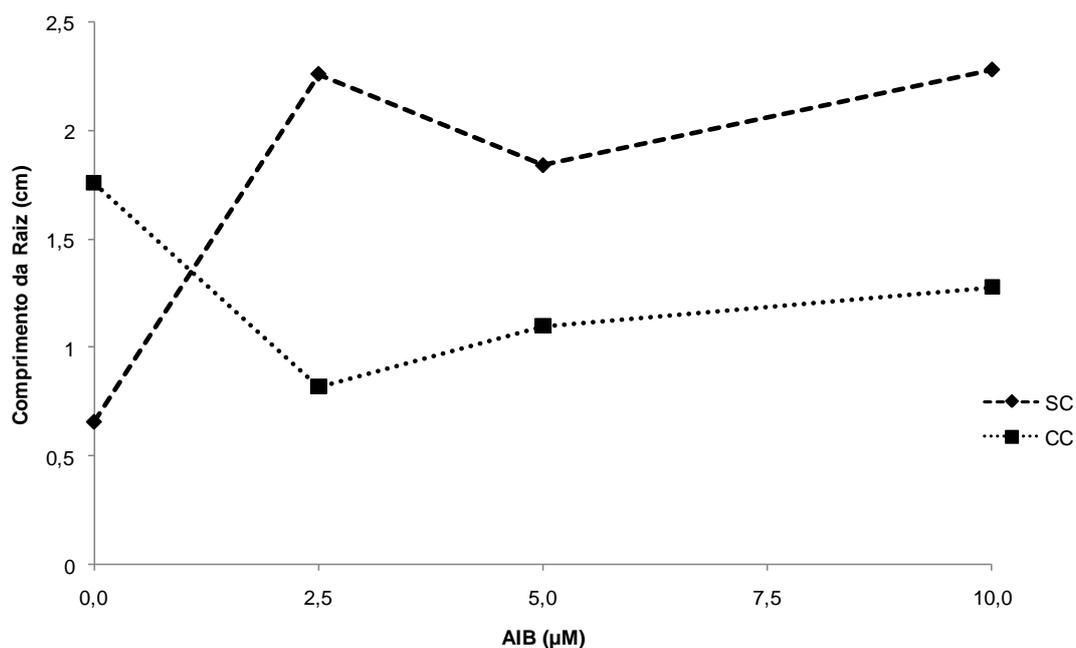


Figura 28. Comprimento da raiz por broto de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.

Para a variável matéria seca da raiz, a análise de regressão demonstrou comportamento linear nos tratamentos sem carvão ativado. O aumento da matéria seca nas raízes foi proporcional ao aumento da concentração de AIB e o maior incremento de matéria seca observado (17,32mg), ocorreu em meio com 10µM de AIB, seguido do tratamento com 5µM (9,38mg). Já nos tratamentos com a presença de carvão ativado, não foi encontrado significância do modelo ($p \geq 0,05$) para esta variável (Figura 29).

Rubin (2007) relata que o crescimento da raiz está intimamente relacionado às auxinas, que, além de promover a divisão celular nestes órgãos, juntamente com as citocininas, promovem o alongamento celular, com conseqüente produção de biomassa.

