

SILVANA CRUZ DA ROCHA

MICROPROPAGAÇÃO DA CANJARANA (*Cabralea canjerana*)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marguerite G. G. Quoirin

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana L. F. Ribas

Co-orientador: Prof.^o Dr.^o Henrique S. Koehler

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, por possibilitar a realização do meu mestrado.

À Professora Doutora Marguerite Quoirin, pela orientação, amizade e dedicação a mim dispensada.

À Professora Doutora Luciana L. F. Ribas pela co-orientação e por todas as sugestões.

Ao Professor Doutor Henrique S. Koehler pela co-orientação e por toda ajuda na área de estatística, a qual foi de grande valia.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À SPVS pelo fornecimento das sementes e por toda ajuda a mim dispensada desde a coleta de frutos até a coleta de ramos caulinares para a realização dos experimentos.

À Mariza, Giovana e a todos os amigos e colegas de mestrado.

À Carla, Flávia e Igor pela ajuda a mim dispensada.

Ao meu querido esposo pelo seu amor, amizade e compreensão.

Aos meus pais por sempre torcerem por mim e a Deus por iluminar o meu caminho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 <i>Cabralea canjerana</i>	2
2.2 MICROPROPAGAÇÃO.....	4
2.2.1 Desinfestação do Material Vegetal.....	5
2.2.1.1 Desinfestação de partes aéreas.....	5
2.2.1.2 Desinfestação de sementes.....	7
2.2.2 Multiplicação.....	8
2.2.3 Enraizamento.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL.....	12
3.2 DEISCÊNCIA DOS FRUTOS.....	12
3.3 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES <i>IN VITRO</i>	13
3.4 DESINFESTAÇÃO DE GEMAS AXILARES OBTIDAS DE PLANTAS ADULTAS.....	13
3.5 MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS E APICAIS DE PLANTAS JUVENIS.....	14
3.5.1 Preparo dos Explantes.....	14
3.5.2 Preparo dos Meios de Cultura.....	15
3.5.3 Condições de Cultura.....	15
3.5.4 Experimentos de Indução de Brotações Múltiplas Utilizando o Meio de Cultura MS.....	15
3.5.5 Experimentos de Indução de Brotações Múltiplas Utilizando o Meio de cultura WPM.....	16
3.5.6 Subcultivos.....	17
3.6 EXPERIMENTO DE ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE BROTOS (MICROESTACAS) OBTIDOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	18
3.7 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS OBTIDAS DE REBROTAS DE PLANTAS GERMINADAS E CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 DEISCÊNCIA DE FRUTOS.....	20
4.2 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES.....	21
4.3 DESINFESTAÇÃO DAS GEMAS AXILARES PROVENIENTES DE ÁRVORES ADULTAS.....	22
4.4 MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES.....	24
4.4.1 Culturas em Meio de Cultura MS.....	24
4.4.1.1 Efeito da benzilaminopurina e da 2-isopenteniladenina na multiplicação de gemas axilares em segmentos nodais e apicais.....	24
4.4.1.1.1 Taxa de multiplicação obtida com a utilização de BAP e 2-iP.....	24
4.4.1.1.2 Efeito da BAP e da 2-isopenteniladenina na percentagem de explantes com brotos.....	28
4.4.1.1.3 Efeito da BAP e da 2-isopenteniladenina no número de brotos por explante.....	30
4.4.1.1.4 Efeito da BAP e da 2-isopenteniladenina no comprimento médio dos brotos....	32

4.4.1.1.5 Efeito da BAP e da 2-isopenteniladenina na porcentagem de explantes mortos	33
4.4.1.1.6 Resumo dos resultados obtidos nas culturas de segmentos nodais em MS adicionado de BAP e 2-iP.....	37
4.4.1.2 Culturas em Meio de Cultura MS adicionado de 2-isopenteniladenina.....	40
4.4.1.2.1 Efeito na multiplicação de gemas axilares em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas	40
4.4.1.2.2 Efeito de BAP na porcentagem de explantes com brotos em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas.....	41
4.4.1.2.3 Efeito de BAP no número de brotos por explante em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas.....	42
4.4.1.2.4 Efeito de BAP no comprimento médio dos brotos em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas.....	42
4.4.1.2.5 Efeito de BAP na porcentagem de explantes mortos em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas.....	43
4.4.1.2.6 Resumo dos resultados obtidos em MS adicionado de BAP em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas.....	43
4.4.2 Culturas em Meio de Cultura WPM Adicionado de Benzilaminopurina	45
4.4.2.1 Efeito de BAP na multiplicação de gemas axilares em segmentos nodais e apicais.....	45
4.4.2.2 Efeito de BAP na porcentagem de explantes com brotos	46
4.4.2.3 Efeito de BAP no número de brotos por explante	47
4.4.2.4 Efeito de BAP no comprimento médio dos brotos.....	48
4.4.2.5 Efeito de BAP na porcentagem de explantes mortos.....	49
4.4.2.6 Resumo dos resultados do experimento em meio de cultura WPM adicionado de BAP.....	50
4.5 ENRAIZAMENTO DE BROTOBROS OBTIDOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	53
4.6 ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS OBTIDAS A PARTIR DE REBROTAS.....	55
5 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
FIGURAS.....	64
ANEXOS.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RESULTADOS OBTIDOS EM EXPERIMENTOS DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ÁRVORES TROPICAIS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE CITOCININAS.....	10
TABELA 2 -	RESULTADOS DE DEISCÊNCIA DE FRUTOS DE CANJARANA, ARMAZENADOS EM SACO PLÁSTICO SEM E COM SERRAGEM, APÓS 11 DIAS.....	21
TABELA 3 -	EFEITO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO NA PERCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO E DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE CANJARANA APÓS 7 DIAS, E NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> APÓS 7 E 14 DIAS.....	23
TABELA 4 -	RESULTADOS DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DE GEMAS AXILARES DE ÁRVORES ADULTAS DE CANJARANA, APÓS 14 DIAS DE CULTIVO	23
TABELA 5 -	TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM EXPLANTES DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	25
TABELA 6 -	TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM EXPLANTES DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	26
TABELA 7 -	PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA COM BROTO NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	28
TABELA 8 -	PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA COM BROTO NO CULTIVO INICIAL E NOS 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	29
TABELA 9 -	NÚMERO MÉDIO DE BROTO POR EXPLANTE COM BROTO DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	31
TABELA 10 -	NÚMERO MÉDIO DE BROTO POR EXPLANTE COM BROTO DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E NOS 4 SUBCULTIVOS, EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	32
TABELA 11 -	MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS BROTO FORMADOS EM EXPLANTES DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	32
TABELA 12 -	MÉDIAS DOS COMPRIMENTOS DOS BROTO FORMADOS EM EXPLANTES DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE 2-iP, NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM..	33
TABELA 13 -	NECROSE DOS EXPLANTES DE CANJARANA, NO CULTIVO INICIAL E NOS 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO	

	CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	34
TABELA 14 -	NECROSE DOS EXPLANTES DE CANJARANA, CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, NO CULTIVO INICAILA E NOS 4 SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	35
TABELA 15 -	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA O SEGMENTO NODAL EM TODOS OS CULTIVOS NA PRESENÇA DE BAP.....	38
TABELA 16 -	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA O SEGMENTO NODAL EM TODOS OS CULTIVOS NA PRESENÇA DE 2-iP.....	39
TABELA 17 -	TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO EM EXPLANTES DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS (ORIGEM: SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS).....	40
TABELA 18 -	PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA COM BROTO EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS (SEGMENTOS DE REBROTAS).....	41
TABELA 19 -	NÚMERO MÉDIO DE BROTO POR EXPLANTE COM BROTO DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS (ORIGEM: SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS).....	42
TABELA 20 -	MÉDIAS DOS COMPRIMENTOS DOS BROTO (cm) FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE BAP E/OU 2-iP, NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS (ORIGEM: SEGMENTOS NODAIS OBTIDOS A PARTIR DE REBROTAS).....	43
TABELA 21 -	NECROSE EM EXPLANTES DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), EM TRÊS SUBCULTIVOS (ORIGEM: SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS).....	43
TABELA 22 -	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA SEGMENTOS NODAIS DE CANJARANA NOS CULTIVOS REALIZADOS NO EXPERIMENTO COM BAP E 2-iP COMBINADOS.....	44
TABELA 23 -	TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM EXPLANTES DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA WPM, COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO.....	46
TABELA 24 -	PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA FORMANDO BROTO EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS TRÊS SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	47
TABELA 25 -	NÚMERO MÉDIO DE BROTO EM EXPLANTES COM BROTO DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E NO 1º, 2º E 3º SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP(MEDIA DE DOIS TIPOS DE SEGMENTOS).....	48
TABELA 26 -	MÉDIAS DOS COMPRIMENTOS DOS BROTO (cm) FORMADOS EM	

	EXPLANTES DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM ADICIONADO DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS TRÊS PRIMEIROS SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	48
TABELA 27 -	NECROSE EM EXPLANTES DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM.....	49
TABELA 28 -	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA SEGMENTOS NODAIS DE CANJARANA, NOS CULTIVOS REALIZADOS NO EXPERIMENTO EM WPM ADICIONADO DE BAP.....	51
TABELA 29 -	ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE CANJARANA ORIGINADAS DE BROTO OBTIDOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO, EM MEIO DE CULTURA WPM ADICIONADO DE AIB (0; 2,5 E 5,0 μ M)..	54
TABELA 30 -	ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE CANJARANA OBTIDAS A PARTIR DE REBROTAS, EM MEIO DE CULTURA MS/2 ADICIONADO DE AIB (0; 2,5, 5,0 E 10 μ M).....	56

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - A - Segmento nodal com duas gemas axilares (GAx) na base dos pecíolos (PE), quando seccionado produziu dois explantes;
B - Um explante subcultivado produziu um broto (BR) com gema apical (GAp) e uma gema axilar (> 0,3 cm), essa foi separada para posterior subcultivo..... 18
- FIGURA 2 - A) Frutos de *Cabralea canjerana*: a - com três fissuras e parcialmente aberto, b - com cinco fissuras; c - com cinco fissuras e totalmente aberto.
B) a - Fruto aberto de *Cabralea canjerana*; b- sementes recobertas pelo arilo alaranjado; c- sementes isoladas sem o arilo.
C) Plântula de canjarana (*Cabralea canjerna*) aos 18 dias após a germinação *in vitro* em meio de cultura MS/2, parte aérea recoberta pelo tegumento que envolvia a semente..... 64
- FIGURA 3 - A) Segmentos de *Cabralea canjerana*; a - segmento apical; b - segmento nodal
B) Segmentos nodais de *Cabralea canjerana*, em meio de cultura MS com 2,5 µM de BAP (após 30 dias no cultivo inicial).
C) Segmento nodal de *Cabralea canjerana* com as gemas axilares em desenvolvimento, depois de 30 dias em meio de cultura MS (1° subcultivo).
D) Segmento nodal de *Cabralea canjerana* com gemas axilares, em meio de cultura MS com 5,0 µM BAP (2° subcultivo)
E) Segmentos nodais de *Cabralea canjerana* em meio de cultura MS adicionado de 2,5 µM BAP (3° subcultivo).
F) Aspecto da rebrota de *Cabralea canjerana*, originada da gema do nó cotiledonar, com 80 dias de idade..... 65
- FIGURA 4 - A) Segmentos nodais retirados de rebrotas, em meio de cultura MS adicionado de BAP 2,5 µM (1° subcultivo).
B) Segmento nodal retirado de rebrota, no 3° subcultivo em meio de cultura MS com BAP (2,5 µM) + 2-iP (2,5 µM).
C) Segmento nodal em meio de cultura WPM com 5,0 µM de BAP (2°subcultivo)
D) Segmentos nodais em meio de cultura MS adicionado de 5,0 µM de 2-iP (2°subcultivo)..... 66
- FIGURA 5 - A) Segmento apical de *Cabralea canjerana* com uma raiz na base, em meio de cultura WPM sem fitorreguladores (após 30 dias no cultivo inicial).
B) Microestaca oriunda da rebrota de *Cabralea canjerana* com raízes, após 30 dias em meio WPM adicionado de 5,0 µM AIB.
C) Enraizamento de microestaca oriunda de broto de *Cabralea canjerana*, obtido na fase de multiplicação, após 30 dias em meio WPM adicionado de 5,0 µM AIB..... 67

LISTA DE ABREVIATURAS

2-iP- 2-isopenteniladenina

BAP- benzilaminopurina

GA₃- ácido giberélico

AIB- ácido indol 3-butírico

CIN- cinetina

MS- meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)

MS/2- meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962), com a concentração de sais minerais reduzida a metade

ANA - ácido naftaleno acético

TZ - tidiazuron

v/v - relação volume/ volume

WPM - "Woody Plant Medium" meio de cultura de LLOYD e McCOWN (1980)

RESUMO

A canjarana, *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.(Meliaceae), possui uma das madeiras mais valiosas das produzidas no Sul do Brasil. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação da canjarana a partir de plantas crescidas *in vitro* e de plantas adultas. Para otimizar a obtenção de sementes a partir de frutos quase maduros e uniformizar a idade das plântulas utilizadas nos experimentos, foi realizado um experimento de deiscência dos frutos, sendo essa obtida com sucesso deixando os frutos, ainda sem fissuras de deiscência, em sacos plásticos fechados, a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (2,5% v/v) por 30 minutos, obtendo-se 75% de sobrevivência e 90% de germinação *in vitro*. Em seguida foram realizados experimentos de multiplicação utilizando segmentos nodais e/ou apicais, retirados de plantas crescidas *in vitro*. Os segmentos foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) ou WPM (Lloyd e McCown, 1980) adicionado de 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar. A estes meios de cultura foram adicionadas as citocininas benzilaminopurina (BAP) e/ou 2-isopenteniladenina (2-iP) nas concentrações de 2,5; 5,0; 10 e $20 \mu\text{M}$. As variáveis analisadas foram: a taxa de multiplicação, a percentagem de explantes com brotos, o número e comprimento dos brotos e a percentagem de explantes mortos. Os brotos obtidos foram colocados em meio de cultura WPM adicionado de ácido indol 3-butírico - AIB (0, 2,5 e $5,0 \mu\text{M}$) para indução do enraizamento. Na fase de multiplicação, o segmento nodal cultivado em presença de 2,5 e $5,0 \mu\text{M}$ de BAP, propiciou os melhores resultados, em comparação ao segmento apical e ao segmento nodal cultivado em presença de 2-iP. A maior taxa de multiplicação foi observada em segmentos nodais cultivados no meio de cultura MS adicionado de $5,0 \mu\text{M}$ de BAP com um valor de 1,77 contra 1,41 no mesmo tipo de explante e meio de cultura MS adicionado de $5,0 \mu\text{M}$ de 2-iP. O meio de cultura MS foi o mais adequado para a multiplicação da canjarana, em comparação com o WPM. Além disso, nesse último foi observada clorose foliar dos brotos. O enraizamento dos brotos oriundos de meio de cultura contendo citocininas foi baixo (20%) em presença de $5,0 \mu\text{M}$ de AIB. Entretanto, o enraizamento das microestacas oriundas de rebrotas de plântulas foi satisfatório (87,5%) na mesma concentração de AIB. Em conclusão, a micropropagação da canjarana a partir de segmentos nodais pode se tornar viável. Entretanto, novos experimentos devem ser realizados para melhorar as taxas de multiplicação e obter percentagens significativas de desinfestação de gemas axilares de plantas adultas.

Palavras-chave: citocininas, auxina, espécie nativa, Meliaceae, cultura de tecidos

ABSTRACT

The canjarana, *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae), possess one of the most valuable woods of those produced in the South of Brazil. The purpose of our work was to establish a protocol of micropropagation of the canjarana, starting from plants grown *in vitro* and from adult plant parts. To optimize the obtention of seeds from almost ripe fruits, and to standardize the age of the seedlings used in the experiments, an experiment of fruit dehiscence was achieved. The dehiscence was successful when the fruits, still without dehiscence fissures, were kept in closed plastic bags at $25 \pm 3^\circ\text{C}$. After treatment with sodium hypochlorite at 2.5% (v/v) for 30 minutes, 75% of the seeds were disinfested and 90% germinated *in vitro*. Multiplication experiments were accomplished using nodal and/or apical segments, excised from plants grown *in vitro*. The segments were inoculated in MS (Murashige and Skoog, 1962) or WPM (Lloyd and McCown, 1980) culture medium, supplemented with 30 g.L^{-1} sucrose and 7 g.L^{-1} agar. To these culture media was added the cytokinin benzylaminopurine (BAP) and/or 2-isopentenyladenine (2-iP) at concentrations of 2.5; 5.0; 10 and $20 \mu\text{M}$. The evaluated variables were: the multiplication rate, the percentage of explants with shoots, the number and length of the shoots and the percentage of dead explants. The shoots obtained in the multiplication experiment were used in a rooting experiment where medium culture was WPM medium supplemented with indolebutyric acid - IBA (0, 2.5 and $5.0 \mu\text{M}$). During the multiplication phase, the nodal segment, in the presence of 2.5 and $5.0 \mu\text{M}$ of BAP, gave the best results for the analyzed variables, in comparison with the apical segment and with the 2-iP treatments. The largest multiplication rate, for instance, in nodal segments cultivated with $2.5 \mu\text{M}$ BAP, was of 1.72 against 1.41 in the same type of explant cultured in MS medium supplemented with $5.0 \mu\text{M}$ 2-iP. The MS culture medium was more appropriate for the multiplication of the canjarana than WPM medium. Moreover, leaf chlorosis was observed in the shoots on WPM medium. The rooting of the shoots originated from culture medium containing cytokinin was low (20%) in the presence of $5.0 \mu\text{M}$ IBA. However, the rooting of the microcuttings originating from new shoots was satisfactory (77%) in the same concentration of IBA. In conclusion, the micropropagation of the canjarana from nodal segments, can become viable. However, new experiments should be accomplished in order to improve the multiplication rates and to obtain a significant percentage of desinfestation of axillary buds from adult plants.

Key words: cytokinins, auxin, Meliaceae, native species, tissue culture.

1 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa geralmente é utilizada quando a propagação sexuada não tem sucesso, quando o número de plantas requerido pelo mercado não é suficiente ou ainda, quando é de interesse a propagação de plantas com características selecionadas. Neste tipo de propagação assexuada está incluída a macropropagação, a qual pode ser obtida por meio das técnicas de estaquia, enxertia, alporquia, mergulhia e a micropropagação. Já a embriogênese somática, a proliferação de gemas adventícias e a proliferação de gemas axilares, são técnicas utilizadas na micropropagação (HARTMANN et al., 2002). Entre a micropropagação e a macropropagação existem diferenças como o custo financeiro e o número de plantas obtidas. Na macropropagação o número de explantes retirados da planta matriz pode ser limitado, entretanto na micropropagação podemos obter grande número de propágulos a partir de pequeno número de árvores de elite, devido ao pequeno tamanho dos explantes (LIEW; TEO, 1998). Também, pode se obter taxas de multiplicação mais elevadas comparadas à macropropagação (HARTNEY, 1982).

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* possui essa denominação devido ao tamanho dos propágulos utilizados (TORRES et al., 1998) e engloba vários protocolos de regeneração a partir de tecidos vegetais, incluindo como explantes: folhas, gemas apicais ou axilares, segmentos nodais, dentre outros. A possibilidade de utilização de vários tipos de explantes para iniciar a cultura se baseia na teoria da totipotência das células vegetais, sendo essa a potencialidade em iniciar um novo indivíduo a partir de explantes unicelulares ou pluricelulares (TORRES et al., 2000). A micropropagação é utilizada para propagação de genótipos modificados ou não, produção de biomassa de produtos bioquímicos do metabolismo secundário, produção de plantas livre de vírus, preservação de germoplasma e em investigações científicas. Os procedimentos citados estão incluídos na biotecnologia (GUPTA, 1988; HARTMANN et al., 2002).

Técnicas de micropropagação têm sido utilizadas para propagação de algumas espécies florestais nativas e para o estabelecimento de matrizes para produção de sementes. Entretanto, são necessários estudos básicos de micropropagação para as espécies tropicais lenhosas (CID et al., 1997), como é o caso das espécies nativas brasileiras. Logo, trabalhos científicos nessa área são importantes para aumentar o conhecimento científico e sua aplicação prática.

A espécie (*Cabralea canjerana*) foi escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho devido à curta viabilidade de suas sementes quando armazenadas (sementes recalcitrantes), à variação na porcentagem de germinação indicada na literatura e à escassa bibliografia referente à propagação vegetativa da espécie. A micropropagação permitirá a propagação massal de mudas para reflorestamento com esta espécie. O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver um protocolo de multiplicação vegetativa da canjarana (*Cabralea canjerana*) pela micropropagação. Os objetivos específicos foram: estabelecer culturas assépticas *in vitro* a partir de sementes e de gemas axilares de árvores adultas; adequar o tipo e a concentração de citocininas que permitam a multiplicação de gemas axilares de segmentos nodais e apicais de plântulas crescidas *in vitro*; e obter o enraizamento *in vitro* de microestacas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Cabralea canjerana*

A canjarana (*Cabralea canjerana*) é uma espécie arbórea, perenifólia a semicaducifólia, pertencente à família Meliaceae, conhecida popularmente como canjarana, canjerana, cedro-canjerana, caiarana, pau-de-santo, canharana e outros (CARVALHO, 1994). A canjarana pode ser encontrada na Costa Rica, Guiana, Perú, Bolívia, Argentina, Paraguai (BACKES; IRGANG, 2002) e no Brasil nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Góias, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rio de Janeiro, Roraima, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e no Distrito Federal (CARVALHO, 1994). O habitat da espécie compreende a Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atântica), Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) e Campos de Altitude (CARVALHO, 1994).