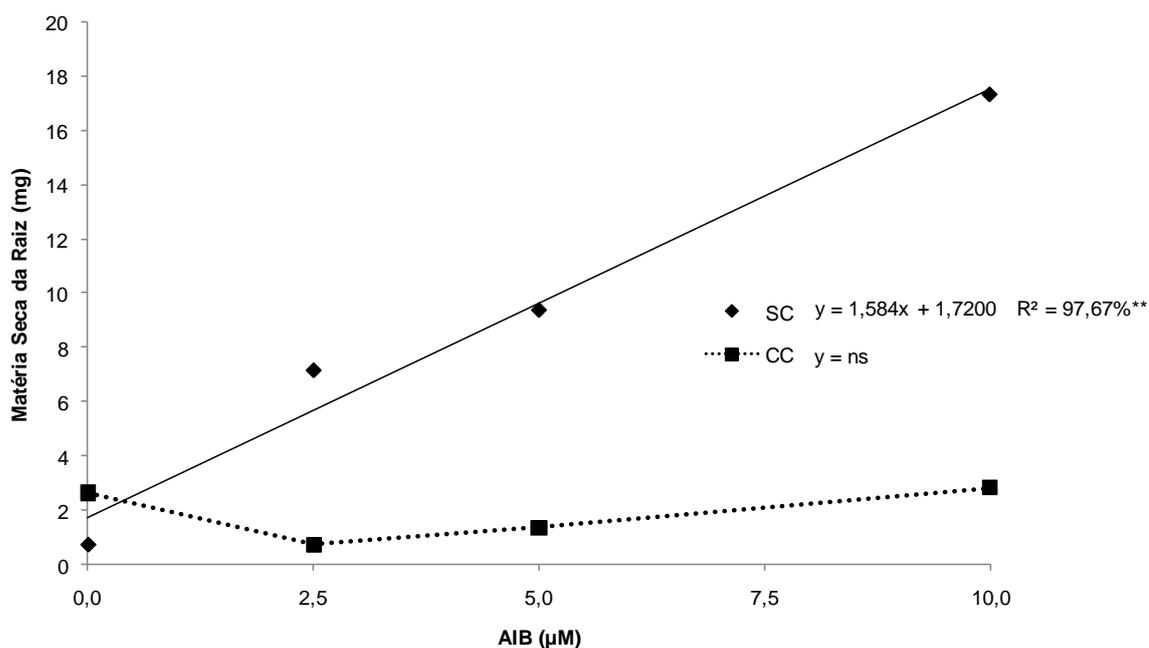


Figura 29. Matéria seca da raiz por broto de *A. cearensis*, inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de AIB e presença (CC) ou ausência (SC) de carvão ativado. Feira de Santana, 2009.

De maneira geral, as raízes são mais sensíveis as citocininas, mesmo em baixas concentrações, do que às auxinas. Baixas concentrações de auxina adicionadas ao meio de cultura induzem aumento na produção de raízes em plantas ou explantes, pois aumentam a razão endógena de auxina/citocinina nos tecidos. Contudo, concentrações mais elevadas de auxinas podem ser tóxicas à planta como um todo e mais ainda ao sistema radicular, que é mais sensível a este regulador vegetal do que outros órgãos da planta (TAIZ; ZEIGER, 2004; ROUT et al., 2005).

As pequenas variações nas respostas obtidas nesse experimento decorrem, certamente, do balanço hormonal interno que é particular de cada planta, bem como da competência de cada tipo de explante para desenvolver a resposta morfogênica (SANTOS et al., 2005).

4.3 Aclimatização de plantas micropropagadas de *A. cearensis*

Aos 60 dias do processo de aclimatização, foi observado 40% de sobrevivência das plantas (Figura 30). Estes resultados são semelhantes aos encontrados para outras espécies lenhosas como *Diospyrus kaki* (TELLES; BIASI, 2005), *Terninallia bellirica* (RAMESIL, 2005), *Parapiptadenia rígida* (NASCIMENTO, 2008), *Byrsonima basiloba* (LUIS, 2008) e *Stryphnodendren adstringens* (NICIOLI, 2008) em que taxas de aclimatização abaixo de 50% também foram relatadas.

A fase de aclimatização é muito delicada. Nesta etapa faz-se necessário, dentre outros fatores, o uso de substratos que lhe proporcione às plântulas condições para o seu desenvolvimento (NASCIMENTO, 2008). Outros fatores também podem afetar a sobrevivência das plantas obtidas por meio da cultura de tecidos, tais como o controle da perda de água, pela baixa umidade do ar relação às condições *in vitro* (SOUZA et al, 2006), a necessidade da planta passar de um regime heterotrófico para autotrófico (GRATTAPAGLIA;MACHADO, 1998), e o fato de que a morfologia interna das plantas regeneradas *in vitro* é diferente das cultivadas *ex vitro* (NASCIMENTO, 2008). Por isso, os brotos enraizados *in vitro* devem ser gradualmente submetidos às novas condições de sobrevivência, pois, as condições artificiais de cultivo, favorecem o desenvolvimento de plantas não preparadas para as condições externas (SOUZA et al, 2006; GRATTAPAGLIA;MACHADO, 1998). Por esses fatores, essa fase é considerada limitante para grande parte das plantas micropropagadas, devido a altas taxas de mortalidade que podem acarretar.

Assim, nesse estudo, apesar de ser possível a obtenção de plântulas a partir de segmento cotiledonar, sugere-se que novos estudos da fase de aclimatização sejam realizados avaliando, por exemplo, possibilidades de cultivo heterotrófico, bem como outras composições de substratos para uma possível otimização do processo de aclimatização de *A. Cearensis*.

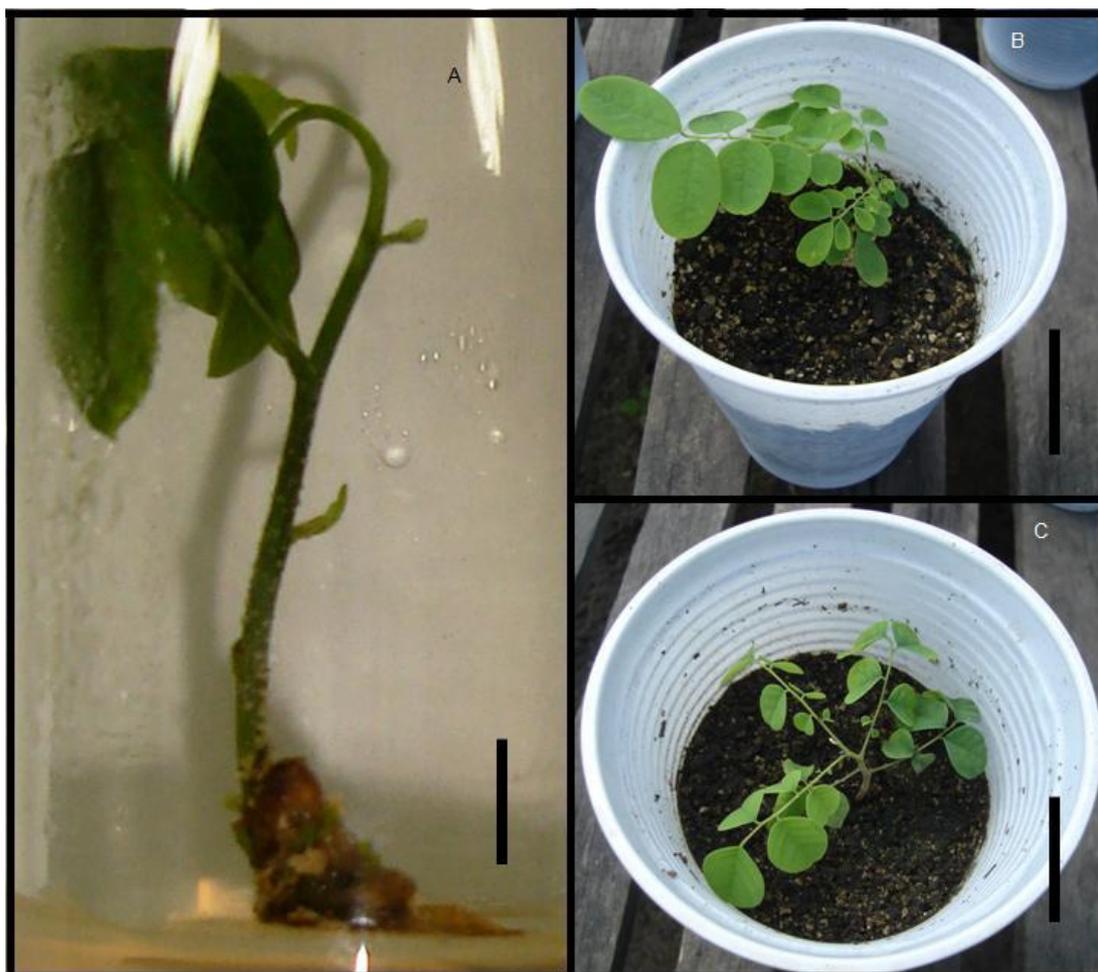


Figura 30. Planta de *A. cearensis* micropropagada *in vitro* (A) e mudas micropropagadas de *A. cearensis* em substrato (terra vegetal+vermiculita) (B e C) com 30 dias. A barra representa 1 cm. Foto: autora. Feira de Santana, 2009.

5 CONCLUSÃO

- a) A propagação clonal *in vitro* de *A. cearensis* é possível utilizando-se explantes oriundos de plântulas cultivadas assepticamente em meio de cultura WPM.
- b) O explante segmento cotiledonar demonstrou melhor competência organogênica na etapa de multiplicação.
- c) Um maior número de brotações pode ser obtido em meio de cultura WPM suplementado com baixas concentrações do regulador vegetal BAP.
- d) A presença de altas concentrações do regulador vegetal BAP reduziu o crescimento das brotações.
- e) A idade do explante segmento cotiledonar, não interferiu na multiplicação *in vitro*.
- f) A multiplicação *in vitro* de *A. cearensis* é favorecida quando o explante segmento cotiledonar é inoculado inteiro na posição vertical.
- g) O TDZ nas concentrações utilizadas provavelmente teve um efeito fitotóxico e por isso não foi eficaz na indução de brotos.
- h) A presença do AIB favoreceu a emissão de raízes.
- h) O carvão ativado, na concentração em que foi utilizado (1g/L) não foi eficiente na promoção do enraizamento.
- i) Os explantes folíolo e segmento internodal não apresentaram capacidade organogênica na presença dos reguladores vegetais utilizados nesse trabalho.
- j) A aclimatização das mudas de *A. cearensis* não foi eficiente nas condições testadas.