A árvore da canjarana pode alcançar até 30 m de altura e 100-150 cm de DAP (diâmetro na altura do peito); possui tronco cilíndrico e geralmente tortuoso. As folhas são compostas, opostas e imparipenadas (CARVALHO, 1994), com folíolos alternos, peciólulos de 3 mm de comprimento, lâminas oblongas, bordo inteiro, um quase reto e outro curvo e base assimétrica (REITZ et al., 1983).

A madeira da canjarana é considerada como uma das mais valiosas do Sul do Brasil, pois possui uma grande durabilidade, quando exposta a intempéries, e pode ser trabalhada com facilidade fornecendo um bom acabamento (REITZ et al., 1983). É de ótima qualidade e a sua cor varia de branca até vermelho-escuro, com vivos reflexos nas faces radiais, textura média e lisa ao tato, apresentando resistência satisfatória ao ataque de organismos xilófagos em condições favoráveis à decomposição (CARVALHO, 1994; BACKES; IRGANG, 2002). Devido a estas características, a madeira é empregada em construções civis (indicada para obras internas e externas), dormentes, marcenaria, confecção de caixas, embalagens, carpintaria e obras de escultura (CARVALHO, 1994; LONGHI, 1995). Além disso, ela apresenta as vantagens da madeira do cedro (*Cedrela fissilis*), sendo mais firme, resistente e durável (REITZ et al., 1983) e, ainda, quando comparada ao cedro, é pouco afetada pela broca *Hypsipyla grandella*. Porém, em um plantio comprobatório de canjarana, observou-se, no sexto ano após o plantio, aumento no número e na percentagem de árvores com seca nos ponteiros devido ao ataque deste inseto, o que diminuiu a sobrevivência do povoamento, inviabilizando plantios puros acima de 0,5 ha (CARVALHO et al., 1996).

A casca do caule e das raízes da árvore tem importantes aplicações na terapêutica popular (REITZ et al., 1983) e uso medicinal como purgativo, febrífugo, abortivo (BACKES; IRGANG, 2002), antidispéptico, adstringente e emético (CARVALHO, 1994). Da casca do caule, também, extraí-se corante vermelho, que é utilizado na indústria de tinturaria, principalmente para tingir pelegos (CARVALHO, 1994; BACKES; IRGANG, 2002).

A canjarana é uma espécie dióica com polinização cruzada, realizada pela espécie de vespa *Polistes* e pelas abelhas *Xylocopa* e *Exomalopsis* (FUZETO et al., 2001). Sua floração ocorre em mais de uma época do ano, porém com maior intensidade durante os meses de setembro a outubro, junto com o surgimento de novas folhas. Em consequência, os frutos também amadurecem em mais de uma época do ano, predominando no período de agosto a novembro (LORENZI, 1996).

A espécie possui flores hermafroditas, nectaríferas, com coloração branca esverdeada, pequenas e aromáticas, que são utilizadas na indústria da perfumaria devido ao seu intenso aroma. O suco do fruto tem ação inseticida. As sementes possuem um arilo suculento que as envolve, o qual é consumido por várias espécies de pássaros, macacos e outros mamíferos (BACKES; IRGANG, 2002) como o mono-carvoeiro (*Brachyteles arachnoides*), razão pela qual sua presença é indispensável na composição de reflorestamentos heterogêneos ou restauração de áreas de preservação permanente (LORENZI, 1996).

A longevidade das sementes de canjarana armazenadas é curta, devido à perda rápida da viabilidade durante a secagem (LONGHI et al., 1984). Isso ocorre por essa semente ser recalcitrante (ou seja, responde à dessecação com a diminuição da sua viabilidade). O início desse processo dá-se quando a semente é separada do fruto, sendo o seu poder germinativo diminuído após 10 dias (LONGHI et al., 1984). Por essa razão, a germinação das sementes deve ocorrer logo após a maturação (HARTMANN et al., 2002). Como a semente possui essa característica e não são ainda conhecidos métodos eficazes para manter a sua viabilidade, não é aconselhável o seu armazenamento (CARVALHO, 1994).

A viabilidade das sementes foi estudada em experimentos utilizando dois tipos de embalagens: saco plástico e saco de filó. Neste último, as sementes foram misturadas a casca de arroz umedecida. As sementes foram armazenadas em câmara fria a 5°C, comparando com o armazenamento em embalagem aberta fora da câmara fria. O melhor resultado obtido foi com o saco de filó, que manteve parte da viabilidade das sementes, sendo capaz de apresentar 50% da germinação inicial até 120 dias de armazenamento (FRASSETO; MENEZES, 1997). Em outro experimento de armazenamento de sementes, essas foram colocadas em vidros hermeticamente fechados e em sacos plásticos mantidos em câmara fria a 5°C. O resultado de germinação obtido aos 105 dias foi de 39% e 1%, respectivamente (ZANON; CARPANEZZI, 1993).

O poder germinativo da espécie varia de 40% até 93% (CARVALHO, 1994). Porém, LORENZI (1996) considera que a germinação é lenta e geralmente muito baixa, sem indicar a percentagem de germinação. Segundo BACKERS e IRGANG (2002), em canteiros, ela ocorre após 13 a 73 dias.

2.2 MICROPROPAGAÇÃO

Na micropropagação, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTMANN et al., 2002). Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos cultivados e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

A micropropagação difere da propagação tradicional nos componentes biológicos de cada etapa, pois são separados dentro de estágios (estabelecimento dos explantes *in vitro*, multiplicação, alongamento e enraizamento), aumentando assim o controle de cada aspecto da

regeneração e dos processos de desenvolvimento. As etapas podem ser manipuladas pela seleção de explantes e controle do desenvolvimento da cultura (HARTMANN et al., 2002).

As técnicas *in vitro* têm mostrado vantagens sobre os métodos da propagação tradicional, pois as culturas são iniciadas com fragmentos de plantas (explantes), requerem pequeno espaço para manter ou para aumentar o número de plantas e podem produzir plantas livres de patógenos como vírus. Além disso, as taxas de propagação são maiores e, em pouco tempo, pode-se produzir clones de plantas que apresentam dificuldades de propagação via macropropagação. Outra vantagem desta técnica é a produção das mudas independente da época do ano (GEORGE, 1993).

A primeira fase de um protocolo de regeneração de plantas a partir de explantes é a seleção do material de onde serão retirados os explantes, levando em consideração critérios como: taxa de crescimento e conservação das características da espécie (MATEO-SAGASTA, 1990). Esta fase também inclui o estabelecimento de culturas assépticas, que ocorre por meio da desinfestação dos explantes (TORRES et al., 1998).

A segunda fase refere-se à produção de propágulos, ou seja, à multiplicação de brotos axilares ou adventícios, de embriões somáticos ou de órgãos. Propágulos produzidos nessa fase, especialmente brotos, podem ser utilizados em ciclos de multiplicação para aumentar o seu número (GEORGE, 1993). A terceira fase compreende a transferência das partes aéreas produzidas para um meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo na última fase a de aclimatação (TORRES et al., 1998).

2.2.1. Desinfestação do material vegetal

2.2.1.1 Desinfestação de partes aéreas

A desinfestação é uma etapa problemática, pois o desinfestante deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo. Alguns microrganismos podem ser endógenos ou estarem latentes tanto em sementes como em brotos. Por essa razão, muitas vezes a obtenção de tecidos vegetais livres de microrganismos é difícil. Porém, se apenas os meristemas forem retirados, esses geralmente estão livres de microrganismos (BONGA; DURZAN, 1985).

A desinfestação do material juvenil geralmente não é difícil; entretanto, também são utilizados explantes de material adulto ou de plantas crescidas em condições de campo. A desinfestação de explantes coletados no campo é mais complicada, pois as percentagens de contaminação são freqüentemente altas, quando comparadas com as de explantes juvenis ou retirados de mudas mantidas em casa-de-vegetação. A contaminação pode ser reduzida por pulverizações com inseticidas e fungicidas (BONGA; ADERKAS, 1992), envolvendo os brotos das plantas em sacos plásticos ou mantendo-os em casa-de-vegetação (HARTMANN et al., 2002).

Dentre os agentes usados para a desinfestação dos explantes inclui-se o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônico, o peróxido de hidrogênio e, os mais comumente utilizados, o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O hipoclorito em pH 8,0 perde a sua eficiência e pode prejudicar o tecido vegetal provocando sua oxidação, porém em pH próximo de 6,0 é mais efetivo (BONGA; DURZAN, 1985). Geralmente, um surfactante como Tween[®], ou um detergente, é adicionado à solução de hipoclorito para facilitar a sua ação, aumentando o contato da solução com os tecidos (TORRES et al., 1998). Porém, a adição deste pode, além de diminuir a contaminação, aumentar a toxicidade do hipoclorito para o tecido vegetal (BONGA; DURZAN, 1985).

Geralmente, no início da desinfestação, é utilizado etanol a 70% durante alguns segundos, para eliminar bolhas de ar e parte dos lipídeos, aumentando assim o contato do desinfestante com o material vegetal. Depois, o explante é mergulhado em hipoclorito de sódio em uma concentração que varia de 1 a 2% durante 10 a 30 minutos, com gotas de Tween[®]-20 ou 80, e em seguida são realizados enxágües em água estéril (MATEO-SAGASTA, 1990).

A desinfestação de brotos de cana-de-açúcar obtidos de plantas adultas foi realizada utilizando solução de hipoclorito de sódio a 2,7%, com pH 6,0. Os resultados demonstraram que 46,8% dos explantes não contaminaram. Entretanto, o tratamento foi altamente fitotóxico, provocando 100% de necrose e morte dos brotos (MOUTHIA; DOOKUM, 1999). Brotos de plântulas de goiabeira (*Psidium guajava*) foram desinfestados em etanol 70% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos. O resultado foi 70% de explantes desinfestados e baixa necrose (KHATTAK et al., 1990). Explantes da mesma espécie, com 2 anos de idade, mantidos em casa-de-vegetação, produziram brotos e esses foram desinfestados com 70% de etanol por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e enxague com água destilada e esterilizada (ALI; LÜDDERS, 2001).

Brotos apicais de plantas com 2 anos de idade de *Cinnamomum camphora* crescidos em casa-de-vegetação foram desinfestados com hipoclorito de sódio 0,5% adicionado de Tween[®]-20 (2 gotas), por 10 minutos. Após a desinfestação, foi utilizado um explante medindo 3-5 mm, contendo o broto apical e parte do caule subjacente. Foi escolhido este tamanho reduzido do explante, pois minimiza a contaminação no cultivo (HUANG et al., 1998).

Ramos do caule de 5 meses de idade da *Azadirachta excelsa*, espécie da família Meliaceae, foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 1,35% acrescido de Tween[®]-20 (2 gotas) por 25 minutos. Em seguida, as gemas axilares foram retiradas e desinfestadas novamente em 1,05% (v/v) de hipoclorito por 15 minutos (LIEW; TEO, 1998).

2.2.1.2 Desinfestação de sementes

No caso do mogno (*Swietenia macrophylla*) a desinfestação de sementes e segmentos nodais de plantas germinadas *in vitro* foi efetuada com hipoclorito de sódio 0,8% durante 20 minutos (ALBARRÁN et al., 1997). Em outro trabalho com esta espécie, suas sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos, antes da remoção do tegumento e, após a remoção deste, o tempo da desinfestação foi de 5 minutos na mesma concentração de hipoclorito (VENKETESWARAN et al., 1987). Outros pesquisadores desinfestaram as sementes do mogno com etanol 70% (3 segundos), seguido de hipoclorito de sódio comercial na concentração de 5,5% por 20 minutos (CERDAS et al., 1998).

Em outro trabalho com *Cedrela fissilis*, pertencente à família Meliaceae, foram utilizadas sementes para obtenção de plântulas em condições assépticas. Para isso, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, contendo Tween[®]-20 (2 a 3 gotas), por 75 minutos (NUNES et al., 2002).

Sementes de *Miconia* sp., da família Melastomataceae, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 9% por 10 minutos e depois enxaguadas com água estéril seguido de um tratamento com benomyl (0,5% por 10 minutos) (CID et al., 1997).

Na propagação *in vitro* do *Eucalyptus sideroxylon*, sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% e Tween[®]-20 por 20 minutos (CHENG et al., 1992).

No protocolo descrito por YASSEN et al. (1995) para propagação *in vitro* da goiabeira (*Psidium guajava*), o fungicida benomyl (50% por 10 minutos) seguido de hipoclorito de sódio (0,79% por 20 minutos) foram utilizados para desinfestação de sementes.

2.2.2 Multiplicação

A multiplicação é a segunda fase da propagação *in vitro* de plantas. Nesta fase os explantes já possuem um crescimento uniforme e adequado; por essa razão, o propósito desse estágio é a multiplicação das gemas ou das microestacas, para posterior enraizamento. As plantas desenvolvidas a partir desses explantes, por possuírem gemas pré-existent, geralmente são fiéis na reprodução do genótipo da planta matriz (HARTMANN et al., 2002).

Os meios de cultura utilizados nos estágios de estabelecimento da cultura e multiplicação são similares, pois ambos possuem em suas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, geralmente a sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Entretanto, existem meios de cultura com específicas formulações como o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio, quando comparado a outras formulações salinas (GEORGE, 1996) e meios com menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio), comparado ao MS, como o meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) (SAADAT; HENNERTY, 2002). Esse geralmente é utilizado em espécies lenhosas quando o meio MS não for eficiente (HARRY; THORPE, 1994).

Reguladores vegetais são adicionados ao meio de cultura para auxiliar o crescimento e também são importantes no direcionamento da resposta do desenvolvimento dos propágulos (HARTMANN et al., 2002). Dentre os fitorreguladores utilizados na fase de multiplicação destacam-se as citocininas, as quais participam de vários processos fisiológicos e de desenvolvimento incluindo a divisão celular, morfogênese da parte aérea e das raízes e senescência (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dentro do grupo de citocininas encontramos BAP (benzilaminopurina), KIN (cinetina), 2-iP (2-isopentenil adenina) e ZEA (zeatina), as quais são empregadas para formação de brotos. Outro grupo, o das auxinas (AIA- ácido indol acético, ANA- ácido naftaleno acético e AIB- ácido indol 3-butírico), pode ser utilizado nessa fase, porém em baixas concentrações (HARTMANN et al., 2002). Já o uso do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), que também é uma auxina, é evitado, pois promove a formação de calos e pode também causar variação genética no cultivo de células ou de tecidos (GEORGE, 1996).

A escolha das citocininas e das auxinas nos cultivos *in vitro* depende de cada pesquisador, porém mesmo com escolhas diferentes, pode-se obter resultados similares. O estabelecimento de brotos e a multiplicação do número destes podem ser promovidos por uma citocinina sem a adição de auxinas. Experimentos com algumas espécies demonstraram que as

auxinas podem ser desnecessárias e podem reduzir a capacidade dos brotos de enraizar. Já a adição de mais de uma citocinina pode aumentar a produção ou melhorar a qualidade dos brotos (GEORGE, 1996).

A taxa de proliferação ou multiplicação de brotos dependerá da concentração de citocininas aplicadas (GEORGE, 1996). Geralmente, as concentrações altas induzem muitos brotos, mas podem afetar a qualidade destes, produzindo brotos pequenos e incapazes de alongarem-se, dificultando a separação (HARTMANN et al., 2002). Os brotos produzidos podem ainda ter dificuldades para enraizamento, maior suscetibilidade à hiperhidricidade (vitricificação) e podem ser induzidos brotos adventícios. Entretanto, concentrações baixas de citocininas podem estimular somente o crescimento de brotos axilares ou laterais (GEORGE, 1996; HARTMANN et al., 2002).

Na fase de multiplicação podem ser realizadas várias subculturas, cada uma tendo uma duração de duas a oito semanas. Entretanto, se o tempo de subcultura for demasiadamente longo, as folhas podem se tornar cloróticas e necróticas (HARTMANN et al., 2002).

Dentre os métodos de micropropagação destaca-se a propagação a partir de brotos axilares, a qual inclui a cultura de gemas e segmentos nodais. Essas referem-se à cultura de gemas com meristemas intactos e o propósito destas é a multiplicação de brotos e a repetida formação de ramos axilares. Para que a multiplicação ocorra, a dominância apical deve ser eliminada. Para isso, a gema apical pode ser retirada ou são utilizadas citocininas e ou a mudança dos segmentos para a posição horizontal (GEORGE, 1996).

Na Tabela 1 são apresentados experimentos de multiplicação, utilizando como explantes gemas axilares e segmentos nodais.

TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS EM EXPERIMENTOS DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE ÁRVORES TROPICAIS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE CITOCININAS

Espécie	Explante	Citocininas (resultado)	Autores
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Gemas apicais e laterais	4,4 µM de BAP(4 brot/expl.)	YOUSEF; FATTAH, 1998
<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	Gemas axilares	4,4 µM de BAP e 0,5 µM de ANA (8 brot/ expl.)	LIEW; TEO, 1998
<i>Cedrela fissilis</i> (Meliaceae)	Segmentos de nós cotiledonares de plântulas jovens	1,25 a 5,0 µM de BAP (6 a 7 novos brotos)*	NUNES et al., 2002
<i>Celastrus paniculatus</i> (Celastraceae)	Segmentos nodais e brotos apicais	4,4 µM de BAP (3,6 brot/expl. em 94% explantes)	NAIR; SEENI, 2001
<i>Cinnamomum camphora</i> (Lauraceae)	Segmento nodal de árvores com 2 anos e em casa de vegetação	4,4 µM de BAP (9 brot/expl.); 4,4 µM de BAP + EM ₂ 1000 mg/l (18 brotos /explante)	HUANG et al., 1998.
<i>Dalbergia sissoo</i>	Nós cotiledonares	8,9 µM de BAP (7,9 brot/ expl.; 99% prolif. brotos)	PRADHAN et al.,1998
<i>Holostemma adakodien</i> (Asclepiadaceae)	Gemas axilares	8,9 µM de BAP e 2,45µM de AIB (8 brot/expl.)	MARTIN, 2002
<i>Melia azedarach</i> (Meliaceae)	Meristemas de brotos apicais	2,2 µM de BAP e 0,49 µM de AIB	VILA et al., 2002
<i>Melia azedarach</i> (Meliaceae)	Segmentos nodais	6,6 µM de BAP + 1,1 µM de ANA (7 brot/ expl.) 11,7 µM de KIN + 1,1 µM de ANA (13brot/expl.)	SHAHZAD et al., 2001
<i>Morus latifolia</i> (Moraceae)	Gemas axilares de árvores com 15 anos	8,9 µM de BAP (6 brot/expl.) (MS +2% frutose)	MEI-CHUN, 2002
<i>Naregamia alata</i> (Meliaceae)	Gemas apicais	3,1 µM de BAP e 8,6 µM de GA ₃ (9 brot/expl.)	BENNY et al., 1999
<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	Segmentos nodais com gemas axilares	2,2 µM de BAP (2,4 brotos por explante) a 4,4 µM (2,1 brot/expl.) 10 µM de 2-iP (2 brot/expl.) ²	ALI; LÜDDERS, 2001
<i>Punica granatum</i> (Puniaceae)	Gemas axilares	2,2 µM de BAP + 5,4 µM de ANA (8 a 10 brot/ expl.) subcultivo em 13,3 µM de BAP + 2,7 µM de ANA (20,2)	RUDRA; JUWARKAR, 2002
<i>Swietenia macrophylla</i> (Meliaceae)	Segmentos nodais	20µM de BAP (taxa multiplicação 2,95) 10µM de BAP+ 2,2µM de 2-iP (taxa multiplicação 7,22)	SCHOTTZ, 2003

BAP+ANA não induziu ou inibiu brotações; ² número de brotos por explante. EM₂ (Pronatec, Lille, França/composto para prevenção e redução da hiperhidricidade);

2.2.3 Enraizamento

A fase de enraizamento consiste em transferir as partes aéreas produzidas na fase de multiplicação para um meio adequado à indução de raízes. Entre as fases de enraizamento e multiplicação pode ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas, ou o sistema pode ser simplificado, eliminando-se a etapa de enraizamento *in vitro* pela manipulação das partes aéreas como microestacas, as quais enraizariam diretamente no substrato de transplântio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo o posterior transplântio para condições *ex vitro*. Geralmente, o enraizamento de espécies herbáceas é fácil, porém o mesmo não ocorre com as espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O enraizamento de lenhosas é dependente da relação entre os níveis de auxina e citocinina, participação de outras substâncias reguladoras de crescimento (por exemplo: as giberelinas e o ácido abscísico), influência de co-fatores e fatores fisiológicos e externos (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A capacidade de enraizamento pode ser reduzida à medida que se utiliza material menos juvenil, já que essa capacidade diminui quando a planta se aproxima da fase adulta (HARTMANN et al., 2002). Por essa razão às vezes é necessária a restauração da competência de enraizamento por meio do rejuvenescimento das partes aéreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O rejuvenescimento é considerado como uma reversão da fase adulta para a juvenil, sendo esse obtido por meio de podas severas na planta-matriz, de micro-enxertias consecutivas, sucessivos subcultivos de meristemas apicais e a aplicação de alguns fitorreguladores como as giberelinas (HARTMANN et al., 2002).

A rizogênese pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes. Na fase de indução a capacidade para a formação da raiz é determinada. Já na fase de iniciação visíveis mudanças citológicas ocorrem. Na última fase, o primórdio da raiz pode ser observado histologicamente, ocorrendo em seguida o desenvolvimento das raízes. Essa fase pode ser dividida em organização e alongamento (GEORGE, 1996). As fases de indução e iniciação das raízes respondem ou dependem de auxina, enquanto que o crescimento destas é inibido pela presença da mesma (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL

Foram coletados ramos, com 60 cm de comprimento, de árvores adultas de canjarana localizadas no município de Antonina, Estado do Paraná, na Reserva Morro da Mina, propriedade da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS). As gemas axilares foram utilizadas em experimentos de desinfestação, para posterior inoculação *in vitro*.