Com a realização desse trabalho foi possível a obtenção de um protocolo de propagação *in vitro* de *Amburana cearensis*, indicando possibilidades viáveis e concretas para futuros trabalhos com esta espécie. Entretanto, sugere-se ajustes na etapa de aclimatização a fim de se obter uma maior porcentagem de sobrevivência das mudas micropropagadas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. S. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.1, p.27 -38, 2005.

ALVES, E. C. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.643–653, 2004.

AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais. **Biociência**, a.6, n.30, p. 55–59, 2003.

AMERICAS REGIONAL WORKSHOP. *Amburana cearensis*. In: **IUCN, 2003**. IUCN Red List of threatened Species (www.redlist.org/search/details.php?species=32291).

AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. In vitro propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.96, p.273–278, 2009.

ANDRADE, A. L. P. **A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no parque estadual do Guartelá, município de Tibagi, Estado do Paraná**. 2008. 1v. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Botânica), Universidade Federal do Paraná.

ANDRADE W. F. de, ALMEIDA, M. de; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo da banzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1715-1719, 2006.

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

ASSIS, F. T.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

AUGUSTO, C. S. S., BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 3, v.28, p. 473-476, 2006.

AQUINO, F. W. B. et al., Phenolic compounds in Imburana (*Amburana cearensis*) powder extracts. **Eur Food Res Technol**, n.221, p.739–745, 2005.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v.3. Viçosa: UFV, 1991. 326p.

BENNETT, I. J. et al. Alternating cytokininis in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globules* Labill. **Annals of Botany**, n. 74, p. 53-58, 1994.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. Plant tissue culture: theory and practice. Amestardam: Elsevier, 1983. 512p. *apud* NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de Copaíba. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 109–120, 2004.

BONGA, J. M.; ADERKAS, P. VON. **In vitro Culture of Trees**. v.38. Forestry sciences,1992.

BUENDÍA-GONZÁLEZ, L. et al. Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston) via cotyledonary nodes. **In vitro Cell Developmental Biology–Plant**, v.43, p.260-266, 2007.

BOPANA, N.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. **In Vitro Cell Developmental Biology–Plant**, v.44, p.525-532, 2008.

BURDYN, I. et al. Direct shoot regeneration from leaf and internode explants of *Aloysia polystachia* [Gris.] Mold. (Verbenaceae). ***In vitro Cell Developmental Biology–Plant***, v.42, p.235-239, 2006.

CALDAS, L. S., HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Química Nova**, v.29, n. 6, p.1241–1243, 2006..

CARVALHO, J. F. P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. Regeneração *in vitro* de Urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p. 887–895, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 640p.

CASTELLETTI, C. H. M et al. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: SILVA, J. M. C; TABARELLI, M.; FONSECA, N. T.; LINS, L. V. (orgs.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Brasília, DF, 2004. p. 91–100.

CERDAS, L. et al. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista Biologia Tropical**, v.46, n.2, p.225-228, 1998.

CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Micropropagação do paricá. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 78–82, 2002..

COSTA, G. M. **Micropropagação de *Erythrina velutina* Willd. (Mulungu)**. 2008. 1v. 64f. Dissertação (Mestrado-Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana.

CUNHA, M. do C. L.; FERREIRA, R. A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A. C. Smith– Cumaru-Leguminosae Papilionoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.2, p.89 – 96, 2003..

CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. 1v. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

DAI, H. et al. Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br). **In vitro Cell Developmental Biology-Plant**, v.42, p.2-8, 2007.

DATTA, M. M.; MAJUMDER, A.; JHA, S. Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.). **Plant Cell Reports**, v.25, p.11-18, 2006..

DODE, L. B. et al. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 435-437, 2003.

DUTRA et al. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.1, p. 220-223, 2004.

ERIG, A. C., SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. da C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para pereira. **Scientia Agraria**, n.12, v.5, p.61-68, 2004..

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.3, p. 575-581, 2005.