No período de julho a outubro de 2003 foram coletados frutos de árvores de duas reservas da SPVS, Reserva do Xaxim e da Cachoeira, localizadas no município de Antonina Estado do Paraná. Os frutos foram obtidos de polinização aberta. Os frutos sem fissuras sofreram deiscência e foram utilizados para obtenção das plântulas que foram empregadas nos experimentos de multiplicação.

Segmentos nodais e apicais foram excisados das plantas germinadas e crescidas *in vitro* e utilizados em experimentos de multiplicação.

3.2 DEISCÊNCIA DOS FRUTOS

Os frutos coletados no dia 21/07/03 na Reserva do Xaxim e da Cachoeira foram acondicionados em sacos plásticos para o transporte. No laboratório, os frutos fechados foram colocados em sacos plásticos com serragem e em sacos plásticos sem serragem. Esses foram fechados e colocados na sala de crescimento a temperatura de 25 ± 3 °C. A deiscência dos frutos foi analisada após 7 e 11 dias.

As médias dos tratamentos (frutos em embalagens fechadas com e sem serragem) foram comparadas por meio do teste-t para amostras independentes. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com três repetições, cada unidade experimental sendo constituída por 33 frutos fechados. As variáveis avaliadas para a deiscência dos frutos foram a percentagem de frutos totalmente abertos (com cinco fissuras), parcialmente abertos (número de fissuras menor que cinco), fechados e a percentagem de frutos contaminados por fungos.

3.3 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES *IN VITRO*

As sementes foram retiradas dos frutos, quando esses sofreram deiscência. O arilo foi eliminado manualmente com o auxílio de água. Em seguida, as sementes foram desinfestadas com etanol 70% por 30 segundos, seguido de solução de hipoclorito de sódio (marca “Bond Carneiro” com 12% de hipoclorito de sódio) nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0% (v/v), acrescido de Tween[®]20 (4% v/v), em dois tempos de tratamento (20 e 30 minutos). Depois disso, as sementes foram lavadas em água destilada estéril (quatro enxágues) e inoculadas no meio de cultura MS/2 (MS com a concentração de sais minerais e vitaminas dividida pela metade) (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Os experimentos foram realizados em frascos de vidro com 6,5 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura, contendo 20 ml de meio de cultura. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento nas condições descritas em 3.5.3.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo oito frascos por parcela, uma semente por frasco e seis tratamentos.

As variáveis avaliadas foram o número de sementes contaminadas por fungos e/ou bactérias após 7 dias e o número de sementes germinadas após 7 e 14 dias. Essas variáveis foram utilizadas para calcular as percentagens de contaminação e germinação das sementes.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey.

3.4 DESINFESTAÇÃO DE GEMAS AXILARES OBTIDAS DE PLANTAS ADULTAS

Testes de desinfestação de gemas axilares foram realizados após a lavagem de ramos caulinares adultos em água corrente e detergente.

Nos experimentos 1 e 2, descritos em seguida, as gemas axilares foram retiradas em condições assépticas, com o auxílio do bisturi, e colocadas em etanol 70% por 30 segundos, seguido de soluções de hipoclorito de sódio. Depois de enxaguadas em água destilada estéril, foram inoculadas em placas de petri (10 cm de diâmetro) com 20 mL meio de cultura MS.

Experimento 1. O hipoclorito de sódio foi utilizado nas concentrações de 0,03; 0,06; 0,12; 0,24 e 0,5% (v/v) durante 4 minutos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 5 repetições e 11 explantes por parcela.

Experimento 2. Hipoclorito de sódio nas concentrações de 6; 8,4; 9,6 e 10,8 % (v/v) por 8 minutos. O delineamento experimental foi o mesmo utilizado no experimento anterior, porém o número de repetições foi de 6 com 9 explantes por parcela.

Nos experimentos 3 e 4 descritos abaixo, os ramos caulinares foram lavados em água e detergente, seccionados em segmentos de 7 cm de comprimento com o auxílio de bisturi e colocados em etanol 70% por 30 segundos. Depois os explantes foram colocados em soluções de hipoclorito de sódio e após esse processo as gemas axilares foram enxaguadas em água destilada autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio com meio de cultura MS.

Experimento 3. Os ramos contendo gemas axilares foram desinfestados com 6 e 8,4% (v/v) de hipoclorito de sódio (20 minutos). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições e 4 explantes por parcela.

Experimento 4. As concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas foram as seguintes: 0,5; 1,0 e 2,0% (v/v) com pH ajustado em 6,0, em dois tempos de imersão (15 e 20 minutos). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, entretanto foram utilizadas 5 repetições por tratamento e 8 explantes por parcela.

As variáveis avaliadas foram a percentagem de explantes contaminados por fungos e/ou bactérias e a percentagem de sobrevivência das gemas axilares após 14 dias.

3.5 MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS E APICAIS DE PLANTAS JUVENIS

3.5.1 Preparo dos Explantes

Os segmentos nodais e apicais foram retirados de plântulas germinadas e crescidas *in vitro* com 60 dias de idade. Os segmentos apicais foram cortados com auxílio de uma tesoura deixando a base em bisel. Cada segmento de aproximadamente 0,8 cm de comprimento, continha uma gema axilar com uma folha jovem e a gema apical. Os segmentos nodais também foram seccionados com auxílio da tesoura com a base em bisel e o ápice em corte reto. O comprimento dos segmentos era de aproximadamente 1,2 cm, sendo que cada segmento nodal

continha duas gemas axilares opostas.

3.5.2 Preparo dos Meios de Cultura

Os meios de cultura foram preparados com água destilada e de acordo com as formulações salinas e vitamínicas para os respectivos meios de cultura, adicionadas de 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (marca Select). O pH foi ajustado em 5,8 antes da esterilização, a qual foi realizada por autoclavagem por 20 minutos à temperatura de 120°C e pressão de 1,2 atm. Os fitorreguladores foram adicionados aos meios de cultura antes da autoclavagem.

3.5.3. Condições de Cultura

Todas as culturas *in vitro* (à exceção da germinação das sementes e dos testes de desinfestação de gemas axilares retiradas de plantas adultas) foram realizadas em frascos de vidro com 6,5 cm de diâmetro contendo 25 ml de meio de cultura por frasco, tampados com papel alumínio e envoltos por duas camadas de película de PVC.

As culturas foram mantidas na sala de crescimento do Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. As condições foram: temperatura de $25 \pm 3^\circ \text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $\pm 40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes da marca Philips “Luz do dia”) e fotoperíodo de 16 horas.

3.5.4 Experimentos de Indução de Brotações Múltiplas Utilizando o Meio de Cultura MS

Experimento 1. Dois tipos de segmentos, nodais (1,2 cm de comprimento) e apicais (0,8 cm de comprimento) foram inoculados em meio de cultura MS, acrescido de BAP nas concentrações de 2,5; 5,0; 10 e $20 \mu\text{M}$ e no meio controle sem BAP.

Experimento 2. Foram utilizados segmentos nodais e apicais, que foram inoculados em meio de cultura MS, acrescido de 2,5; 5,0; 10 e $20 \mu\text{M}$ de 2-iP e no meio controle sem 2-iP.

Nos dois experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado para os dois fitorreguladores. O arranjo fatorial dos tratamentos 5x2 foi utilizado, para estudar a interação entre as concentrações de citocinina e o tipo de segmento. Foram utilizadas 8 repetições por tratamento e a unidade experimental era composta por dois frascos com três

segmentos nodais cada.

Para as variáveis percentagem de explantes mortos (não reativos), percentagem de explantes com brotos e número médio de brotos novos por explante, os dados foram transformados para $(x+1)$, sendo o valor de “x” expresso na forma decimal.

Nos dois experimentos, os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey, com exceção da variável comprimento dos brotos, para a qual não foi realizada análise estatística em razão do grande número de valores nulos em algumas repetições dos tratamentos. O programa estatístico utilizado foi o MSTAT-C.

Experimento 3. Esse foi realizado utilizando o meio de cultura MS e rebrotas (brotos originados do nó cotiledonar, após a poda da parte aérea da planta) com 70 dias de idade, de plantas germinadas e crescidas *in vitro*. As rebrotas foram seccionadas em segmentos nodais de aproximadamente 1,4 cm de comprimento, contendo duas gemas axilares alternas. O ápice caulinar foi descartado.

As citocininas testadas foram BAP ou 2-iP na concentração de 2,5 μM e as duas combinadas na mesma concentração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 repetições por tratamento, a unidade experimental sendo composta por dois frascos com três segmentos nodais em cada.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Para as variáveis percentagem de explantes mortos, percentagem de explantes com brotos e número médio de brotos novos por explante, os dados foram transformados para $(x+1)$, sendo o valor de “x” expresso na forma decimal.

3.5.5 Experimentos de Indução de Brotações Múltiplas Utilizando o Meio de Cultura WPM

Segmentos nodais (1,2 cm de comprimento) e apicais (0,8 cm de comprimento) obtidos de plantas germinadas e crescidas *in vitro* com 70 dias de idade foram inoculados em meio de cultura WPM, acrescido de 0, 2,5 e 5,0 μM de BAP. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 repetições e a unidade experimental foi composta por dois frascos com três segmentos nodais cada.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, para as variáveis percentagem de explantes mortos,

percentagem de explantes com brotos e o número médio de brotos novos por explante. Os dados dessas variáveis foram transformados para $(x+1)$, sendo o valor de “x” expresso na forma decimal.

A variável comprimento dos brotos não foi submetida à análise estatística em razão do grande número de valores nulos em algumas repetições dos tratamentos. O programa estatístico utilizado foi o MSTAT-C.

3.5.6 Subcultivos

No cultivo inicial, as avaliações foram realizadas após 45 dias da inoculação dos explantes. Porém, nos quatro subcultivos, essas foram realizadas a cada 30 dias. Após as avaliações, os explantes tiveram a extremidade inferior cortada novamente em bisel e foram subcultivados em meio de cultura com as mesmas composições iniciais e as mesmas concentrações de citocininas.

Os explantes foram avaliados, considerando as seguintes variáveis: número inicial de gemas em cada tratamento, número de gemas ao final da subcultura, incluindo as gemas dos novos brotos formados, número de explantes mortos e tamanho dos brotos superiores a 0,5 cm. A partir desses dados foi calculada a taxa de multiplicação da seguinte maneira: o número final de gemas no final da subcultura, incluindo as gemas axilares dos brotos, foi dividido pelo número de gemas no início da subcultura. Também foram calculados a percentagem de explantes com brotos, o número médio de brotos (com caule > 0,5 cm) novos por explante com broto (para o cálculo desta variável, foram considerados apenas os brotos novos produzidos em cada subcultivo, divididos pelo número de propágulos com brotos presentes em cada subcultivo), o comprimento médio dos brotos e a percentagem de explantes mortos. Foi considerado propágulo toda estrutura utilizada para multiplicação vegetativa da planta, segundo a definição de TORRES et al. (1999).

Nos experimentos utilizando o meio de cultura MS, acrescido de BAP ou 2-IP, antes de realizar o 2º subcultivo, todos os segmentos nodais contendo duas gemas opostas (maiores que 0,3 cm) foram divididos em dois explantes, cada um com uma gema axilar. Já nos experimentos com o meio de cultura MS utilizando segmentos nodais de rebrotas e no experimento com WPM acrescido de BAP utilizando segmentos nodais e apicais, a divisão das gemas axilares (maiores que 0,3 cm) presentes nos segmentos dos explantes foi realizada antes do início do 1º subcultivo, pois o tamanho das gemas axilares foi utilizado como padrão

para a divisão. Nos subcultivos subseqüentes, as gemas maiores que 0,3 cm foram separadas dos brotos e também, foram divididos os brotos quando era possível a obtenção de propágulos maiores que 0,4 cm (Figura 1).

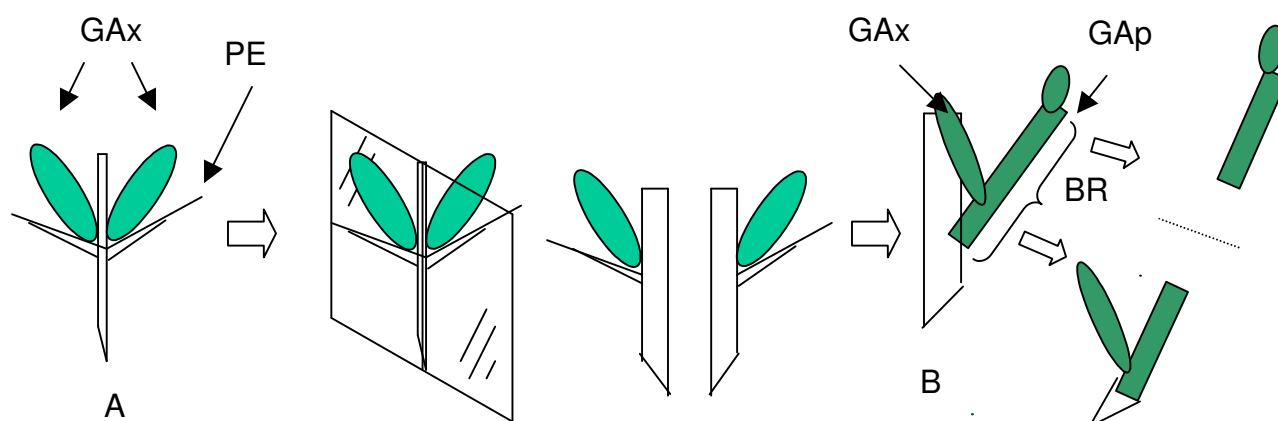


FIGURA 1 - A - Segmento nodal com duas gemas axilares (GAx) na base dos pecíolos (PE), quando seccionado produziu dois explantes;

B - Um explante subcultivado produziu um broto (BR) com gema apical (GAp) e uma gema axilar (> 0,3 cm), essa foi separada para posterior subcultivo.

3.6 EXPERIMENTO DE ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE BROTOS (MICROESTACAS) OBTIDOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO

Os brotos obtidos em meio de cultura MS e em tratamentos com BAP (2,5, 5,0 e 10 μ M), depois de quatro subcultivos foram transferidos para o meio WPM adicionado de BAP 2,5 μ M, para o alongamento destes. Depois de 30 dias, os brotos com comprimento maior ou igual a 1,0 cm, foram seccionados em bisel na base para confecção de microestacas, as quais foram colocadas em meio de cultura WPM em três tratamentos sem e com 2,5 μ M e 5,0 μ M de AIB, para testar o enraizamento. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, sendo composto por 11 repetições de cada unidade experimental com quatro microestacas por frasco. Aos 30 e 60 dias, foram observadas as seguintes variáveis: percentagem de microestacas enraizadas, número médio de raízes e o comprimento médio das raízes.

3.7 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS OBTIDAS DE REBROTAS DE PLÂNTULAS GERMINADAS E CRESCIDAS *IN VITRO*

As microestacas foram obtidas a partir de rebrotas (com \pm 9 meses de idade) de plântulas das quais foram retirados os explantes para os experimentos de multiplicação. As microestacas foram confeccionadas com aproximadamente 2 cm de comprimento, duas folhas na porção apical e a base cortada em bisel duplo. Foram inoculadas em meio de cultura MS/2 (MS com a concentração de sais reduzida pela metade).

No experimento 1 foram aplicados 4 tratamentos: 0; 2,5; 5,0 e 10 μ M de AIB, adicionado aos meios de cultura.

No experimento 2, os tratamentos utilizados foram os mesmos do experimento 1, porém as microestacas permaneceram apenas 7 dias nos meios de cultura citados e na ausência de luz. Depois desse período, as microestacas foram retiradas dos respectivos tratamentos e transferidas para o meio de cultura MS/2 sem a adição de AIB.

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, contendo 10 microestacas por repetição.

A avaliação dos experimentos foi realizada com 30 e 60 dias após a instalação e as variáveis observadas foram: percentagem de microestacas enraizadas, número médio de raízes e comprimento médio das raízes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DEISCÊNCIA DE FRUTOS

Os resultados obtidos após 7 dias de armazenamento mostraram que esse período de armazenamento foi insuficiente para a deiscência dos frutos, pois apenas 3% deles abriram totalmente quando submetidos ao 1º tratamento com saco plástico sem serragem e, no tratamento com serragem, nenhum fruto sofreu deiscência.

Após 11 dias de armazenamento, foi verificado que existiam frutos fungados, abertos totalmente (com cinco fissuras) e parcialmente (com menos de 5 fissuras) (Figura 2-A) (Tabela 2).

De acordo com a percentagem de frutos abertos totalmente e parcialmente, o melhor tratamento para deiscência dos frutos foi o de armazenamento em saco plástico sem serragem, por 11 dias.

A análise estatística utilizando o teste-t para a comparação dos dois tratamentos revelou diferença estatística para as seguintes variáveis: frutos totalmente abertos, frutos parcialmente abertos e frutos fechados. Para essas variáveis o melhor tratamento para deiscência foi com saco plástico sem serragem (Tabela 2). O resultado apresentado nos sugere que, para deiscência de frutos de canjarana, devem ser utilizados sacos plásticos fechados. Entretanto, INOUE (1978) que também estudou a deiscência dos frutos de *Cabralea* sp., obteve a maior percentagem de frutos abertos em sacos plásticos com serragem e justificou o resultado pela absorção de parte da umidade interna pela serragem, essencial para deiscência. No presente trabalho, provavelmente a umidade presente nos frutos era suficiente para sua deiscência, logo a serragem pode ter absorvido parte da umidade necessária para deiscência dos frutos. A alta percentagem de frutos fungados nos dois tratamentos pode ser devida à falta de assepsia antes da utilização dos frutos no experimento e também às condições favoráveis para o desenvolvimento das hifas de fungos pré-existent na superfície dos frutos.

TABELA 2 - RESULTADOS DE DEISCÊNCIA DE FRUTOS DE CANJARANA, ARMAZENADOS EM SACO PLÁSTICO SEM E COM SERRAGEM, APÓS 11 DIAS

Variáveis	Tratamento sem serragem Média ± desvio padrão	Tratamento com serragem Média ± desvio padrão	Teste-t
Frutos abertos totalmente (%)	10,40 ± 2,31	1,50 ± 3,00	t= 3,70; G.L= 5; P> 0,03
Frutos abertos parcialmente (%)	57,37 ± 2,08	16,00 ± 7,08	t= 9,95; G.L= 5; P> 0,0002
Frutos fechados (%)	32,23 ± 3,05	82,50 ± 23,04	t= - 4,79; G.L= 5; P> 0,0049
Frutos fungados*(%)	77,66 ± 6,02	68,25 ± 21,82	t= 0,71; G.L= 5; P< 0,508

* Frutos (abertos parcialmente ou totalmente) com apenas o pericarpo contaminado, também, foram utilizados para obtenção das sementes.

4.2 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

O tratamento com 2,5% de hipoclorito de sódio, durante 30 minutos, apresentou o melhor resultado de desinfestação (75%) e de germinação (65% após 7 dias e 90% após 14 dias) (Tabela 3 e Anexos 1, 2 e 3 e Figura 2-letras B e C).

Houve diferença estatisticamente significativa na desinfestação das sementes apenas entre as concentrações de hipoclorito de sódio 1% (v/v) e 2,5% no tempo de 30 minutos, nas quais encontraram-se a maior e a menor percentagem de contaminação. Em outro trabalho com *Cedrela fissilis*, as sementes também foram desinfestadas com hipoclorito de sódio na mesma concentração, porém por 75 minutos (NUNES et al., 2002). No experimento com a canjarana, um menor tempo de exposição ao agente desinfestante foi efetivo provavelmente, devido às sementes na sua maioria terem sido obtidas ainda dentro dos frutos, dos quais grande parte sofreu deiscência no próprio laboratório. CHENG et al. (1992) também desinfestaram sementes de *Eucalyptus sideroxylon* com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos.

No mesmo experimento houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com hipoclorito de sódio, para a germinação de sementes aos 14 dias, sendo que os melhores resultados foram observados na concentração de 2,5% (v/v) nos dois tempos testados (Tabela 3).

TABELA 3 - EFEITO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO NA PERCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO E DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE CANJARANA APÓS 7 DIAS, E NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* APÓS 7 E 14 DIAS

Concentração de hipoclorito de sódio (%)	Tempo de exposição (min)	Contaminação por fungos e/ou bactérias após 7 dias (%)	Sementes e germinadas após 7 dias (%)	Sementes e germinadas após 14 dias (%)
1,0	20'	38 ab	33 ab	34 b
1,0	30'	68 a	23 ab	32 b
2,5	20'	50 ab	38 ab	70 a
2,5	30'	25 b	65 a	90 a
5,0	20'	46 ab	15 b	20 b
5,0	30'	55 ab	37 ab	40 b

Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O hipoclorito de sódio é um potente oxidante. Sua ação pode ser resultante de modificações nas propriedades das membranas celulares do tegumento ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente, aumentando desta forma a percentagem de germinação (HSIAO; QUICK, 1984). Sendo assim, o hipoclorito de sódio pode ter influenciado a percentagem de germinação da canjarana. Porém, a maior percentagem de germinação foi obtida em uma concentração intermediária de hipoclorito de sódio (2,5% (v/v)). Esse resultado pode ser devido às altas percentagens de contaminação das sementes desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1,0% e 5,0% (v/v). Além disso, a maior concentração de hipoclorito de sódio pode ter causado a necrose de tecidos, já que foi observada a perda de parte da coloração de algumas sementes e a necrose de algumas radículas.

4.3 DESINFESTAÇÃO DE GEMAS AXILARES PROVENIENTES DE ÁRVORES ADULTAS

Os resultados de experimentos de desinfestação das gemas axilares nas concentrações propostas de hipoclorito de sódio podem ser observados na Tabela 4. As concentrações de hipoclorito de sódio aqui testadas foram escolhidas por terem sido já testadas em outros trabalhos com outras espécies como *Psidium guajava*, *Cinnamomum camphora* e *Azadirachta excelsa*. Entretanto, a desinfestação total ou em uma porcentagem suficiente para realização de experimentos não foi obtida.

TABELA 4 - RESULTADOS DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DE GEMAS AXILARES DE ÁRVORES ADULTAS DE CANJARANA, APÓS 14 DIAS DE CULTIVO

Experimentos	Concentrações do hipoclorito de sódio (%)	Tempo de exposição ao desinfestante	Contaminações com fungos (%)	Contaminações com bactérias (%)	Contaminações com fungos e bactérias (%)
1	0,03; 0,06; 0,12; 0,24; 0,5	4'	0	0	100
2	6; 8,4; 9,6; 10,8	8'	100	0	0
3	6 e 8,4	20'	50	47	0
4	(pH ajustado em 6,0)				
	0,5	15'	73	0	27
	1,0;		55	0	45
	2,0		85	0	15
	(pH ajustado em 6,0)				
	0,5	20'	75	0	25
1,0;		75	0	25	
2,0		80	0	20	

As gemas axilares desinfestadas foram colocadas em placas de Petri, em meio de cultura MS estéril. Porém, após 7 dias, a maioria delas estava contaminada. Entretanto, alguns explantes sobreviveram após a desinfestação com as maiores concentrações de hipoclorito de sódio, 6 e 8,4% (v/v), as quais levaram essas a oxidação. Resultados similares de oxidação foram observados por AMIN e JAISWAL (1988) nos explantes retirados de plantas adultas de goaibeira (*Psidium guajava*). Optou-se por não continuar os experimentos com gemas axilares de árvores adultas, pois além da dificuldade de obter explantes desinfestados em número suficiente para a realização de experimentos de multiplicação, foi observada a oxidação dos explantes desinfestados.

Resultados similares de contaminação foram observados por SCUTTI (1999) em segmentos nodais retirados de plantas adultas de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.), mantidas em condições de campo, que apresentaram 100% de contaminação depois de tratamentos com hipoclorito de sódio (10% e 20% por 5 e 10 minutos).

CHATURVEDI et al. (2004) também relataram a dificuldade de desinfestação de segmentos nodais retirados de plantas adultas de *Azadirachta indica*, uma Meliaceae como a canjarana. Os autores citados obtiveram uma percentagem de contaminação dos explantes de 20 a 100 %.

Apesar da regeneração de tecidos em explantes retirados de espécies lenhosas adultas ser baixa (JAMES et al., 1988) e haver maior dificuldade de desinfestação do material adulto, a micropropagação utilizando esse tipo de material é freqüentemente escolhida, pois podem ser selecionadas plantas que demonstram características de interesse (BONGA; ADERKAS, 1992). Entretanto, protocolos de micropropagação a partir de material juvenil apresentam algumas vantagens do ponto de vista experimental, pois pode ser obtido um grande número de explantes sem contaminação e esses explantes têm elevada capacidade de crescimento e também rápida resposta à aplicação de fitorreguladores. Logo, esse tipo de explante pode orientar e auxiliar a elaboração de protocolos para explantes retirados de plantas adultas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

4.4 MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES

4.4.1 Culturas em Meio de Cultura MS

4.4.1.1 Efeito da benzilaminopurina e da 2-Isopenteniladenina na multiplicação de gemas axilares em segmentos nodais e apicais

4.4.1.1.1 Taxa de multiplicação obtida com a utilização de BAP e 2-iP

Os resultados da análise de variância (Anexo 4) indicaram que a interação entre os fatores (tipo de segmento e concentrações de BAP) foi significativa, revelando que os fatores não são independentes, para todos os subcultivos com exceção do último (para esse houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações e entre os tipos de segmento). Logo, quando a interação é significativa, o melhor resultado para as concentrações de BAP depende do tipo de segmento utilizado.

O teste de Tukey (Tabela 5) revelou que, para o segmento nodal (Figura 3-B), no cultivo inicial, as taxas de multiplicação obtidas com 2,5 e 5,0 μM de BAP não diferiram entre si e foram superiores às demais concentrações testadas (Figura 3-letras A e B). No 1º e 3º subcultivos, a taxa de multiplicação obtida com 2,5 μM de BAP, foi superior e diferiu das demais doses testadas, porém no 2º subcultivo a concentração de 5,0 μM de BAP, foi superior e diferiu das demais (Figura 3-letras C, D e E).

Para o segmento apical, no cultivo inicial, a taxa de multiplicação obtida com 2,5 μM de BAP foi superior e diferiu das outras. Para o 1º e 2º subcultivos, as médias de taxa de multiplicação na concentração de 5,0 μM de BAP foram superiores e diferiram das demais. Já, no 3º subcultivo as médias das taxas de multiplicação não diferiram entre si.

TABELA 5 – TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM EXPLANTES DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS, EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

BAP (μM)	Cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo		4º subcultivo
	SN*	SA*	SN	SA	SN	SA	SN	SA	SN e SA
0	1,00 c A	1,00 b A	1,00 c A	1,00 d A	1,00 c A	1,00 b A	1,00 b A	1,00 a A	1,00 b
2,5	1,57 a A	1,29 a B	1,72 a A	1,15 c B	1,41 b A	1,02 b B	1,24 a A	1,04 a B	1,09 a
5,0	1,46 a A	1,13 b B	1,31 b A	1,37 a A	1,77 a A	1,16 a B	1,05 b A	1,06 a A	1,05 ab
10	1,20 b A	1,02 b B	1,02 c B	1,25 b A	1,10 c A	1,00 b B	1,03 b A	1,00 a A	1,05 ab
20	1,00 c A	1,00 b A	1,00 c A	1,00 d A	1,00 c A	1,00 b A	1,00 b A	1,00 a A	1,00 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na vertical, e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

SN- Segmento Nodal; SA- Segmento Apical

No 4º subcultivo, apesar de não haver interação significativa entre os fatores, a taxa de multiplicação da concentração de 2,5 μM diferiu e foi superior a média das concentrações de 0 e 20 μM de BAP independente do tipo de segmento (Tabela 5). O melhor tipo de segmento, independente da concentração de BAP, foi o nodal, o qual proporcionou a maior taxa de multiplicação (média de todas as concentrações de BAP para o segmento nodal 1,06).

A taxa de multiplicação da canjarana foi baixa em ambos os tipos de segmentos nas concentrações de BAP testadas. No entanto, as concentrações de BAP que forneceram os melhores resultados para os dois tipos de segmentos foram 2,5 e 5,0 μM em todos os subcultivos, e as maiores taxas de multiplicação foram observadas no segmento nodal (Tabela 5).

Os resultados da análise de variância para o experimento com 2-iP (Anexo 5) indicaram que a interação entre os fatores foi significativa para o cultivo inicial e para o 1º e 2º subcultivo, revelando que os fatores tipo de segmento e concentrações de 2-iP não são independentes. Portanto, o melhor resultado para as concentrações de 2-iP depende do tipo de segmento. Os resultados da análise de variância para o 3º e 4º subcultivo na presença de 2iP (Anexo 5), indicam que a interação entre os fatores não foi significativa e não houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações e entre os tipos de segmentos. Por essa razão o teste de Tukey não foi realizado.

Para o segmento nodal, no cultivo inicial, as médias de taxa de multiplicação obtidas com 2,5, 5,0 e 10 μM de 2-iP não diferiram estatisticamente e foram superiores às médias obtidas com as demais concentrações testadas. No 1º subcultivo, as taxas obtidas na presença de 2,5 e 5,0 μM de 2-iP, diferiram do controle e da taxa obtida com uma concentração de 20 μM e foram superiores, porém não diferiram do tratamento com 10 μM . Para o 2º subcultivo (Figura 4-C), as taxas nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM de 2-iP, diferiram estatisticamente das outras e foram superiores. Para o 3º e 4º subcultivo não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Tabela 6).

O mesmo teste foi realizado para o segmento apical e revelou que, no cultivo inicial e no 1º subcultivo, as médias de taxa de multiplicação foram superiores na concentração de 2,5 μM de 2-iP e diferiram das outras. Nos subcultivos seguintes, elas não diferiram estatisticamente entre si. Quando comparados os resultados obtidos com os dois tipos de segmentos em função da concentração de 2-iP (Tabela 6), se observou que, no cultivo inicial, a taxa de multiplicação dos segmentos apicais foi superior e diferiu estatisticamente daquela dos segmentos nodais para a concentração de 2,5 μM de 2-iP. Para o 1º subcultivo, a taxa dos segmentos nodais foi superior e diferiu estatisticamente da taxa dos segmentos apicais cultivados com 5,0 μM e 10 μM de 2-iP. No 2º subcultivo, o segmento nodal também proporcionou um valor superior que diferiu estatisticamente do valor do segmento apical nas duas concentrações citadas. Em conclusão, somente no cultivo inicial não se observou o resultado obtido no experimento com BAP, no qual o melhor tipo de segmento foi o nodal.

TABELA 6 – TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM EXPLANTES DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

2-iP (μM)	Cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo		4º subcultivo	
	SN*	SA*	SN	SA	SN	SA	SN	SA	SN	SA
0	1,00 b A	1,00 d A	1,00 b A	1,00 b A	1,00 c A	1,00 a A	1,02	1,00	1,03	1,00
2,5	1,19 a B	1,46 a A	1,16 a A	1,17 a A	1,22 b A	1,02 a B	1,02	1,00	1,00	1,00
5,0	1,28 a A	1,29 b A	1,18 a A	1,05 b B	1,41 a A	1,00 a B	1,00	1,00	1,00	1,00
10	1,20 a A	1,17 bc A	1,10 ab A	1,00 b B	1,00 c A	1,00 a A	1,00	1,00	1,00	1,00
20	1,00 b B	1,13 cd A	1,00 b A	1,00 b A	1,00 c A	1,00 a A	1,00	1,00	1,00	1,00

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*SN- Segmento Nodal; *SA- Segmento Apical

Comparando os resultados obtidos com BAP e 2-iP, verificou-se que as melhores taxas de multiplicação foram obtidas com BAP. Entretanto, esse resultado não é satisfatório, já que a maior taxa de multiplicação na presença de 2,5 e 5,0 μM de BAP (nas quais foram observados

os maiores valores), não alcançou o valor de 2 (Tabela 5). Este resultado é semelhante ao descrito por TRAUTMANN e VISSER (1990) com *Parthenium argentatum* (espécie arbustiva fonte de látex, pertencente à família Asteraceae). Pois, quando esses autores compararam as taxas de multiplicação obtidas com as duas citocininas, observaram como em nosso trabalho que na presença de BAP (2,22 μM) foi obtida a maior taxa de multiplicação. Na presença dessa citocinina, após 3 semanas de subcultivo, houve uma produção média de $10,67 \pm 5,15$ brotos por explante. Bons resultados com altas taxas de multiplicação, também foram obtidos pelos autores citados quando utilizaram a concentração de 4,44 μM de BAP, porém o aspecto dos brotos era menos saudável (parte dos brotos eram vitrificados) que na concentração de 2,22 μM .

Outros pesquisadores verificaram que, no caso de *Grevillea*, a adição de BAP no meio de cultura, freqüentemente promove o aumento do número de gemas produzidas em cada segmento nodal (com dois nós). Porém, altas concentrações dessa citocinina podem inibir a diferenciação de gemas e, conseqüentemente, a produção de brotos (LEONARDI et al., 2001). Foi o que ocorreu no presente trabalho, pois nos tratamentos com altas concentrações, obtiveram-se valores mínimos para as taxas de multiplicação e nenhuma formação de brotos.

A aplicação de 2-iP em concentrações semelhantes em canjarana e mogno resultou em taxas de multiplicação baixas, porém para o último inferiores a 1,00, sendo ainda observado em ambas as espécies pouco alongamento dos brotos nos tratamentos com a citocinina citada (Tabela 21) (SCHOTTZ, 2003). Baixas taxas de multiplicação (1,4 e 1,1 brotos por segmento) foram observadas por AUGUSTO (2001) nas concentrações de 5 e 10 μM de 2-iP, respectivamente, em segmentos nodais de amoreira-preta, cv. Brazos, cultivados em meio de cultura MS. Essa resposta pode ser devida ao fato que a enzima citocinina oxidase dos tecidos degrada a 2-iP por meio do rompimento da ligação da cadeia lateral da molécula. Em conseqüência, baixos índices de multiplicação são obtidos (GEORGE, 1993).

No presente trabalho foram realizados quatro subcultivos a cada 30 dias. De acordo com VENGADESAN et al. (2002), subcultivos freqüentes em intervalos de 25 a 30 dias têm uma importante influência no aumento da multiplicação de gemas e no desenvolvimento de brotos, pois repetidos subcultivos causam a ativação e o condicionamento dos meristemas. Entretanto, nesse trabalho no geral a taxa de multiplicação variou pouco entre os subcultivos, às vezes aumentando e depois diminuindo no subcultivo seguinte (Tabela 5). Esse resultado é provavelmente devido ao crescimento dos brotos para posterior desenvolvimento de novas gemas axilares.

Em algumas espécies, o número de subcultivos para a máxima multiplicação de brotos já é conhecido, como é o caso de *Dieffenbachia exotica* cultivar Marianna, na qual 3 sucessivas subculturas produzem o maior número de brotos (14,5 por explante). Depois desse período o número de brotos novos diminui (VOYATZI; VOYATZIS, 1989). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, em meio de cultura MS, as maiores taxas de multiplicação de gemas, assim como, os maiores números de brotos, dentro dos subcultivos realizados, também foram observados até o terceiro subcultivo (Tabelas 5 e 9). Ao contrário, em *Vaccinium macrocarpon*, repetidos subcultivos aumentaram o número de brotos, entretanto, os autores não indicaram em qual subcultivo houve o número máximo de brotos (DEBNATH; McRAE, 2001).

4.4.1.1.2 Efeito da BAP e da 2-iP na percentagem de explantes com brotos

Os resultados da análise de variância para o experimento com BAP (Anexo 6) indicaram que a interação entre os fatores (tipo de segmento e concentrações de BAP) foi significativa para os subcultivos, revelando que não são independentes, com exceção da cultura inicial. Portanto, podemos concluir que o melhor resultado para as concentrações de BAP depende do tipo de segmento, como no caso da taxa de multiplicação. As maiores percentagens de explantes com brotos foram obtidas com segmento nodal, chegando a quase 50% no 3º subcultivo na concentração de 2,5 µM de BAP, a qual foi superior e diferiu estatisticamente das demais concentrações (Tabela 7).

Para o segmento apical, a maior percentagem de explantes com brotos foi de 14,60%, no 1º subcultivo, na concentração de 10 µM de BAP, a qual diferiu estatisticamente das demais, com exceção da concentração de 2,5 µM de BAP.

TABELA 7 – PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA COM BROTOS NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

BAP (µM)	Cultivo inicial	1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo		4º subcultivo	
	SN e SA	SN	SA	SN	SA	SN	SA	SN	SA
0	0,00 c	2,10 c A	0,00 b A	2,10 c A	4,20 a A	0,00 c A	4,10 a A	0,00 b A	0,00 a A
2,5	26,61 a	26,70 a A	2,10 ab B	36,66 a A	8,30 a B	49,50 a A	8,30 a B	21,70 a A	7,10 a B
5,0	10,41 b	20,04 ab A	0,00 b B	22,50 ab A	7,50 a B	26,66 b A	3,10 a B	21,11 a A	0,00 a B
10	0,60 bc	11,50 bc A	14,60 a A	20,80 b A	0,00 a B	20,40 b A	13,80a B	9,51 ab A	9,41 a A
20	0,00 c	0,00 c A	0,00 b A	0,00 c A	0,00 a A	0,00 c A	0,00a A	0,00 b A	0,00 b A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

SN- Segmento Nodal; SA- Segmento Apical

No cultivo inicial, a maior porcentagem de explantes com brotos (26,61%) foi obtida na concentração de 2,5 μM de BAP, independente do tipo de segmento utilizado (Tabela 7).

Para o experimento com 2-iP, os resultados da análise de variância (Anexo 7) indicaram que a interação entre os fatores foi significativa apenas para o 2º subcultivo, revelando que os fatores tipo de segmento e concentrações de 2-iP não são independentes, para esse subcultivo. Mesmo não havendo interação entre os fatores para o cultivo inicial e o 1º subcultivo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de 2-iP e os tipos de segmento. Já para o 3º subcultivo não houve diferenças significativas estatisticamente.

No cultivo inicial a maior porcentagem de explantes com brotos foi observada na presença de 2,5 μM de 2-iP, (Tabela 8) a qual diferiu das demais concentrações testadas. O melhor tipo de segmento para essa variável nesse cultivo foi o segmento nodal (7%), o qual diferiu do apical (2%). No 1º subcultivo a maior porcentagem também foi observada na concentração de 2,5 μM de 2-iP, independente do tipo de segmento. Porém, essa diferiu estatisticamente apenas do controle e foi menor que no cultivo inicial. No 2º subcultivo (Tabela 18), foi observada a maior porcentagem de explantes com brotos (40%) no caso do segmento nodal, na concentração já citada.

No caso do segmento apical, houve diferença estatisticamente significativa apenas no 2º subcultivo, no qual a porcentagem de explantes com brotos foi superior na presença de 2,5 μM de 2-iP e diferiu estatisticamente das demais. (Tabela 8).

Quando comparados os dois tipos de segmentos, as maiores porcentagens de explantes com brotos foram observadas no segmento nodal, geralmente nas concentrações de 2,5 μM , 5,0 μM e 10 μM de 2-iP. Esses valores diferiram estatisticamente e foram superiores aos obtidos com segmento apical.

TABELA 8 - PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA COM BROTOS NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

2-iP (μM)	Cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo		4º subcultivo			
	Médias		Médias		SN	SA	SN	SA	SN	SA		
0	1,00	b	1,00	b	2,10	b A	4,10	b A	0,00	4,00	0,00	0,00
2,5	18,50	a	14,50	a	40,50	a A	20,81	a B	2,00	8,00	0,00	0,00
5,0	1,00	b	9,83	ab	10,61	b A	0,00	b B	2,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	b	4,45	ab	12,53	b A	0,00	b B	0,00	0,00	0,00	0,00
20	3,00	b	11,92	ab	0,00	b A	0,00	b A	0,00	0,00	0,00	0,00

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na vertical e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

SN-Segmento Nodal; SA-Segmento Apical

De acordo com as variáveis taxas de multiplicação e percentagem de explantes com brotos, no geral os melhores resultados foram obtidos no experimento com BAP para os mesmos tratamentos, ou seja, as gemas axilares produzidas nesses tratamentos alongaram-se em brotos.

4.4.1.1.3 Efeito da BAP e da 2-iP no número de brotos por explante

Os maiores números médios de brotos em explantes com brotos foram observados no tratamento com 2,5 μM de BAP com um valor máximo de 1,59 em explantes originados de segmentos nodais (Anexo 8 e Tabela 9). Para essa variável e para a taxa de multiplicação (Tabela 5) os resultados demonstraram que, apesar de ter ocorrido pouca resposta, o melhor tipo de explante foi o segmento nodal, nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM de BAP. Resultados similares foram observados por HUANG et al. (1998), quando utilizaram segmentos nodais e apicais de plantas de *Cinnamomum camphora* com dois anos de idade. O maior número de brotos foi obtido com segmentos nodais (9 brotos/segmento) inoculados em meio de cultura com 4,4 μM de BAP. No caso da guabirobeira, SCUTTI (1999), testando várias concentrações de BAP, obteve o maior número de brotos (3,13 por microestaca) de microestacas retiradas de plântulas crescidas *in vitro* com 2,2 μM de BAP, concentração semelhante àquela utilizada para a canjarana. Os valores obtidos nos dois trabalhos citados são mais altos que os nossos. Isso possivelmente pode ser devido à uma menor produção de brotos pela canjarana e/ ou à forma de avaliação diferente em nosso trabalho, já que consideremos como brotos somente as gemas maiores que 0,5 cm e nestes trabalhos não houve essa distinção.

Com relação às concentrações testadas, a concentração mais alta de BAP (20 μM) apresentou um efeito inibitório na indução dos brotos, como também foi observado por LIEW e TEO (1998). Esses pesquisadores trabalharam com *Azadirachta excelsa* e verificaram que altas concentrações de BAP (44 μM) não induziam a formação de brotos. Para essa espécie o maior número de brotos foi obtido na concentração de 17,6 μM de BAP, porém os brotos formados eram vitrificados. Por essa razão, os autores sugeriram que as concentrações mais baixas de BAP são as melhores para a iniciação de brotos. Nos experimentos do presente trabalho, embora o número de brotos produzidos por explante seja pequeno, também foi verificado que as menores concentrações testadas induziram os maiores valores para essa variável.

Os brotos de canjarana não apresentaram hiperhidricidade, ao contrário do que foi observado por NUNES et al. (1999) no porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus*

prunifolia) e por LIEW e TEO (1998) em *Azadirachta excelsa*. Segundo esses autores, menores concentrações de BAP produziram um maior número de brotos não-vitrificados, evidenciando que as maiores concentrações de BAP podem ser um dos fatores envolvidos no descontrole do potencial hídrico nas células. Além disso, no caso de Marubakaido, foi mostrado que as altas concentrações de BAP podem diminuir as taxas de divisão celular, como ocorre nas células dos centros quiescentes dos ápices radiculares, e provocar um menor desempenho de todas as variáveis estudadas (número de brotos e número de entrenós) (NUNES et al., 1999).