ERIG, A. C.; SHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p. 275-277, 2004.

FAISAL M., SIDDIQUE I.; ANIS M. An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L. (dc.) Using cotyledonary node explants. **In vitro Cell Developmental Biology-Plant**, v. 42, p.59-64, 2006..

FELIX, R. A. Z. **Efeitos da *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith em aspectos fisiológicos da germinação de sementes**. 2007. 1v. 83p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

FERREIRA, D. F. **Sisvar** – Versão 5.0 DEX/UFLA – Lavras, MG, 2003.

FERRI, J. **Micropropagação e desenvolvimento vegetativo do mirtilo**. 2008. 1v. 56f. Dissertação (Mestrado em fruticultura de clima temperado), Universidade Federal de Pelotas.

FEYISSA, T.; WELANDER, M.; NEGASH, L. *In vitro* regeneration of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J. F. Gmel. (Rosaceae) from leaf explants. **Plant Cell Reports**, v.24, p.392-400, 2005.

GE, X.; CHU, Z.; LIN, Y.; WANG, S. A tissue culture system for different germplasms of indica rice. **Plant Cell Reports**, n.25, p.392–402, 2006.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. The Technology. 3ed. Ed. Exegetics Limited, Edington, Wilts, London, 2008.504p.

GIRI, C. et al. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v.18, n.2, p.115-135, 2004.

GIULIETTI, A. M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J. M. C; TABARELLI, M.; FONSECA, N. T.; LINS, L. V. (orgs.).

Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação.

Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Brasília, DF. 2004. p. 48–90.

GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação “in vitro” de brotações de *Eucalyptus Dunnii* Maid. **Bol. Pesq. Fl.**, n.43, p.107-112, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998..

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material didático de apoio à disciplina de biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <www.cca.ufsc.br/lfldgv/Apostila.htm> Acesso em 14 de Junho de 2008.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

GUO, B.; LIU, C. Z. *In vitro* propagation of na endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 261–265, 2007.

HARRY, I.S.; THORPE, T.A. In vitro culture of forest tres. In: VASIL, J.K.; THORPE, T.A. (eds). *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht, 1994. Cap.21, p.539-560. *Apud* CYSNE, J. R. B. **Propagação in vitro de *Moringa oleifera* L.** 2006. 1v. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará..

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. Upper Saddle River, New Jarsey: Prentice Hall, 1971. 847p.

HIKS, G. S. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. ***In vitro Cell Developmental Biology - Plant***, v.30, p.10–15, 1994.

HILTON-TAYLOR, C. (compiler) 2000. **2000 IUCN Red List of Threatened Species**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Disponível em: <www.biodiversitas.org.br/listasmg/iucn.pdf> Acesso em 20 de Agosto de 2007.

HINOJOSA, G. F. **Auxinas**. In: CID, L. P. B. (EDT). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180p.

HIREGOUDAR, L. V. et al. Multiple shoot induction and plant regeneration of *Feronia limonia* (L.) Swingle. ***Scientia Horticulturae***, v.98, p.357-364. 2003

HUBNER, H. I., et al. Multiplicação *in vitro* de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. (Apocynaceae). ***Acta Scientiarum. Health Science***, Maringá, v.29, n.1, p. 63-66, 2007.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.33, p.105-119, 1993.

HUSAIN, M. K.; ANIS M.; SHAHZAD A. In vitro propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. ***In Vitro Cell Developmental Biology–Plant***, v.43, p.59–64, 2007.

HUSSAIN, T.M. et al. *In vitro* propagation of *Crotolaria verrucosa* L. an important ethnobotanical plant. ***Journal of Medicinal Plants Research***, n. 29, p. 242-245, 2008.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Ecosistemas brasileiros: Caatinga**. Disponível em: <www.ibama.gov.br/ecossistemas/caatinga.htm> Acesso em 10 de Janeiro de 2009.

IBAÑES, A. et al. Influence of cytokinins and subculturing on proliferation of single-axillary-bud microcuttings of *Vitis vinifera* L. cv Napoleon. **Anales de Biología**, v. 25, p. 83-90, 2003..

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapas de biomas e vegetação**. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=169> Acesso em 10 de Janeiro de 2009.

IPEF. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. **Identificação de espécies florestais**. Acesso em:<www.ipef.br/identificacao/amburana.cearensis.asp> Acesso em 10 de Janeiro de 2009.