TABELA 9 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR EXPLANTE COM BROTO DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

BAP (μ M)	Cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo		4º subcultivo	
	SN*	SA*	SN	SA	SN	SA	SN	SA	SN	SA
0	0,00 cA	0,00 cA	0,13 dA	0,00 cA	0,13 cA	0,13 aA	0,00 cA	0,13 bcB	0,00 dA	0,00 cA
2,5	1,19 aA	0,81 aB	1,32 Aa	0,13 bB	1,59 aA	0,31 aB	1,46 aA	0,50 a B	1,56 aA	0,38 aB
5,0	0,48 bA	0,25 bB	0,67 bA	0,00 cB	0,94 bA	0,25 aB	0,75 bA	0,13 bcB	0,88 bA	0,00 cB
10	0,13 cA	0,13 cA	0,38 cA	0,38 aA	0,87 bA	0,00 bB	0,75 bA	0,13 bcB	0,63 cA	0,25 bB
20	0,00 cA	0,00 cA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 c A	0,00 dA	0,00 cB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na vertical e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

SN*-Segmento Nodal; SA*- Segmento Apical

Analisando as taxas de multiplicação e os números médios de brotos, observou-se que em alguns casos houve multiplicação de gemas, sem que houvesse crescimento destas e formação de brotos, principalmente no cultivo inicial. Por essa razão, o número médio de brotos pode ser igual a zero. Podemos também verificar casos onde as taxas de multiplicação foram iguais a 1,0 (nas quais não houve aumento do número de gemas axilares), mas houve formação de brotos, já que foi observado o crescimento das gemas axilares pré-existentes (gema > 0,5 cm é considerada broto).

Os resultados obtidos quando o 2-iP foi adicionado aos meios de cultura demonstraram que, na maioria dos subcultivos, as taxas de multiplicação de gemas e o número de brotos foram maiores nos segmentos nodais. Esse resultado também foi observado por DEBNATH e McRAE (2001), os quais constataram que a maior produção de brotos foi obtida em segmentos nodais de *Vaccinium macrocarpon* cultivados em meio de cultura adicionado de 12,3 μ M e 24,6 μ M de 2-iP, quando esses foram comparados aos segmentos apicais. No mesmo trabalho, foi demonstrado que concentrações maiores provocaram uma alta mortalidade, impedindo o crescimento dos brotos e a proliferação de gemas, resultando em brotos com menor vigor.

As médias dos comprimentos dos brotos para ambos os tipos de segmentos no experimento com 2-iP somente, são apresentadas na Tabela 12.

TABELA 12 - MÉDIAS DOS COMPRIMENTOS DOS BROTOS (cm) FORMADOS EM EXPLANTES DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE 2-iP, NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

Concentrações de 2-iP (μM)	cultivo inicial		1° subcultivo		2° subcultivo		3° subcultivo		4° subcultivo	
	SN	SA	SN	SA	SN	SA	SN	SA	SN	SA
0	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	0,50	0,00	0,55	0,88	0,52	0,53	0,60	0,50	0,00	0,00
5,0	0,50	0,50	0,54	0,00	0,55	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,50	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,50	0,00	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Os resultados indicaram que o comprimento dos brotos em ambos os experimentos apresentou valores inferiores a 1 cm com poucas alterações no decorrer dos subcultivos.

4.4.1.1.5 Efeito da BAP e da 2-iP na percentagem de explantes mortos

Os resultados da análise de variância para o experimento com BAP (Anexo 9) indicaram que a interação entre os fatores (tipo de segmento e concentrações de BAP) foi significativa, revelando que os fatores não são independentes, para todos os cultivos com exceção do 2º subcultivo. Portanto, o melhor resultado para as concentrações de BAP depende do tipo de segmento.

Para o segmento nodal, no cultivo inicial, a maior percentagem de explantes mortos foi observada na concentração de 20 μM de BAP, diferindo estatisticamente e sendo superior às outras concentrações testadas. Já no 1º subcultivo as percentagens obtidas com 10 e 20 μM de BAP diferiram das demais e foram superiores, com exceção da concentração de 20 μM de BAP, pois nessa concentração a média foi estatisticamente igual à da concentração 5,0 μM de BAP (Tabela 13).

No 2º subcultivo, a interação não foi significativa. Apesar das concentrações não diferirem estatisticamente entre si (Tabela 15), a maior percentagem de explantes mortos independente da concentração, foi obtida no caso dos segmentos nodais (5%). No 3º subcultivo as concentrações também não diferiram entre si (Tabela 13). Já, no 4º subcultivo as concentrações de 5,0 e 10 μM de BAP induziram os maiores valores de necrose e diferiram estatisticamente das demais.

O mesmo teste foi realizado para o segmento apical e revelou que no cultivo inicial a percentagem de explantes mortos na concentração de 20 μM de BAP (54%) foi superior e diferiu das demais, assim como no segmento nodal. Para o 1º subcultivo, a percentagem de explantes mortos na concentração de 10 μM de BAP (65%) foi superior e diferiu das demais. Já, nos dois últimos subcultivos as percentagens foram superiores e diferiram estatisticamente dentre as concentrações testadas, na concentração de 2,5 μM e 5,0 μM de BAP, respectivamente.

TABELA 13 – NECROSE DOS EXPLANTES DE CANJARANA, NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

BAP (μM)	Cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo	3º subcultivo		4º subcultivo	
	SN*	SA*	SN	SA	SN e SA	SN	SA	SN	SA
0	2,10 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a	0,00 a A	10,50 a A	0,00 a A	0,00 a A
2,5	0,00 a A	4,12 a A	6,37 ab A	12,50 a A	4,25 a	6,37 a A	41,63 bA	2,12 a A	4,25 a A
5,0	0,00 a A	0,00 a A	18,87 bc B	2,12 a A	1,06 a	10,63 a A	6,25 a A	16,75 b A	35,38 c B
10	0,00 a A	2,12 a A	33,25 d A	64,50 cB	7,31 a	6,37 a A	0,00 a A	12,50 b A	16,63 b A
20	16,75 bA	54,16 b B	29,13 cdA	33,25 b A	2,06 a	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e as médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

SN- Segmento Nodal; SA- Segmento Apical

Para o experimento com 2-iP, os resultados da análise de variância (anexo 10) indicaram que a interação entre os fatores foi significativa, com exceção do 1º subcultivo, no qual houve diferença estatisticamente significativa apenas entre as concentrações. A interação significativa revela que os fatores tipo de segmento e concentração de 2-iP não são independentes.

No caso do segmento nodal, no cultivo inicial na presença de 2-iP, as médias das percentagens de explantes mortos não diferiram entre si. Já no 1º subcultivo, no qual não houve interação significativa entre os fatores, as concentrações mais elevadas 10 e 20 μM de 2-iP, diferiram das demais e proporcionaram as maiores percentagens de mortalidade, 18% e 32% respectivamente (Tabela 14).

No 2º subcultivo (Tabela 14), as concentrações de 5 e 10 μM de 2-iP, diferiram estatisticamente das outras e foram superiores as demais testadas. Entretanto, para o 3º subcultivo os valores dos dois primeiros tratamentos (2,5 e 5,0 μM) diferiram dos outros tratamentos e foram superiores, com exceção do tratamento com 10 μM , o qual foi estatisticamente igual ao do tratamento com 2,5 μM de 2-iP. No último subcultivo a

percentagem de explantes mortos foi superior na concentração de 2,5 μM de 2-iP e diferiu estatisticamente das percentagens obtidas com as demais concentrações testadas.

Para os segmentos apicais, no cultivo inicial, a percentagem média de explantes mortos foi superior na presença de 20 μM de 2-iP e diferiu das outras médias. Já no 2º e 4º subcultivos, as médias não diferiram estatisticamente entre si. No 3º subcultivo na concentração de 2,5 μM de 2-iP a percentagem de explantes mortos foi superior, com exceção da concentração de 5,0 μM de 2-iP, e diferiu estatisticamente das demais concentrações testadas.

Quando se comparam os resultados para o tipo de segmento, no 2º subcultivo, observa-se que houve menos necrose nos explantes formados a partir de segmentos apicais nas concentrações de 5,0, 10 e 20 μM de 2-iP. Entretanto, para o 3º subcultivo, o mesmo tipo de segmento diferiu e teve a menor percentagem de explantes mortos apenas na concentração 5,0 μM . Os resultados obtidos em ambos os tipos de segmentos, até o 2º subcultivo, mostraram que a concentração de 2,5 μM de 2-iP é a mais indicada para uma menor perda de explantes.

TABELA 14 – NECROSE DOS EXPLANTES DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, NO CULTIVO INICIAL E NO 1º SUBCULTIVO, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

2-iP (μM)	Cultivo inicial		1º subcultivo	2º subcultivo		3º subcultivo		4º subcultivo	
	SN	SA	SN e SA	SN*	SA*	SN	SA	SN	SA
0	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a A	2,12 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00aA	0,00aA
2,5	8,37 a	0,00 a	14,56 ab	14,63 b A	8,37 a A	16,80bcA	16,80 b A	37,39bB	2,12aA
5,0	6,25 a	8,37 a	11,57 ab	35,38 c B	2,12 a A	24,50 cB	4,10 b A	10,50aA	4,12aA
10	12,45 a	4,25 a	17,75 bc	29,13 c B	0,00 a A	4,30 abA	0,00 a A	0,00aA	0,00aA
20	2,12 a	27,00b	32,38 c	22,88 bcB	4,25 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00aA	0,00aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúsculas na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*SN- Segmento Nodal; *SA- Segmento Apical

Quando comparados dois tipos de segmentos no experimento com BAP, a menor percentagem de explantes mortos foi observada no caso dos segmentos nodais, sendo diferente estatisticamente da percentagem obtida com os segmentos apicais (Tabela 13).

Os resultados indicaram que as concentrações de 10 μM e 20 μM de BAP foram fitotóxicas aos dois tipos de segmentos, nos primeiros subcultivos. Nos demais subcultivos, a mortalidade não foi superior nas concentrações anteriormente citadas, pois restaram poucos explantes nessas concentrações. Em conclusão, a menor percentagem de explantes mortos foi observada nos meios de cultura adicionados de 2,5 μM e 5,0 μM de BAP, sendo essas concentrações as mais indicadas para uma menor perda de explantes. Já, para o mogno, outra

Meliaceae, a concentração de 20 μM de BAP foi a mais eficiente em promover a multiplicação das gemas a partir de segmentos nodais, com uma taxa de multiplicação de 2,95 aos 45 dias, enquanto que a concentração de 50 μM proporcionou uma elevada mortalidade como observado no nosso trabalho com 20 μM (SCHOTTZ, 2003).

Os melhores resultados obtidos com o segmento nodal, podem estar relacionados com a dominância apical, a qual é devida à auxina produzida pela gema apical e transportada para as gemas axilares, inibindo assim o crescimento destas. Porém, apesar da citocinina poder modificar o efeito da dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2004), no presente trabalho o desenvolvimento da gema axilar, em segmentos apicais, continuou sendo inibido mesmo quando estes permanecerem em meio de cultura adicionado de citocinina. Portanto, pode-se concluir que o efeito da auxina não pôde ser modificado pela citocinina presente no meio de cultura.

Já no segmento nodal a dominância apical foi eliminada com a excisão do ápice caulinar e a presença de citocinina no meio de cultura pode ter promovido o crescimento das gemas axilares laterais e a multiplicação destas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em trabalho com *Dieffenbachia exotica*, a dominância apical apresentou, também, um efeito negativo na produção de novos brotos, pois quando foram utilizados como explantes brotos apicais, esses não foram eficientes para a produção de brotos, pois o desenvolvimento de gemas axilares foi quase totalmente inibido (VOYIATZI; VOYIOATZIS, 1989). Também, em *Cedrela fissilis*, a multiplicação de brotos só ocorreu devido à liberação das gemas axilares da dominância apical com a presença de BAP no meio de cultura (NUNES et al., 2002). Resultados similares foram obtidos em nosso trabalho; entretanto, a citocinina presente no meio de cultura não foi suficiente para superar o efeito da dominância apical induzido pela auxina presente nas gemas apicais.

O balanço interno entre a citocinina e a auxina tem um papel fundamental na indução do início de diferenciação celular, sendo a citocinina um dos requisitos básicos para a proliferação celular em tecidos que contêm ou são adicionados de um nível suficiente de auxina. Existem evidências de que ambos hormônios participem da regulação do ciclo celular, mas que as auxinas podem regular eventos para induzir a replicação do DNA, embora as citocininas regulem eventos para induzir a mitose (FOSKET, 1994).

Variações nas proporções de auxinas e citocininas colocadas em uma cultura de tecidos podem influenciar fortemente o tipo de diferenciação celular, como foi demonstrado no experimento clássico de SKOOG e MILLER em 1957. Nesse experimento, quando a proporção

de cinetina era superior à de AIA, foi observada a formação de gemas a partir de calos, já em concentrações de AIA maiores às de cinetina, a resposta obtida foi a diferenciação de raízes a partir de calos (BIASI, 2002). Portanto, a diferenciação e a divisão celular são influenciadas pela ação das auxinas e das citocininas. Sendo assim, a obtenção de maiores taxas de multiplicação de gemas axilares em segmentos nodais, possivelmente se deve a um balanço adequado para produção de partes aéreas, enquanto que nos segmentos apicais o balanço foi inadequado quando comparado ao segmento nodal.

4.4.1.1.6 Resumo dos resultados obtidos nas culturas de segmentos nodais em MS adicionado de BAP e 2-iP

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que no geral os melhores resultados para as variáveis analisadas foram obtidos no 1º subcultivo nas concentrações de 2,5 e 5,0 µM de BAP. Já no 3º e 4º subcultivos, a taxa de multiplicação decresceu, o número médio de brotos e o comprimento médio se mantiveram constantes. A percentagem de explantes mortos foi reduzida no tratamento com 2,5 µM de BAP e aumentou no tratamento com 5,0 µM de BAP.

TABELA 15 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA O SEGMENTO NODAL EM TODOS OS CULTIVOS NA PRESENÇA DE BAP

Cultivo Inicial					
BAP(μM)	0	2,5	5	10	20
Variáveis					
Taxa de multiplicação	1,00	1,57	1,46	1,20	1,00
Explantos formando brotos (%)	0,00	33,33	16,66	0,60	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,37	0,23	0,02	0,00
Nº médio de brotos em explantes c/brotos	0,00	1,19	0,48	0,13	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,53	0,55	0,50	0,00
Necrose (%)	2,10	0,00	0,00	0,0	16,75
1º subcultivo					
Taxa de multiplicação	1,00	1,72	1,31	1,02	1,00
Explantos formando brotos (%)	2,10	26,70	20,04	11,50	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,02	0,25	0,20	0,12	0,00
Nº médio de brotos em explantes c/brotos	0,13	1,32	0,67	0,38	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,50	0,73	0,53	0,52	0,00
Necrose (%)	0,00	6,37	18,87	33,25	29,13
2º subcultivo					
Taxa de multiplicação	1,00	1,41	1,77	1,10	1,00
Explantos formando brotos (%)	2,10	36,66	22,50	20,80	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,02	0,56	0,42	0,24	0,00
Nº médio de brotos em explantes c/brotos	0,13	1,59	0,94	0,87	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,50	0,70	0,57	0,52	0,00
Necrose (%)	0,00	6,30	2,12	14,62	4,12
3º subcultivo					
Taxa de multiplicação	1,00	1,24	1,05	1,03	1,00
Explantos formando brotos (%)	0,00	49,50	26,66	20,40	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,71	0,31	0,32	0,00
Nº médio de brotos em explantes c/brotos	0,00	1,46	0,75	0,75	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,60	0,51	0,55	0,00
Necrose (%)	0,00	6,37	10,63	6,37	0,00
4º subcultivo					
Taxa de multiplicação	1,00	1,14	1,08	1,09	1,00
Explantos formando brotos (%)	0,00	21,70	21,11	9,51	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,40	0,30	0,25	0,00
Nº médio de brotos em explantes c/brotos	0,00	1,56	0,88	0,63	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,61	0,58	0,53	0,50
Necrose (%)	0,00	2,12	16,75	12,50	0,00

Os resultados obtidos no experimento com 2-iP foram geralmente piores quando comparados aos obtidos com BAP, sendo observados nos 1º e 2º subcultivos os melhores

resultados para as variáveis analisadas (Tabela 16).

TABELA 16 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA SEGMENTOS NODAIS DE CANJARANA PARA OS CULTIVOS REALIZADOS NA PRESENÇA DE 2-iP

Cultivo Inicial					
2-iP (μ M)	0	2,5	5	10	20
Variáveis					
Taxa de multiplicação	1,00	1,19	1,28	1,20	1,00
Explantos formando brotos (%)	2,00	27,00	2,00	0,00	4,00
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,30	0,08	0,00	0,04
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,00	1,38	0,25	0,00	0,25
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,50	0,50	0,00	0,50
Necrose (%)	0,00	8,37	6,25	12,45	2,12
1º Subcultivo					
Taxa de multiplicação	1,00	1,16	1,18	1,10	1,00
Explantos formando brotos (%)	2,00	21,00	17,33	8,90	23,84
Nº médio de brotos/explante	0,02	0,32	0,57	0,12	0,08
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,13	1,13	1,37	1,00	0,75
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,55	0,54	0,50	0,62
Necrose (%)	0,00	23,06	10,13	22,70	45,76
2º Subcultivo					
Taxa de multiplicação	1,00	1,22	1,41	1,00	1,00
Explantos formando brotos (%)	2,10	40,50	10,61	12,53	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,02	0,54	0,30	0,54	0,00
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,13	1,50	0,81	0,63	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,52	0,55	0,55	0,00
Necrose (%)	0,00	14,63	35,38	29,13	22,88
3º Subcultivo					
Taxa de multiplicação	1,02	1,02	1,00	1,00	1,00
Explantos formando brotos (%)	0,00	49,50	26,66	20,40	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,12	0,08	0,00	0,00
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,00	0,13	0,13	0,13	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,60	0,60	0,00	0,00
Necrose (%)	0,00	16,80	24,50	4,30	0,00
4º Subcultivo*					
Taxa de multiplicação	1,03	1,00	1,00	1,00	1,00
Necrose (%)	0,00	37,39	10,50	0,00	0,00

* Não foi observada a presença de brotos

Em ambos os experimentos citados os melhores resultados, levando em consideração todas as variáveis analisadas, foram observados no tratamento com 2,5 μ M das respectivas citocininas (Tabelas 15 e 16).

Analisando todos os resultados obtidos para as variáveis estudadas, observamos que o

melhor tipo de explante para a multiplicação de gemas axilares foi o segmento nodal na presença da citocinina BAP, pois proporcionou as maiores taxas de multiplicação, o maior número médio de brotos desenvolvidos (Tabela 15), embora de forma geral foram observadas maiores porcentagens de explantes mortos para o experimento com BAP, em comparação com os maiores valores obtidos no experimento com 2-iP (Tabela 16).

4.4.1.2 Culturas em Meio de Cultura MS adicionado de benzilaminopurina e 2-isopenteniladenina

4.4.1.2.1 Efeito na multiplicação de gemas axilares em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas

O presente experimento foi realizado para observar a influência das duas citocininas em conjunto na multiplicação da *Cabralea canjerana*, uma vez que os resultados obtidos com cada citocinina aplicada separadamente não foram satisfatórios.

A tabela 17 apresenta as médias dos tratamentos com 2-iP, BAP e BAP+2-iP obtidas em segmentos nodais retirados de rebrotas (Figura 3-F), em meio de cultura MS, no cultivo inicial e em quatro subcultivos. Podemos observar que, nos dois últimos subcultivos, as taxas de multiplicação diminuiram na presença de BAP e BAP+2-iP.

TABELA 17 - TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO EM EXPLANTES DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E EM 4 SUBCULTIVOS (ORIGEM: SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS)

Tratamentos	cultivo inicial	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo	4º subcultivo
2-iP(2,5 µM)	1,00 b	1,00 b	1,05 c	1,05	1,00
BAP (2,5 µM)	1,12 b	1,35 a	1,42 b	1,25	1,05
BAP+ 2-iP (2,5 µM+2,5 µM)	1,28 a	1,23 a	1,66 a	1,19	1,08

Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de variância (Anexo 11) indicaram que houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com BAP, no cultivo inicial e nos dois primeiros subcultivos.

Para o cultivo inicial e o 2º subcultivo (Tabela 17), a taxa de multiplicação obtida na presença de BAP combinado com 2-iP diferiu estatisticamente e foi superior às demais. No 1º subcultivo (Figura 4-letra A, B e D), os tratamentos com BAP somente ou combinado a 2-iP

diferiram estatisticamente e foram superiores ao tratamento com 2-iP, mas não diferiram entre eles.

Os resultados obtidos nos experimentos anteriores com BAP e com 2-iP, testados isoladamente, mostraram que os melhores resultados para a variável taxa de multiplicação foram obtidos na presença de 2,5 e 5,0 μM de BAP em segmentos nodais. Resultado semelhante foi observado quando comparadas as taxas de multiplicação obtidas na presença de BAP e da combinação de BAP e 2-iP, pois as maiores taxas, também, foram obtidas na presença de BAP sozinho ou em combinação com 2-iP. Logo, para a variável em questão, a citocinina BAP sozinho ou em conjunto seria a mais indicada. No entanto, como a taxa de multiplicação foi baixa, acreditamos que o uso de outra citocinina, assim como combinações de BAP e 2-iP não testadas nesse trabalho, podem melhorar a taxa de multiplicação da canjarana. Já, em segmentos nodais de mogno, SCHOTTZ (2003) obteve alta taxa de multiplicação (7,22 brotos por segmento em 10 μM BAP combinado a 2,2 μM de 2-iP, em meio de cultura MS) esse resultado apesar de diferir do presente trabalho pela baixa taxa obtida, apresentou resultados similares, pois no meio adicionado de 2-iP (2,2 μM) e desprovido de BAP a taxa de multiplicação também foi baixa (2,04).