IUCN. Lista da flora ameaçada de extinção com ocorrência no Brasil. Disponível em: <www.biodiversitas.org.br/floraBr/iucn.pdf> Acesso em 25 de Setembro de 2008.

JEONG, M. J. et al. High frequency plant regeneration following abnormal shoot organogenesis in the medicinal tree *Hovenia dulcis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 58-65, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

JUNGHANS, T.; SANTOS-SEREJO, J.A dos. Obtenção e Manuseio de Explantes. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.(Eds.). **Introdução à Micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 99-114.

JÚNIOR, N. B., SORBOSA, R DE C.; MARTINS-CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, v. 28, n.4, p.493-498, 2004.

KANEDA, Y. et al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p. 8–12, 1997.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol.2. Brasília: Embrapa, 1999. P.519-531.

KIM, MEE-SOOK, SCHUMANN, C. M.; KLOPFENSTEIN, N. B. Effects of thidiazuron and benzyladenine on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.48, p.45–52, 1997.

KUMAR RAVINDRA, SHARMA, KULDEEP; VEENA, AGRAWAL. In vitro clonal propagation of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall. Through nodal explants from mature trees. **In vitro Cell Developmental Biology-Plant**, v.41, p.137-144, 2005.

LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Biodiversidade**, v.1, n.1, p.139 -146, 2005.

LEAL, L. K. M. **Contribuição para validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo**. 2006.. 1v. 178p. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará.

LEITE, E. J. State – of – knowledge on *Amburana cearensis* for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**, v.13, p.49–65, 2005.

LEITZKE, L. N. Micropropagação fotoautotrófica de amoreira-preta (*Rubus* spp) e framboeseira(*Rubus ideaus* L.) com a utilização de luz natural. 2007. 1v. 71f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de clima temperado), Universidade Federal de Pelotas.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**, v.15, p.415, 1980.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 298p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum., 2008. 544p.

LUIS, Z. G. **Propagação *in vitro* e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Brysonima basiloba*, Juss. Malpighiaceae)**. 2008. 1v. 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília.

MACIEL, A. L. de R.; SILVA, A. B. da PASQUAL, M. Aclimação de Plantas de Violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.9-12, 2000.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª Ed. São Paulo: D e Z computação gráfica e editora, 2006.

MANO, A. R. O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão – preto e carrapicho**. 2006. 1v. 102f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Ceará.

MELO, J. T. et al. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado. *In*: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.). **Cerrados Ambiente e Flora**. Planaltina: EMBRAPA CPAC, 1998. 556p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). BRASIL. **Instruções normativas**. Disponível em: www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/arquivos/83_19092008034949.pdf >. Acesso em 09 de Novembro de 2008.

MROGINSKI, L. et al. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *In*: ECHENIQUE, V. et al. **Biotecnología y mejoramiento vegetal**. INTA: Consejo Argentino para La Información y El Desarrollo de La Biotecnología, 2004. p.35-42.

MURCH, S. J. et al. In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, p.63–68, 2004.

MURTHY B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA P. K. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cell Developmental Biology–Plant**, v.34, p.267-275, 1998.

NAIR, L. G.; SEENI, S. *In vitro* multiplication of *Calophyllum apetalum* (Clusiaceae), an endemic medicinal tree of the Western Ghats. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p. 169-174, 2003.

NALAWADE, S. M. et al.. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.44, p.79–98, 2003.

NASCIMENTO, P. K. V. **Regeneração in vitro de Parapitadenia rígida (Bentham) Brenan**. 2008. 1v. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria.

NAYAK, PRANATI; BEHERA, P. R.; MANIKKANNAN, THIRUNAVOUKKARASU.. High frequency plantlet regeneration from cotyledonary node cultures of *Aegle marmelos* (L.) Corr. ***In vitro Cell Developmental Biology–Plant***, v.43, p.231-236, 2007.

NEGRI, G. et al. Chemistry of the stem bark of *Amburana cearensis* (Allemão) (A. C. SM.). ***Revista Brasileira de Plantas Mediciniais***, v.6, n.3, p.1-4, 2004.

NICIOLI et al. Ajuste no processo de micropropagação do barbatimão. ***Ciência Rural***, v. 38, n.3, p.685-689, 2008.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de Copaíba. ***Biociência e Desenvolvimento***, n.33, p.109–120, 2004.

NORMANLY, J. Auxin metabolism. ***Physiology Plant***, v.100, p. 431-442, 1997.

NUNES, E. C. et al. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.70, p. 259-268, 2002.