4.4.1.2.2 Efeito de BAP e 2-iP na percentagem de explantes com brotos em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas

Os resultados da análise de variância (Anexo 12) indicaram que houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, no cultivo inicial, no 1º e 4º subcultivo.

O teste de Tukey para comparação de médias (Tabela 18) revelou que para o cultivo inicial, as percentagens de explantes com brotos na presença de BAP e BAP+2iP diferiram estatisticamente e foram superiores às obtidas com 2-iP. Para o 1º, 2º e 3º subcultivos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. No 4º subcultivo foi observada uma percentagem superior na presença de BAP+2-iP e essa diferiu estatisticamente das demais.

TABELA 18 - PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA COM BROTOS EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS (SEGMENTOS DE REBROTAS)

Tratamentos	Cultivo inicial	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo	4º subcultivo
2-iP(2,5 μM)	2,10 b	3,61 a	7,00	16,00	8,30 b
BAP (2,5 μM)	22,90 ab	41,92 a	27,00	25,00	8,40 b
BAP+ 2-iP (2,5 μM +2,5 μM)	41,61 a	19,80 a	25,01	37,00	37,40 a

Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4.1.2.3 Efeito de BAP e 2-iP no número de brotos por explante em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas

Os resultados da análise de variância (Anexo 13) indicaram que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, no cultivo inicial e nos subcultivos. No cultivo inicial e 3º subcultivo o número médio de brotos formados na presença de BAP e 2iP diferiu estatisticamente e foi superior apenas do tratamento somente com 2-iP (Tabela 19),. Para o 2º subcultivo, os números obtidos na presença de BAP e 2-iP diferiram estatisticamente e foram superiores aos obtidos com os outros tratamentos. Esse resultado é semelhante aos encontrados por KATAOKA e INOUE (1992) em explantes de mamão, onde o número médio de brotos formados em BAP e 2-iP também foi superior ao alcançado quando foi utilizado BAP sozinho.

No geral, para essa variável verificou-se que o maior número médio de brotos foi obtido quando as duas citocininas estavam presentes (Tabela 19).

Quando comparados os resultados obtidos para a variável número médio de brotos em explantes com brotos e para a taxa de multiplicação, verificamos que os melhores resultados em ambas as variáveis foram observados nos tratamentos com BAP+2-iP e com BAP sozinho.

TABELA 19 – NÚMERO MÉDIO DE BROTOS EM EXPLANTES COM BROTOS DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS (SEGMENTOS DE REBROTAS)

Tratamentos	Cultivo inicial	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo	4º subcultivo
2-iP(2,5 µM)	0,13	0,25	0,25	0,50	0,13
BAP (2,5 µM)	0,94	0,63	0,81	1,00	0,75
BAP+ 2-iP (2,5 µM+2,5 µM)	1,02	0,50	1,04	1,08	1,63

4.4.1.2.4 Efeito de BAP e 2-iP no comprimento médio dos brotos em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas

As médias dos comprimentos dos brotos para os segmentos nodais são apresentadas na Tabela 20.

Os resultados mostraram que houve poucas diferenças entre os tratamentos e que, neste caso também, o tamanho dos brotos sempre foi inferior a 1 cm.

TABELA 20 - MÉDIAS DOS COMPRIMENTOS DOS BROTOS (cm) FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE BAP E/OU 2-iP, NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS (ORIGEM: SEGMENTOS NODAIS OBTIDOS A PARTIR DE REBROTAS)

Tratamentos (em μM)	Cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
2-iP (2,5)	0,60	0,60	0,55	0,58	0,61
BAP (2,5)	0,63	0,52	0,64	0,65	0,54
BAP(2,5)+2-Ip(2,5)	0,52	0,53	0,76	0,69	0,56

4.4.1.2.5 Efeito de BAP e 2-iP na percentagem de explantes mortos em segmentos nodais obtidos a partir de rebrotas

Os resultados da análise de variância (Anexo 14) indicaram que houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, para os 1°, 2° e 3° subcultivos. Para o 4° subcultivo não houve diferenças estatisticamente significativas.

O teste de Tukey para comparação de médias (Tabela 21) revelou para os três subcultivos analisados, que o tratamento com o 2-iP provocou a maior percentagem de explantes mortos e diferiu estatisticamente dos demais. As menores percentagens de explantes mortos foram observadas nos tratamentos com BAP sozinho ou combinado com 2-iP.

TABELA 21 - NECROSE EM EXPLANTES DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP E BAP+ 2-iP), EM TRÊS SUBCULTIVOS (ORIGEM: SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS)

Tratamentos	Cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
2-iP(2,5 μM)	0,00	52,00 b	32,60 b	37,50 b	13,21
BAP (2,5 μM)	0,00	3,10 a	12,30 a	3,61 a	13,00
BAP+ 2-iP (2,5 μM +2,5 μM)	0,00	7,20 a	6,50 a	8,81 a	7,00

Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4.1.2.6 Resumo dos resultados obtidos em MS adicionado de BAP e 2-iP em segmentos nodais originados de rebrotas

Os melhores resultados para as variáveis analisadas obtidos nesse experimento foram observados nos tratamentos com BAP isolado ou em conjunto com 2-iP, nos 1° e 2° subcultivos (Tabela 22).

TABELA 22 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA SEGMENTOS NODAIS DE CANJARANA NOS CULTIVOS REALIZADOS NO EXPERIMENTO COM BAP E 2-iP COMBINADOS

Cultivo Inicial			
Citocininas (μM)	2-iP 2,5	BAP 2,5	BAP+2-iP (2,5+2,5)
Variáveis			
Taxa de multiplicação	1,00	1,12	1,28
Explantes formando brotos (%)	2,10	22,90	41,61
Nº médio de brotos/explante	0,02	0,25	0,52
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,13	0,94	1,02
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,60	0,63	0,52
Necrose (%)	0,00	0,00	0,00
1º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,00	1,35	1,23
Explantes formando brotos (%)	3,61	41,92	19,80
Nº médio de brotos/explante	0,04	0,25	0,29
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,25	0,63	0,50
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,60	0,52	0,53
Necrose (%)	52,00	3,10	7,20
2º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,05	1,42	1,66
Explantes formando brotos (%)	16,00	25,00	37,00
Nº médio de brotos/explante	0,07	0,52	0,56
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,25	0,81	1,04
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,55	0,64	0,76
Necrose (%)	32,60	12,30	6,50
3º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,05	1,25	1,19
Explantes formando brotos (%)	16,00	25,00	37,00
Nº médio de brotos/explante	0,37	0,43	0,55
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,50	1,00	1,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,58	0,65	0,69
Necrose (%)	37,50	3,61	8,81
4º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,00	1,05	1,08
Explantes formando brotos (%)	8,30	8,40	37,40
Nº médio de brotos/explante	0,13	0,21	0,36
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,13	0,75	1,63
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,61	0,54	0,56
Necrose (%)	13,21	13,00	7,00

Os resultados obtidos com as quatro variáveis analisadas demonstram que o tratamento com 2-iP sozinho não foi eficiente para a multiplicação de gemas axilares, produção de brotos, indução do crescimento das gemas e ainda provocou uma grande mortalidade nos explantes, quando comparado aos outros tratamentos. Ao relacionar os resultados obtidos ao do experimento com BAP, observa-se que os números de brotos foram semelhantes nos dois experimentos, porém as maiores taxas de multiplicação e as menores percentagens de explantes mortos foram encontradas no experimento com BAP somente. Isso indica que, analisando todas as variáveis aqui descritas, BAP adicionado sozinho no meio de cultura para segmento nodal proporcionou os maiores valores em comparação com 2-iP e BAP combinado com 2-iP (Tabelas 7, 16 e 22). Entretanto, as taxas de multiplicação ainda não são satisfatórias para uma eficiente multiplicação e por essa razão recomenda-se a realização de outros experimentos com outras combinações de BAP e com outras citocininas, como, por exemplo, o tidiazuron, a zeatina e a cinetina.

A citocinina BAP (2,5 e 5,0 μM), em meio de cultura MS, proporcionou valores de taxa de multiplicação superiores aos obtidos com 2-iP e também alguns dos maiores números de brotos, apesar das taxas de multiplicação e do número de brotos ainda não serem satisfatórios. No caso de *Anacardium occidentale* também, a melhor proliferação de brotos axilares foi obtida com BAP (com aproximadamente 70 % de brotos multiplicando) em comparação ao 2-iP e a outras citocininas como KIN e ZEA (MNENEY; MANTELL, 2002).

4.4.2 Culturas em Meio de Cultura WPM Adicionado de Benzilaminopurina

Como as taxas de multiplicação observadas nos experimentos com MS não foram satisfatórias, o presente experimento foi realizado com o intuito de verificar se a composição do meio de cultura WPM seria mais eficaz na indução da multiplicação da canjarana. Conjuntamente foram utilizadas as concentrações de BAP para as quais foram verificados os melhores resultados nos experimentos anteriores.

4.4.2.1 Efeito da BAP na multiplicação de gemas axilares de segmentos nodais e apicais

A Tabela 23 apresenta as médias das taxas de multiplicação obtidas nos tratamentos com BAP em segmentos nodais e apicais e em meio de cultura WPM, no cultivo inicial e em quatro subcultivos.

TABELA 23 - TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM EXPLANTES DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA WPM, COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO

BAP (μM)	Cultivo inicial	1 ^o subcultivo		2 ^o subcultivo		3 ^o subcultivo	4 ^o subcultivo	
	SN e SA	SN	SA	SN	SA	SN e SA	SN	SA
0	1,00 b	1,00	1,00	1,00 b A	1,00 a A	1,00 b	1,00	1,00
2,5	1,00 b	1,12	1,02	1,08 b A	1,00 a B	1,01 ab	1,04	1,00
5,0	1,21 a	1,10	1,10	1,18 a A	1,02 a B	1,07 a	1,08	1,00

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

* SN: segmento nodal, SA: segmento apical

Os resultados da análise de variância (Anexo 15) indicaram que a interação entre os fatores foi significativa apenas no 2^o subcultivo, revelando que os fatores “tipo de segmento” e “concentrações de BAP” não são independentes nesse subcultivo. Entretanto, para o cultivo inicial e 3^o subcultivo os fatores são independentes e nesses houve diferenças estatisticamente significativas apenas entre as concentrações. No 1^o e 4^o subcultivo não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas. No 2^o subcultivo, o teste de Tukey (Tabela 23) mostrou que, para o segmento nodal, a taxa de multiplicação média (1,18) obtida na presença de 5,0 μM de BAP foi superior e diferiu estatisticamente das outras taxas. Porém, para o segmento apical, as médias de taxa de multiplicação não diferiram estatisticamente entre si. A taxa mais elevada (1,28) foi obtida no cultivo inicial a partir dos segmentos nodais. No 2^o subcultivo (Figura 4-C), este tipo de segmento apresentou os melhores resultados que diferiram estatisticamente dos resultados obtidos com os apicais, com exceção do controle (Tabela 23).

No cultivo inicial, o teste de Tukey para comparação de médias revelou que a média de taxa de multiplicação na concentração de 5,0 μM de BAP diferiu estatisticamente e foi superior às demais. No 3^o subcultivo e para esta mesma concentração, a taxa diferiu estatisticamente e foi superior apenas ao controle.

No geral, as maiores taxas de multiplicação foram observadas na concentração de 5,0 μM de BAP, sendo que as taxas tenderam a diminuir com os subcultivos.

4.4.2.2 Efeito da BAP na percentagem de explantes com brotos

Os resultados da análise de variância (Anexo 16) indicaram que a interação entre os fatores foi significativa apenas no cultivo inicial e para o 2^o subcultivo, revelando que os fatores

tipo de segmento e concentrações de BAP não são independentes. Já para 1º subcultivo houve diferenças estatisticamente significativas apenas entre as concentrações de BAP e, para o 3º subcultivo, não houve diferenças estatisticamente significativas.

No cultivo inicial e no 2º subcultivo, não houve diferença estatística entre as concentrações testadas (Tabela 24); porém, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os segmentos, sendo o segmento nodal superior ao apical. Já, para o 1º subcultivo, os resultados obtidos com as concentrações de 2,5 e 5,0 μM de BAP diferiram do controle e foram superiores; independentemente do tipo de segmento (Tabela 24). No 3º subcultivo, o melhor resultado foi observado na concentração de 2,5 μM para ambos os tipos de segmentos. O valor mais elevado foi obtido no 1º subcultivo na presença de 5 μM de BAP com 26% dos segmentos formando brotos.

TABELA 24 - PERCENTAGEM DE EXPLANTES DE CANJARANA FORMANDO BROTOS EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS TRÊS SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

BAP (μM)	cultivo inicial		1º subcultivo	2º subcultivo		3º subcultivo	
	SN	SA	SA e SN	SN	SA	SN	SA
0	0,00 a A	0,00 a A	2,10 b	2,10 a A	0,00 a A	2,10	2,11
2,5	20,81 a A	0,00 a B	16,30 a	7,20 a A	0,00 a A	4,90	8,40
5,0	18,70 a A	0,00 a B	22,50 a	16,50 a A	0,00 a B	4,20	0,00

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4.2.3 Efeito da BAP no número de brotos por explante

Nos segmentos apicais no cultivo inicial não houve a formação de brotos e mesmo nos segmentos nodais o número de brotos obtidos nesse cultivo e nos subcultivos foi menor que 1,09. Foi observado que os valores dessa variável foram geralmente menores que 1,00, indicando que o número de brotos foi menor no experimento em meio WPM quando comparado ao experimento com o meio de cultura MS, nas mesmas concentrações de BAP (Tabela 25).

Na micropropagação de *Swartzia madagascariensis* (Fabaceae) foi comparado o número de brotos por explante obtidos em diferentes meios de culturas como o MS e o WPM, adicionados de BAP. O melhor resultado para o número de brotos foi obtido no meio MS adicionado de 2,2 μM de BAP (37 brotos/explante). Esse resultado diferiu do observado para outras espécies lenhosas, já que a baixa concentração iônica do WPM não causou efeitos

benéficos na indução de brotos (BERGER; SCHAFFNER, 1995). Com relação à multiplicação da canjarana, também observamos que, em comparação ao WPM, o meio de cultura MS proporcionou os melhores resultados para as variáveis testadas. Esse meio de cultura adicionado de BAP induziu também uma multiplicação de gemas melhor em comparação ao 2-*iP* (comparar as Tabelas 5 e 6). No trabalho de SAADAT e HENNERTY (2002) resultado similar, com maiores valores obtidos em meio de cultura MS, foi observado para a noqueira (*Juglans regia*).

TABELA 25 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS EM EXPLANTES COM BROTOS DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E NO 1º, 2º E 3º SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP (MÉDIA DE DOIS TIPOS DE SEGMENTOS)

NÚMERO MÉDIO DE BROTOS EM EXPLANTE COM BROTOS								
Concentrações de BAP (μM)	Cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo	
	SN*	SA*	SN	SA	SN	SA	SN	SA
0	0,00	0,00	0,13	0,13	0,13	0,00	0,25	0,25
2,5	1,13	0,00	0,63	0,50	0,63	0,00	0,25	0,25
5,0	0,99	0,00	0,83	0,88	1,08	0,00	0,17	0,00

SN* - Segmento Nodal; SA* - Segmento Apical

4.4.2.4 Efeito de BAP no comprimento médio dos brotos

As médias dos comprimentos dos brotos para ambos os tipos de segmentos são apresentadas na Tabela 26.

TABELA 26 - MÉDIAS DOS COMPRIMENTOS DOS BROTOS (cm) FORMADOS EM EXPLANTES DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM ADICIONADO DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS TRÊS PRIMEIROS SUBCULTIVOS, EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

Concentrações de BAP (μM)	cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo	
	SN*	SA*	SN	SA	SN	SA	SN	SA
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	0,52	0,00	0,50	0,50	0,50	0,00	0,55	0,50
5,0	0,54	0,00	0,62	0,53	0,52	0,50	0,50	0,00

SN* - Segmento Nodal; SA* - Segmento Apical

Os maiores comprimentos dos brotos foram observados nos segmentos nodais e geralmente na concentração de 5,0 μM de BAP. Houve poucas diferenças entre os tratamentos em todos os subcultivos. Os valores foram baixos e variaram de 0,5 a 0,62 cm.

MERETI et al. (2002) observaram, em *Arbutus unedo* (Ericaceae), comprimentos de brotos similares entre os tratamentos (0; 5,5; 11,1 e 22,2 μM de BAP), exceto para concentração de 5,5 μM de BAP, que proporcionou o maior comprimento dos brotos (1,06 cm). No presente trabalho também foram obtidos os maiores comprimentos em concentração similar.

4.4.2.5 Efeito de BAP na percentagem explantes mortos

A Tabela 27 apresenta as percentagens médias de explantes mortos obtidas nos tratamentos com BAP, em segmentos nodais e apicais e em meio de cultura WPM.

TABELA 27 - NECROSE EM EXPLANTES DE CANJARANA NO CULTIVO INICIAL E EM QUATRO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP EM FUNÇÃO DO TIPO DE SEGMENTO DE ORIGEM

Concentrações de BAP (μM)	EXPLANTES MORTOS (%)									
	Cultivo inicial		1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo	4º subcultivo		
	SN*	SA*	SN	SA	SN	SA	SN e SA	SN	SA	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	2,12	2,12	2,10 a	0,00	0,00	
2,5	0,00	0,00	0,00	4,20	2,12	2,12	8,81 a	12,50	2,50	
5,0	0,00	0,00	6,30	0,00	4,60	2,12	13,60 a	11,10	0,00	

SN* - Segmento Nodal; SA* - Segmento Apical

Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de variância (Anexo 17) indicaram que não existiu interação entre os fatores tipos de segmento e concentrações de BAP, em nenhum dos subcultivos analisados. A análise revelou ainda, que não houve diferenças estatisticamente significativas para o 1º e 2º subcultivos e, para o 3º subcultivo só houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações. Para o último subcultivo a diferença foi estatisticamente significativa apenas para o tipo de segmento.

O teste de Tukey para comparação de médias foi realizado para o 3º subcultivo (Tabela 27) mostrando que o controle induziu a menor percentagem de explantes mortos e diferiu estatisticamente somente do tratamento com 5,0 μM de BAP. Para o 4º subcultivo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das percentagens de explantes mortos obtidos para os dois tipos de segmentos. Observando todos os cultivos, os resultados mostram que houve menor percentagem de explantes mortos nos meios sem BAP ou contendo 2,5 μM de BAP, em ambos os tipos de segmentos. No geral as percentagens obtidas foram baixas com

no máximo 21,00 de explantes mortos, sendo que o comportamento geralmente observado foi o aumento nos valores das percentagens no decorrer dos subcultivos.

4.4.2.6 Resumo dos resultados do experimento em meio de cultura WPM adicionado de BAP

Os resultados obtidos no presente experimento demonstraram que em meio WPM a citocinina BAP induziu resultados ainda menos satisfatórios que os observados nas mesmas concentrações desta citocinina em meio de cultura MS (Tabelas 5 e 23).

Comparando os resultados com BAP nas mesmas concentrações e em meios de culturas diferentes, podemos concluir que, para a variável percentagem de explantes mortos, o melhor meio de cultura seria o WPM, pois esse apresentou os menores valores para a variável em questão. Entretanto, nesse meio de cultura foi observada a clorose em algumas das folhas dos brotos a partir do 3º subcultivo e menores taxas de multiplicação do que no meio de cultura MS (comparar a Tabela 5 com a Tabela 23), assim como menores comprimentos de brotos e um menor número de brotos.

TABELA 28 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA SEGMENTOS NODAIS DE CANJARANA, NOS CULTIVOS REALIZADOS NO EXPERIMENTO EM WPM ADICIONADO DE BAP

Cultivo Inicial			
BAP(μ M)	0	2,5	5
Variáveis			
Taxa de multiplicação	1,00	1,00	1,28
Explantes formando brotos (%)	0,00	20,81	18,70
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,30	0,33
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,00	1,13	0,99
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,52	0,54
Necrose (%)	0,00	0,00	0,00
1º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,00	1,12	1,10
Explantes formando brotos (%)	2,10	16,60	26,00
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,11	0,25
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,13	0,63	0,83
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,50	0,62
Necrose (%)	0,00	0,00	6,30
2º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,00	1,08	1,18
Explantes formando brotos (%)	2,10	7,20	16,50
Nº médio de brotos/explante	0,02	0,05	0,09
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,13	0,63	1,08
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,50	0,52
Necrose (%)	2,12	2,12	4,60
3º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,00	1,02	1,09
Explantes formando brotos (%)	2,10	4,90	4,20
Nº médio de brotos/explante	0,02	0,05	0,01
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,25	0,25	0,17
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,55	0,50
Necrose (%)	2,12	10,50	21,00
4º Subcultivo			
Taxa de multiplicação	1,00	1,04	1,08
Explantes formando brotos (%)	0,00	0,00	0,00
Nº médio de brotos/explante	0,00	0,00	0,00
Nº médio de brotos em explantes com brotos	0,00	0,00	0,00
Tamanho médio dos brotos (cm)	0,00	0,00	0,00
Necrose (%)	0,00	12,50	11,10

No processo de micropropagação podem ser utilizados vários meios de cultura, entretanto, o meio de cultura WPM é o mais comum para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas (VENGADESAN et al., 2002). A utilização desse meio de cultura em segmentos apicais proporcionou bons resultados de multiplicação para o mogno, *Swietenia macrophylla*, e

para o cedro, *Cedrela odorata*, na concentração de 0,88 μM de BAP (MARUYAMA et al., 1989a). No caso do cedro os autores citam a produção de 3,5 brotos por explante (MARUYAMA et al., 1989b).