OLIVEIRA, A. J. B. et al. *In vitro* multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). ***Revista Árvore***, v.27, n.4, p.421–425, 2003.

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal. ***Boletim de Biotecnologia***, n. 66. P. 22-27, 2000. Disponível em: <www.dequim.ist.utl.pt/bbio> Acesso em: 04 de Julho de 2009.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. Micropropagación. *In: Echenique V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L.(Eds.) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte V: Métodos de propagación y conservación de germoplasma.* 2004. Disponível em: <www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/biotec.htm> Acesso em: 03 de Julho de 2009.

PANDEY, S. et al. Shoot initiation and multiplication from a mature tree of *Terminalia arjuna* Roxb. **In vitro Cell Developmental Biology – Plant**, v.42, p.389-393, 2006.

PARK, S. Y. et al. Micropropagation of *Salix pseudolasiogyne* from nodal explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.93, p.341-346, 2008.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**.Lavras: FAEPE/UFLA, 2001.127 p.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p. 44 – 48, 2002..

PIERIK, R. L. M. **In vitro cultura of higher plants**. 4ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997, 348p.

PINTO, J. E. B. P. et al. Uso de explantes e concentrações de benzilminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyra coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.6, p.876–873, 1994.

POZO, J. C. et al. Hormonal control of the plant cell cycle. **Physiologia Plantarum**, v. 123, issue 2 p. 173-183, 2005.

PRADHAN C. et al. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. Through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. **Plant Cell Reports**, v.18., p.122–126, 1998.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: Leal, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. pp. 3-73. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.

PRATHANTURARUG, S. et al. An improved protocol for micropropagation of *Mallotus repandus*. ***In vitro Cell Developmental Biology-Plant***, v.43, p.275-279, 2007.

PREECE, J. E. et al. Micro and cutting propagation of silver maple I. Results with adult and juvenile propagules. ***Journal American Society Horticulture Science***, v.116, n.1, p. 142-148, 1991.

PURKAYASTHA, J. et al. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. ***In vitro Cell Developmental Biology-Plant***, v.44, p.442-447, 2008.

QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M. Nordeste Semi-Árido: caracterização geral e lista das fanerógamas. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. (eds.). ***Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi – árido Brasileiro***. Recife: Associação de plantas do Nordeste. Vol. I. Instituto do Milênio do Semi – Árido, Associação Plantas do Nordeste, Ministério da Ciência e Tecnologia, Recife, 2006. p. 15–364.

RAJESWARI, V.; PALIWAL, K. *In vitro* of *Albizia odoratissima* L. F. (Benth.) from cotyledonary node and leaf nodal explants. ***In vitro Cell Developmental Biology-Plant***, v.42, p.399-404, 2006.

RAMESH, M. Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb. – a sericulture and medicinal plant. ***In vitro Cell Developmental Biology-Plant***, v.41, p.320-323, 2005.

RAMESIL, M. et al. Micropropagation of *Terminalia bellirica* roxb. – a sericulture and medicinal plant. ***In vitro Cell Developmental Biology-Plant***, v.41, p.320–323, 2005.

RAMOS, K. M. O. et al. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta Botânica Brasílica**, v.18, n.2, p.351–358, 2004.

RESERVA DA BIOSFERA DA CAATINGA. **O bioma da Caatinga**. Disponível em: <www.biosferadacaatinga.org.br/o_bioma_caatinga.php> Acesso em 10 de Janeiro de 2009.

RIBAS, L. L. F. et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba - Rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.517–524, 2005.

ROCHA, M. A. C. da et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenippeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, n.3, v.30, p.769-774, 2008.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v.31, n.1, p. 43–50, 2007.

ROGALSKI, M., GUERRA, M. P.; SILVA A. L. DA. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'santa rosa':efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n.2 v.25, p. 365-367, 2003..

ROUT, G. R. Micropropagation of *Clitoria ternatea* Linn. (Fabaceae) – an importante medicinal plant. **In vitro Cell Developmental Biology - Plant**, v.41, p. 516–519, 2005.

RUBIN, S. Propagação *in vitro* e caracterização molecular de genótipos do gênero *Alternanthera*. 2007. 1v. 88f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal), Universidade Federal de Pelotas..

SABÁ, R. T. et al. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.106-109, 2002.

SALIS, S. M.; CRISPIM, S. M. A. Densidade de árvores listadas como ameaçadas de extinção na Bacia do Alto Paraguai. **Comunicado técnico 54**. Corumbá – MS: EMPRAPA, 2006.