No presente trabalho bem como nos trabalhos utilizando espécies de *Acacia* (VENGADESAN et al., 2002) e *Anacardium occidentale* (MNENEY; MANTELL, 2002), o meio de cultura MS apresentou melhores resultados que o WPM para indução de brotos. Portanto, para *Cabralea canjerana* de acordo com os resultados obtidos utilizando os dois meios citados e a citocinina BAP, o meio de cultura MS foi o mais indicado para a multiplicação de gemas axilares. Isso pode estar relacionado com o fato do meio WPM possuir apenas 45% da força iônica total do MS (NUNES et al., 2002) e concentrações menores de nitrato (MS 40 μM ; WPM 9,7 μM) e amônio (MS 20 μM ; WPM 4,9 μM). Em consequência, o meio WPM possui uma baixa quantidade de nitrogênio total (14,69 μM) comparado ao MS (60,00 μM) (GEORGE, 1996) e esse fato pode influenciar na clorose foliar (SCHOTTZ, 2003), sendo que esse sintoma foi observado nos explantes de canjarana cultivados em meio de cultura WPM, já em meio de cultura MS os explantes não apresentaram clorose foliar em nenhum dos subcultivos avaliados. A importância da transferência dos explantes, depois de 3 semanas, para meio de cultura fresco, foi destacada como essencial para prevenir a desfoliação, a perda de vigor da cultura e para sustentar o crescimento dos brotos (SHEKHAWAT et al., 1997). Quando o meio de cultura WPM é utilizado, a duração de cada subcultura deve ser menor, ou ainda esse meio de cultura pode não ser adequado para *Cabralea canjerana*.

Mesmo sendo observados os melhores resultados em meio de cultura MS a obtenção de brotações múltiplas foi baixa, porém eram brotações que apresentavam um aspecto normal, com coloração verde e folhas compostas com folíolos sem anormalidades. Por essa razão sugerem-se novos testes com outras citocininas (como o TDZ) ou essas em combinações com outros fitorreguladores (como o ANA).

Apesar das taxas de multiplicação obtidas serem baixas, alguns segmentos retirados de determinadas plântulas demonstraram uma grande capacidade de multiplicação, produzindo mais que o dobro do número de gemas axilares iniciais entre dois subcultivos. Essa variação na resposta à citocinina pode ser explicada pelo fato das sementes terem sido originadas de polinização aberta e, portanto, provavelmente com grande variabilidade genética.

4.5 ENRAIZAMENTO DE BRODOS OBTIDOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO

O meio WPM foi utilizado no experimento de enraizamento devido ao resultado de enraizamento observado no experimento de multiplicação neste meio de cultura. Nesse experimento, os explantes obtidos de segmentos apicais na ausência de BAP apresentaram, aos 30 dias de cultivo, 12,5% de enraizamento (Figura 5-A) e 1,5% nos de segmentos nodais. Aos 45 dias de cultivo, a percentagem de explantes enraizados para os segmentos apicais continuou a mesma, porém para os segmentos nodais aumentou para 2,43%.

Os resultados apresentados na Tabela 29 indicaram que as percentagens de enraizamento variaram entre 18 e 20% nos meios de cultura WPM adicionado de 2,5 e 5,0 μM de AIB (Figura 5-C), mostrando que a percentagem de enraizamento foi baixa se comparada a percentagens de outras espécies e ao experimento de multiplicação, no qual foi obtida a percentagem de 15% de enraizamento para os dois tipos de segmentos, sem a presença de auxinas exógenas. Esse resultado pode ser devido à influência do BAP utilizado na fase de multiplicação, já que BAP pode ter estimulado a produção de citocininas endógenas (VANKOVA et al., 1991) e isso, por sua vez, pode inibir a iniciação da raiz (BOLLMARK et al., 1988) e também o alongamento (TAIZ; ZEIGER, 2004). Sendo assim, um aspecto importante no enraizamento *in vitro* é a composição dos meios de multiplicação, já que o contato prolongado dos explantes com altas concentrações da citocinina BAP na fase de multiplicação pode ser prejudicial ao enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Uma relação elevada entre as citocininas e as auxinas geralmente promove a formação de brotos e a redução do enraizamento em estacas caulinares, assim como a taxa de crescimento da raiz é reduzida (TAIZ; ZEIGER, 2004). O efeito residual das citocininas pode ser observado quando pré-tratamentos com as mesmas são utilizados (GEORGE, 1993). Por tanto, a ação da citocinina adicionada na fase de multiplicação pode ter influenciado negativamente o enraizamento da canjarana. GRATTAPAGLIA et al. (1987) constataram o efeito residual de BAP inibindo o enraizamento em *Eucalyptus urophylla*, *E. cloeziana*, *E. citriodora* em explantes provenientes de um teste fatorial combinando BAP e ANA.

TABELA 29 - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE CANJARANA ORIGINADAS DE BROTO OBTIDOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO, EM MEIO DE CULTURA WPM ADICIONADO DE AIB (0; 2,5 E 5,0 μM)

Concentrações de AIB (μM)	Microestacas enraizadas (%)		Número médio de raízes por microestaca		Comprimento médio das raízes (cm)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
0	2,27	2,27	1,12	1,00	0,30	0,70
2,5	18,18	18,18	1,25	1,75	0,28	0,73
5,0	18,18	20,45	1,00	1,33	0,30	0,42

Em outra Meliaceae, *Cedrella fissilis*, as percentagens de enraizamento na presença de AIB foram maiores do que as encontradas nos experimentos realizados no presente trabalho. Os autores obtiveram de 87 a 100% de enraizamento em meio de cultura MS, completo ou com a concentração de sais pela metade, adicionado de 2,5 μM de AIB, utilizando brotos obtidos na fase de multiplicação, procedentes de segmentos nodais cotiledonares (NUNES et al., 2002).

As percentagens de enraizamento dos explantes (microestacas com 2-3 cm, oriundos da fase de multiplicação) da espécie lenhosa *Arbutus unedo* (Ericaceae) em meio de cultura contendo os sais do meio WPM e vitaminas do MS, foram de 92% na presença de 10 μM de AIB, de 75% em 5 μM e de 65% em 2,5 μM . Entretanto, o controle apresentou 45 % de enraizamento (MERETI et al., 2002). Esse resultado mostra que esta espécie não possui grandes dificuldades de enraizamento quando comparada à canjarana e também que o BAP utilizado na fase anterior provavelmente não interferiu expressivamente no enraizamento.

Em microestacas de *Cornus florida* (Cornaceae), oriundas de um meio de multiplicação contendo 4,4 μM de BAP, o máximo de enraizamento (83%) foi obtido em meio de cultura WPM com 4,4 μM de AIB (SHARMA et al., 2005). Já, a canjarana apresentou em concentração similar de AIB, apenas 20% de enraizamento, mostrando a necessidade de novos testes para aumentar essa percentagem.

O número médio de raízes e o comprimento dessas foram baixos; por essa razão recomenda-se a utilização de outras concentrações de AIB, ou ainda a utilização de explantes após um subcultivo em meio de cultura sem fitorreguladores ou contendo carvão ativo.

4.6 ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS OBTIDAS A PARTIR DE REBROTAS

Dois experimentos de enraizamento de microestacas de rebrotas foram realizados como alternativa para o enraizamento da espécie.

No segundo experimento altas percentagens de enraizamento (87,5% e 83,2%) foram obtidas com 5,0 e 10 μM de AIB aos 60 dias. Entretanto, quando comparados os dois experimentos os maiores valores foram obtidos na concentração de 10 μM de AIB para o primeiro experimento e de 5,0 μM de AIB no segundo experimento. O maior número médio de raízes por microestacas de 3,92 no meio contendo 10 μM de AIB foi observado no primeiro experimento (Tabela 30) (Anexos 18,19 e 20).

Os resultados indicam que a permanência de apenas 7 dias em meio de cultura adicionado de AIB foi mais favorável na indução de raízes que a permanência em meio adicionado de AIB por 60 dias, proporcionando as maiores percentagens de enraizamento; porém, o número médio de raízes por microestaca foi menor quando comparado à indução permanente realizada no experimento 1. Em ambos experimentos foram observadas altas percentagens de explantes com raízes no tratamento com 10 μM de AIB. Entretanto, LOPES et al. (2001) observaram a maior percentagem de enraizamento (40,0%) em microestacas de mogno (oriundas da fase de multiplicação em meio de cultura adicionado de BAP e ANA), em uma menor concentração de AIB (0,49 μM). A diferença no comportamento observado para as duas espécies mostra que, possivelmente os níveis endógenos de auxinas sejam diferentes, já que no mogno o AIB (4,89 e 14,67 μM) induziu uma menor percentagem de enraizamento (10%) e que na canjarana esta auxina induziu um melhor resultado em concentração intermediária.

O enraizamento de microestacas obtido nos dois últimos experimentos apresentou altas percentagens (Figura 5-B) quando comparado ao experimento com microestacas oriundas de brotos da fase de multiplicação. Esta diferença entre os resultados obtidos pode ser devida a vários fatores, como a diferença na origem dos explantes (brotos oriundos de meio de cultura WPM adicionado de citocinina e segmentos apicais de rebrotas obtidos em meio de cultura MS/2 sem fitorregulador), o tamanho dos explantes, o meio de cultura utilizado (WPM e MS/2) e a presença de um período de indução, no caso do experimento 2.

Apesar dos fatores citados, as microestacas obtidas a partir de brotos originados na fase de multiplicação, provavelmente poderiam apresentar uma maior porcentagem de enraizamento em meio de cultura MS/2 adicionado de 10 μM de AIB.

TABELA 30 - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE CANJARANA OBTIDAS A PARTIR DE REBROTAS, EM MEIO DE CULTURA MS/2 ADICIONADO DE AIB (0; 2,5, 5,0 E 10 μ M)

	AIB (μ M)	Microestacas enraizadas (%)		Número médio de raízes por microestaca		Comprimento médio das raízes (cm)	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Experimento 1*	0	40,0	42,5 c	1,06	1,06 d	0,67	1,03 a
	2,5	60,0	70,0 ab	2,02	2,19 c	0,41	0,48 b
	5,0	40,0	53,5 bc	2,63	3,10 b	0,28	0,32 b
	10	55,0	75,5 a	2,88	3,92 a	0,32	0,49 b
Experimento 2*	0	36,7	41,9 b	1,12	1,07 b	0,45	0,76 a
	2,5	70,0	80,0 a	1,80	2,09 a	0,51	0,76 a
	5,0	77,5	87,5 a	2,30	2,55 a	0,40	0,43 b
	10	76,9	83,2 a	2,39	2,57 a	0,38	0,46 b

Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Experimento 1*- as microestacas permaneceram por 60 dias em seus respectivos tratamentos em presença de AIB.

Experimento 2*- as microestacas permaneceram por 7 dias em seus respectivos tratamentos em presença de AIB e ausência de luz, após esse período foram transferidas para o meio MS/2 sem a adição de AIB e na presença de luz.

5 CONCLUSÕES

- A deiscência dos frutos da espécie *Cabralea canjerana* pode ser obtida com sucesso em laboratório deixando os frutos, ainda sem fissuras de deiscência, em sacos plásticos fechados, por período de 11 dias;
- A maior percentagem de germinação *in vitro* atingiu 90% das sementes germinadas após um período de 14 dias, após tratamento com hipoclorito de sódio (2,5% (v/v) do produto comercial por 30 minutos).
- A cultura dos explantes em meio MS adicionado de 2,5 μM de BAP permite uma multiplicação dos brotos com uma taxa que permanece inferior a 2 durante 4 subcultivos;
- As maiores taxas de multiplicação são obtidas a partir de segmentos nodais, assim como o maior número de brotos e os maiores comprimentos destes;
- O meio de cultura WPM, a partir do 3^o subcultivo, induz a clorose em algumas folhas dos brotos e não é adequado para a multiplicação das gemas;
- O meio de cultura WPM suplementado com 5,0 μM de AIB permite o enraizamento de 20% das microestacas obtidas a partir de brotos originados na fase de multiplicação, enquanto que o meio de cultura MS/2 adicionado de 5,0 μM de AIB permite o enraizamento de aproximadamente 87% das microestacas obtidas de rebrotas;
- Não foi possível a descontaminação de explantes provenientes de plantas adultas.
- O resultado obtido no trabalho sugere a utilização de outras citocininas como a cinetina e a zeatina, para aumentar a taxa de multiplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRÁN, J. G.; VIELMA, M.; CONTRERAS, G. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King.: Estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Forestal Venezolana**, Merida, v. 41, n. 2, p. 111-118, 1997.
- ALI, M. A.; LÜDDERS, P. In vitro culture and its application on the cloning of guava (*Psidium guajava* L.). **Journal of Applied Botany**, Berlim, v. 75, p. 164-167, 2001.
- AMIN, M. N.; JAISWAL, V. S. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a Guava cultivar. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 36, p. 89-85, 1988.
- ASSIS, T. F.; 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/CNPQ, v. 1, p. 261-296, 1998.
- AUGUSTO, C. S. S. **Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos**. Curitiba, 2001. 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação e interesse ecológico. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, 2002. p. 200-201.
- BENNY, D.; SHAJI, J.; SONIYA, E. V.; NAIR, G. M.; DANIEL, B.; JOHN, S. Micropropagation of *Naregamia alata* W & A- an important medicinal plant. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 8, n. 2, p. 105-107, 1999.
- BERGER, K; SCHAFFNER, W. In vitro propagation of the leguminous tree *Swartzia madagascariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v. 40, p. 289- 291, 1995.
- BIASI, L. A. Reguladores de Crescimento Vegetal. In: **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita**. WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. Curitiba: Champagnat, 2002. p. 63-91.
- BOLLMARCK, M.; KUBAT, B.; ELIASSON, L. Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 132, p. 262-265, 1988.
- BONGA, J.M.; ADERKAS. **In vitro culture of trees**. Boston: Kluwer Academic Publishers, v. 2, p. 54-97. 1992.
- BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. v. 3, p. 416.
- 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/CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa/CNPQ- SPI, p. 107-112, 1994.

CARVALHO, P. E. R.; ZELAZOWSKI, W. H.; KAMINSKI, N. L.; LOPES, G. L. **Plantio comprobatório de canjarana (*Cabralea canjerana* subsp. *canjerana*)**. Colombo: Embrapa/CNPF, dez/1996. 2 p. (Pesquisa em Andamento)

CERDAS, L. V.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista Biologia Tropical**, San Jose, v. 46, n. 2, p. 225-228, 1998.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI. *In vitro* clonal propagation of an adult tree of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by forced axillary branching. **Plant Science (Limerich)**, Limerich, v.166, ed. 2, p. 501-506, 2004.

CHENG, B.; PETERSON, C. M; MITCHELL, R. J. The role of sucrose, auxin and explant source on *in vitro* rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. **Plant Science (Limerich)**, Limerich, v. 87, p. 207-214, 1992.

CID, L. P. B.; GOMES, A. C. M.; COSTA, S. B. R.; TEIXEIRA, J. B. Micropropagation of *Miconia* sp. a woody melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 21-25, 1997.

DEBNATH, S.; McRAE, K. E. An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* AIT.) by axillary bud proliferation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Largo, v. 37, p. 243-249, 2001.

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

FRASSETO, E. G.; MENEZES, N. L. Influência da temperatura de germinação, da abertura dos frutos e da embalagem na viabilidade de sementes de cangerana (*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.) – MELIACEAE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 10, 1997, Brasília. **Informativo Abrates**. Brasília, 1997. v. 7, n. 1/2. p. 213.

FUSETO, A. P.; BARBOSA, A. A. A.; LOMÔNACO, C. *Cabralea canjerana* subsp. *Poytricha* (ADRI. JUSS.) PENN. (Meliaceae), uma espécie dióica. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 167-175, 2001.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.1, 1993.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.2, 1996.

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/CNPF, v. 1, 1998, p. 183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T. F.; CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP e ANA na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA

DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA-CNPQ, 1987.

GUPTA, P. K. Advances in biotechnology of conifers. **Current Science**, Bangalore, v. 57, n. 12, June 20, p. 629-637, 1988.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. **Plant Cell and Tissue Culture**, p. 539-560, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HARTNEY, V. J. Tissue culture of Eucalyptus. In: International Plant Propagators Society. **Combined Proceedings**. Seattle, v. 32, p.98-109, 1982.

HSIAO, A. I.; QUICK, W. A. Actions of hypochlorite and hydrogen peroxide on seed dormancy and germination of wild oats, *Avena fatua* L. **Weed Research**, Oxford, v.24, p. 411-419, 1984.

HUANG, L-C; HUANG, B-L.; MURASHIGE, T. A micropropagation protocol for *Cinnamomum camphora*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Largo, v. 34, p. 141-146, 1998.

INOUE, M. T. Indução à deiscência de frutos de *Cabralea* sp. **Floresta (Curitiba)**, Curitiba, v. 9, n. 1, p 14-18, 1978.

JAMES, D. J; PASSEY, A. J.; MALHOTRA, S. B. Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks. In: JAMES, D. J; PASSEY, A. J.; RUGINI, E. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 132, p. 148-154, 1988.

KATAOKA, I.; INOUE, H. Factors influencing *ex vitro* rooting of tissue cultured papaya shoots. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.321, p. 589-597, 1992.

KHATTAK, M. S; MALIK, M.N.; KHAN, M. A. Effect of surface sterilization agents on in vitro culture of guava (*Psidium guajava* L.) cv sufeda tissue. **Sarhad Journal of Agriculture**, Peshawar, v. 6, n. 2, p. 151-154, 1990.

LEONARDI, C.; RUGGERI, A.; MALFA, S. Hormone effects on in vitro proliferation and rooting of *Grevillea* explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 90, p. 335-341, 2001.

LIEW, T. K.; TEO, C.K.H. Multiple shoot production in vitro of the tropical timber tree, sentang (*Azadirachta excelsa* Linn.). **HortScience**, Alexandria, v. 33, n. 6, p. 1073-1075, 1998.

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

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, P. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v. 1, p. 124-128, 2001.

- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, Ed. Plantarum, v. 1, p. 239, 1996.
- LONGHI, R. A. **Livro das árvores e arvoretas do sul**. Porto Alegre: L&PM, p. 51-52, 1995.
- LONGHI, R. A.; MARQUES, S. E.; BISSANI, V. Época de colheita, tratamento de sementes e métodos de semeadura utilizados no viveiro florestal de Nova Prata. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 5, 1984, Nova Prata. **Anais**. Nova Prata: Prefeitura Municipal, v. 2, p. 533-553, 1984.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Perú – Amazon Forest. **Journal of Agricultural Science, The Tokyo University of Agriculture**, v. 33, n.4, p. 252-261, 1989a.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. Micropropagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. **Journal of the Japan Forestry Society**, v. 71, n.8, p. 329-331, 1989b.
- MARTIN, K. P. Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 2, p. 112-117, 2002.
- MATEO-SAGASTA, L. A. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p. 89-94, 1990.
- MEI-CHUN, L. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 96, n. 1-4, p. 239-341, 2002.
- MERETI, M.; GRIGORIADOU, K.; NANOS, G. D. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 93, p. 143-148, 2002.
- MNENEY, E.E.; MANTELL, S. H. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, n. 77, v. 6, p. 649-657, 2002.
- MOUTHIA, M; DOOKUN, A. Evaluation of surface sterilization and hot water treatments on bacterial contaminants in bud culture of sugarcane. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 35, n. 3, p. 265-274, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-497, 1962.
- NAIR, L. G.; SEENI, S. Rapid in vitro multiplication and restoration of *Celastrus paniculatus* Willd. Sub sp. *paniculatus* (Celastraceae), a medicinal woody climber. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 39, v. 7, p. 697-704, 2001.
- NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 70, p. 259-268, 2002.

NUNES, J. C. O.; BARPP, A.; SILVA, F. C.; PEDROTTI, E. Micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n.2, p. 191-195, 1999.

ORLIKOWSKA, T. K.; DYER, W. E. In vitro regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Plant Science (Limerich)**, Limerich, v. 93, p. 151-157, 1993.

PRADHAN, C.; KAR, S.; PATTNAIK, S.; CHAND, P. H. Propagation of *Dalbergia sisso* Roxb. through in vitro shoot proliferation from cotyledonary nodes. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 18, n. 1-2, p. 122-126, 1998.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. **Sellowia**, Itajaí, n. 34/35, p. 246-253, 1983.

RUDRA, J.; JUWARKAR, A. S. In vitro multiplication of *Punica granatum* Linn. CV GBG-1 (Ganesh), through axillary bud cultures. **Advances in Plant Sciences**, Muzaffarnagar, v. 15, n. 1, p. 5-10, June, 2002.

SAADAT, Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting the multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 251-260, 2002.

SCUTTI, M. B. **Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) in vitro e por estaquia**. Curitiba, 1999. 95 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

SHAHZAD, A.; SIDDIQUI, S. Micropropagation of *Melia azedarach* L. **Phytomorphology**, Delhi, v. 51, n. 2, p. 151-154, 2001.

SHARMA, A. R.; TRIGIANO, R. N.; WITTE, W. T.; SCHWARZ, O. T. In vitro adventitious rooting of *Cornus florida* microshoots. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, p.381-385, 2005.

SHEKHAWAT, M. S.; RACHERE, T.S; SINGH, R. P.; DOERA, N. S.; RAO, S. R. Factors affecting in vitro propagation of *Prosopis cineraria*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.12, p. 273-280, 1997.