SANATOMBI, K.; G. J. SHARMA. Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. **Scientia Horticulturae**, v.26, p.96-99, 2007.

SANTANA, J. R. F. de. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de Annonaceae**. 2003. 1v. 237p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTANA, J. R. F.; LIMA-BRITO, A.; BELLINTANI, M. C. Cultura de tecidos vegetais: micropropagação e conservação de germoplasma do Semi-Árido In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. (eds.). 2006. **Recursos Genéticos do Semi-Árido Nordestino**. Recife: Associação de plantas do Nordeste. Vol. I. Instituto do Milênio do Semi – Árido, Associação Plantas do Nordeste, Ministério da Ciência e Tecnologia, Recife, 2006. p. 125-136.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cam.).**Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 2, v.28, p.293-296, 2006..

SANTOS-SEREJO, J. A., et al. Meios Nutritivos para Micropropagação de Plantas. In: SOUZA, A. S. & JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz da Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.152p.

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

SCHMILDT, O. et al. **Multiplificação in vitro de ramos de mamoeiro ‘tainung 01’ em diferentes níveis de sulfato de adenina**. p.290-292. Disponível em: <

www.fundagres.org.br/downloads/pi.../2007_biotechnologia_06.pdf > Acesso em 04 de Julho de 2009.

SCHOENE, G.; YEAGER, T. Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, p. 271-277, 2005.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M. & SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. UFPE: Recife, 2003. p. 777–796.

SILVA, R. P. et al. Otimização de protocolos para regeneração de plantas in vitro de tangerina “cleópatra” (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, n.3 v.27,p.484-487, 2005.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Simposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p. 1048–1053, 2007.

SOUZA, A. da S. et al. Introdução à Cultura de Tecidos de Plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.(Eds.). **Introdução à Micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 11-37.

SOUZA, A. V. et al. Germinação de embriões e multiplicação in vitro de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência & Agrotecnologia**, Edição Especial, p.1532-1538, 2003.

SOUZA, F. D. V. et al (a). Micropropagação. In: SOUZA, A. S. & JUNGHANS, T. G. 2006. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz da Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.152p.

SOUZA, F. D. V. et al (b). Aclimatização. In: SOUZA, A. S. & JUNGHANS, T. G. 2006. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.152p.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. Írapuã. **Ciência Rural**, v.36, n.6, 2006.

SUGLA, TWINKLE et al. Micropropagation of *Pongamia pinnata* through enhanced axillary branching. **In vitro Cell Developmental Biology–Plant**, n.43, p.409-414, 2007.

TAGLIACOZZO, G. M. D. Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro*. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto agrônomo, 1998.

TAIZ, I.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. 2006. 719p.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Palestra. Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia, simpósios, 2001. Disponível em: <<http://www.redbio.org>>. Acesso em: 16 de Maio de 2009.

TELLES, C. A.; BIASI, L. A. Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa-de-vegetação do caquizeiro (*Diospyros kaki* L.). **Ciência & Agrotecnologia**, n.2, v.29, p.481-484, 2005.

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

THAKUR, R. C.; KARNOSKY, D. F. Micropropagation and germoplasma conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia*) Jacq. 'A/Ross Central Park') trees. **Plant Cell Reports**, v.26, p.1171-1177, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da Cultura de Tecidos de Plantas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol.1..Brasília: Embrapa, 1998. p.11-20.

TREVISAN, M. T. S.; MACÊDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v.36, n.3. p. 301–304, 2003.

TROVÃO, D. M. B. M. et al. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.3, p.307–311, 2007.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. (orgs.). **Glossário de Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 62p.

VANEGAS, P. E. et al. .Plant regeneration via organogenesis in marigold. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.279–283, 2002.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar brazos. **Ciência & Agrotecnologia**, v.30, n.2, p.266-270, 2006.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência & Agrotecnologia**, v.29, n.3, p.582-589, 2005.

WWF. World Wide Fund for Nature. **Caatinga**. Disponível em: <www.wwf.org.br/natureza_brasileira/biomas/bioma_caatinga/index.cfm> Acesso em 10 de Janeiro de 2009.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I**: princípios e técnicas de propagação vegetativa. Viçosa: Editora UFV, 2002, 64p. (Caderno didático)

YANG, M. et al. Plant Regeneration from phyllode explants of *Acacia crassicarpa* via organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p-241-245, 2006.

ZHU, M. et al. Efficient organogenesis and plantlet regeneration in the timber species *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. **In vitro Cell Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 449-455, 2007.