SCHOTTZ, E. S. **Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de material juvenil**. Curitiba, 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPQ, v. 1, 1998 e v 2, 1999.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

TRAUTMANN, I. A.; VISSER, J. H. An in vitro study of organogenesis in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). **Plant Science (Limerich)**, Limerich, v. 72, p. 275-281, 1990.

VANKOVA, R.; HSIAO, K-C.; BORNMAN C. H.; GAUDINOVA, A. Effects of synthetic cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 10, p. 197-199, 1991.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. In vitro propagation of *Acacia* species - a review. **Plant Science (Limerich)**, Limerich, v. 163, p. 663-671, 2002.

VENKETESWARAN, S.; DIAS, M. D. L.; SULTANBAWA, F.; WEYERS, U. V. Tissue culture studies on mahogany tree, *Swietenia*. Somatic Cell Genetics of Woody Plants. In: IUFRO Working Party S 2. **Proceedings**, n. 04-07, 1987. Federal Republic of Germany: Grosshansdorf: Federal Research Centre for Forestry and Forestry Products / Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding. p. 147-153.

VILA, S.; SCOCCHI, A.; MROGINSKI, L. Plant regeneration from shoot apical meristems of *Melia azedarach* L. (Meliaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracow, v. 24, n. 2, p. 195-199, 2002.

VOYIATZI, C.; VOYIATZIS, D. G. In vitro shoot proliferation rate of *Dieffenbachia exotica* cultivar 'Mariana' as affected by cytokinins, the number of recultures and the temperature. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.40, p. 163-169, 1989.

YOUSEF, S. A.; FATTAH, F. A. Propagation of neem plant (*Azadirachta indica* L.) by tissue culture (research note). **Dirasat Agricultural Sciences**, Amman, v. 26, n. 2, p. 287-291, 1998.

YASSEN, M-J. ; SHERYL, A. B.; SCHNELL, R. J.; SPLITTSTOESSER, W. E. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, p. 525-528, 1995.

ZANON, A.; CARPANEZZI, A. A. Armazenamento de sementes de *Cabralea glaberrima* A. Jusseiu – Resultados preliminares. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, v.7, 1993. Curitiba. **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Silvicultura, Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, v.1, p. 223-224, 1993.

FIGURAS

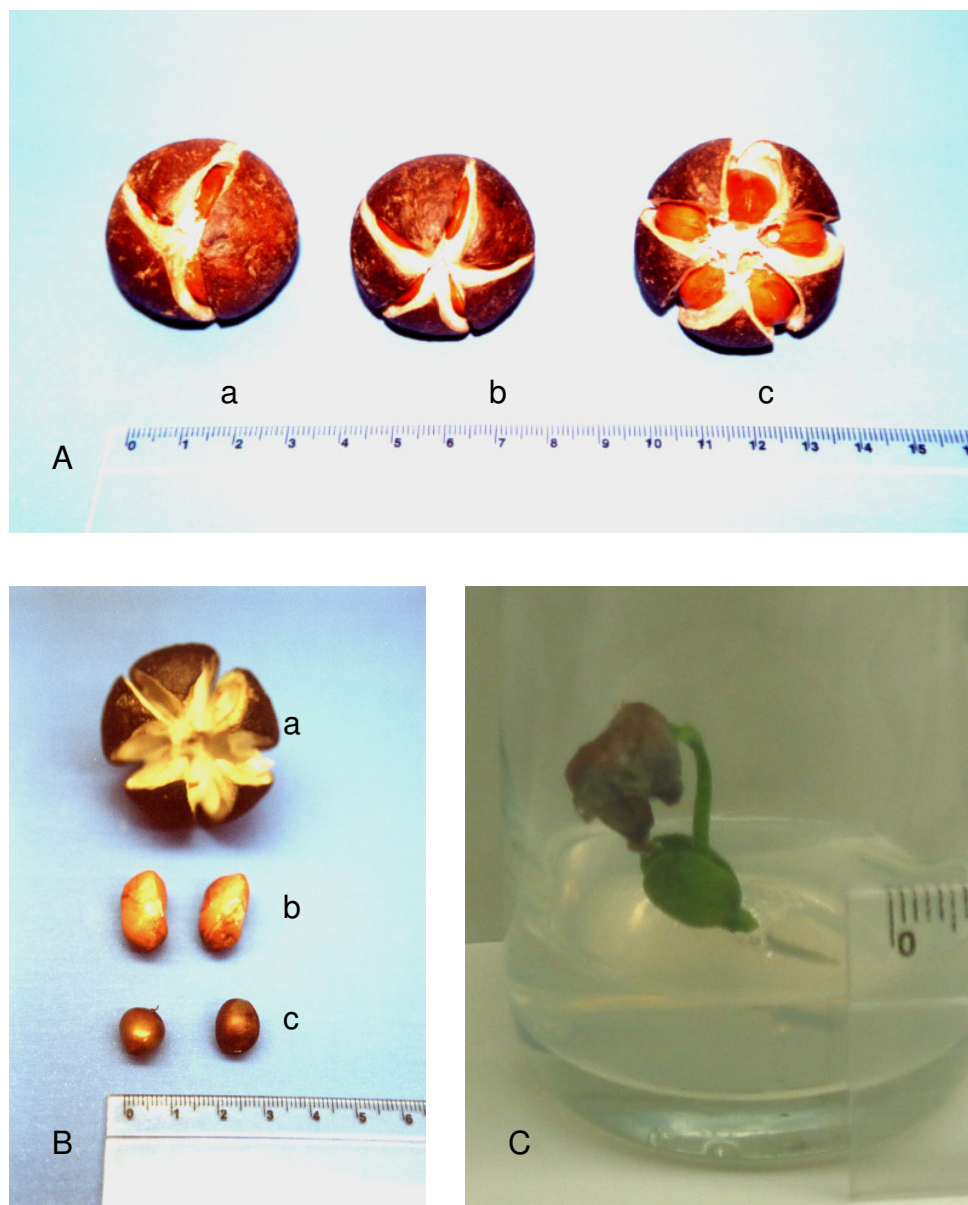


FIGURA 2 A) Frutos de *Cabralea canjerana*: a - com três fissuras e parcialmente aberto, b - com cinco fissuras; c - com cinco fissuras e totalmente aberto. B) a - Fruto aberto de *Cabralea canjerana*; b- sementes recobertas pelo arilo alaranjado; c- sementes isoladas sem o arilo. C) Plântula de canjarana (*Cabralea canjerana*) aos 18 dias após a germinação *in vitro* em meio de cultura MS/2, parte aérea recoberta pelo tegumento que envolvia a semente.

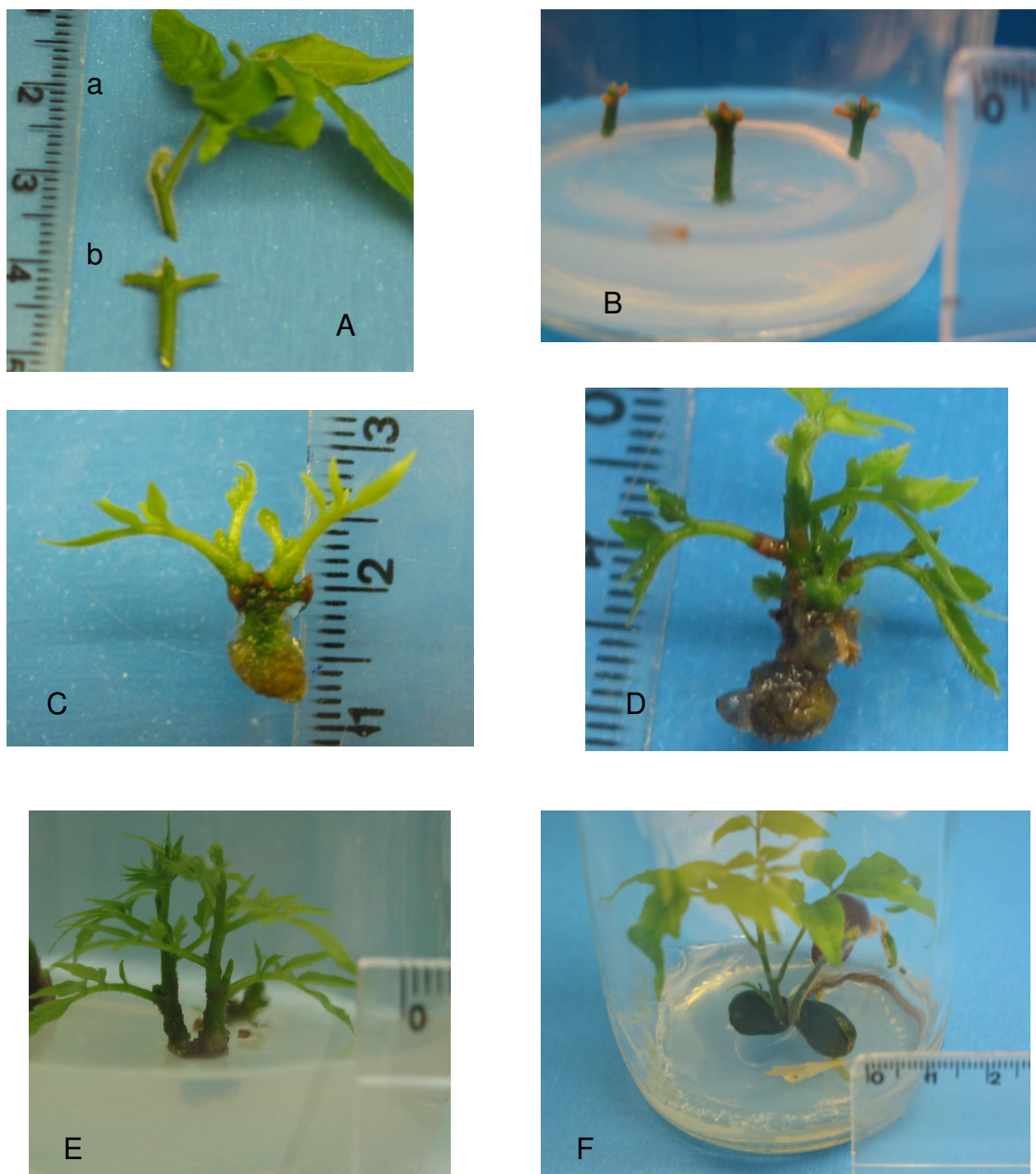


FIGURA 3 A) Segmentos de *Cabralea canjerana*; a - segmento apical; b - segmento nodal
 B) Segmentos nodais de *Cabralea canjerana*, em meio de cultura MS com 2,5 μM de BAP (após 30 dias no cultivo inicial).
 C) Segmento nodal de *Cabralea canjerana* com as gemas axilares em desenvolvimento, depois de 30 dias em meio de cultura MS (1 $^\circ$ subcultivo).
 D) Segmento nodal de *Cabralea canjerana* com gemas axilares, em meio de cultura MS com 5,0 μM BAP (2 $^\circ$ subcultivo)
 E) Segmentos nodais de *Cabralea canjerana* em meio de cultura MS adicionado de 2,5 μM BAP (3 $^\circ$ subcultivo).
 F) Aspecto da rebrota de *Cabralea canjerana*, originada da gema do nó cotiledonar, com 80 dias de idade.

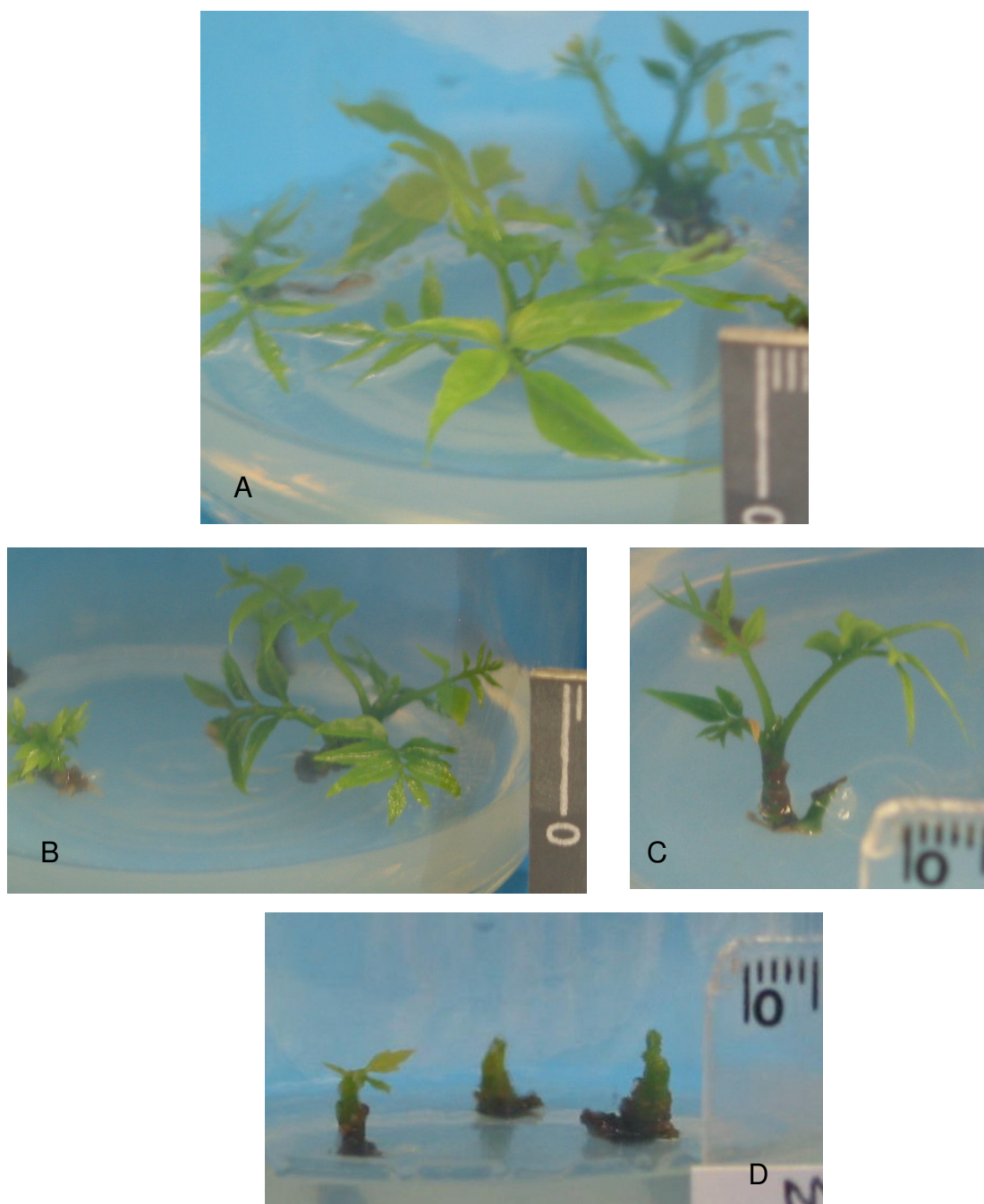


FIGURA 4 A) Segmentos nodais retirados de rebrotas, em meio de cultura MS adicionado de BAP $2,5 \mu\text{M}$ (1^o subcultivo).
B) Segmento nodal retirado de rebrota, no 3^o subcultivo em meio de cultura MS com BAP ($2,5 \mu\text{M}$) + 2-iP ($2,5 \mu\text{M}$).
C) Segmento nodal em meio de cultura WPM com $5,0 \mu\text{M}$ de BAP (2^o subcultivo)
D) Segmentos nodais em meio de cultura MS adicionado de $5,0 \mu\text{M}$ de 2-iP (2^o subcultivo).

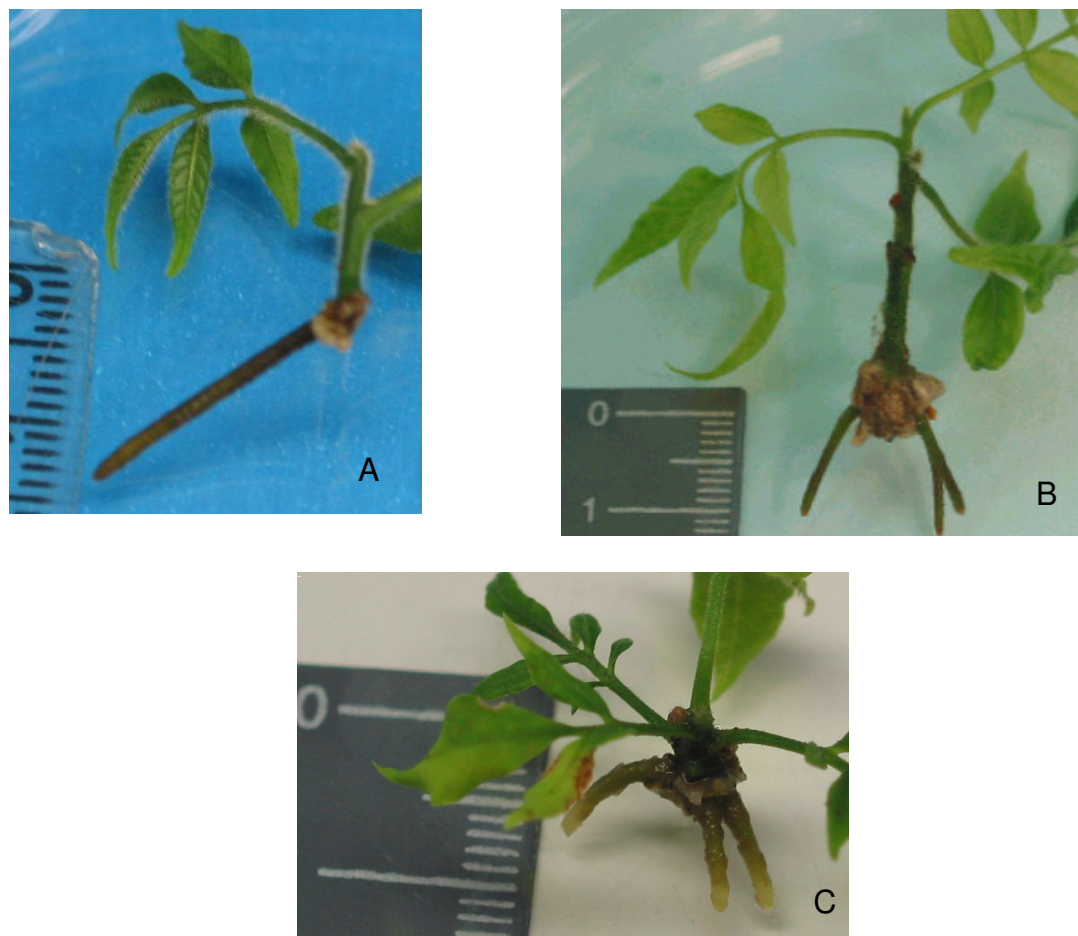


FIGURA 5 A) Segmento apical de *Cabralea canjerana* com uma raiz na base, em meio de cultura WPM sem fitorreguladores (após 30 dias no cultivo inicial).
B) Microestaca oriunda da rebrota de *Cabralea canjerana* com raízes, após 30 dias em meio WPM adicionado de $5,0 \mu\text{M}$ IBA.
C) Enraizamento de microestaca oriunda de broto de *Cabralea canjerana*, obtido na fase de multiplicação, após 30 dias em meio WPM adicionado de $5,0 \mu\text{M}$ IBA.

ANEXOS

ANEXO 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA E DO TESTE DE BARTLETT PARA DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DA *Cabralea canjerana* UTILIZANDO TRÊS CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DOIS TEMPOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Repetição	4	0,053 ^{ns}
Tratamentos	5	0,108 *
Erro Experimental	20	0,037
Total	29	
Teste de Bartlett- χ^2		2,862 ^{ns}
Coeficiente de Variação		13%

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA E DO TESTE DE BARTLETT PARA GERMINAÇÃO DE SEMENTES, AOS 7 DIAS, DE *Cabralea canjerana* DESINFESTADAS TRÊS CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DOIS TEMPOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Repetição	4	0,035 ^{ns}
Tratamentos	5	0,130 *
Erro Experimental	20	0,047
Total	29	
Teste de Bartlett- χ^2		4,300 ^{ns}
Coeficiente de Variação		16%

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA E DO TESTE DE BARTLETT PARA GERMINAÇÃO DE SEMENTES, AOS 14 DIAS, DE *Cabralea canjerana* DESINFESTADAS TRÊS CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DOIS TEMPOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Repetição	4	0,026 ^{ns}
Tratamentos	5	0,369 **
Erro Experimental	20	0,027
Total	29	
Teste de Bartlett- χ^2		3,319 ^{ns}
Coeficiente de Variação		11%

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE CANJARANA UTILIZANDO SEGMENTOS NODAIS E APICAIIS CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS, COM CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		Cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Tipo de Segmento	1	0,496**	0,060**	0,983**	0,034*	0,046*
Concentrações de BAP	4	0,493**	0,622**	0,641**	0,054**	0,022*
Segmento X BAP	4	0,211**	0,367**	0,297**	0,031**	0,010 ^{ns}
Erro Experimental	70	0,009	0,005	0,005	0,007	0,006
Total	79					
Teste de Bartlett-x ²		11,443	14,640	13,322	7,339	5,919
Coeficiente de Variação		8,15%	6,07%	6,01%	8,20%	7,17%

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A COMPARAÇÃO DAS TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM SEGMENTOS NODAIS E APICAIIS DE CANJARANA, CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Tipo de Segmento	1	0,116**	0,036*	0,869**	0,000 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Concentrações de 2-iP	4	0,309**	0,084**	0,196**	0,000 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Segmento X 2-iP	4	0,060**	0,018**	0,171**	0,000 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Erro Experimental	70	0,009	0,007	0,007	0,004	0,004
Total	79					
Teste de Bartlett-x ²		14,376	5,784	4,048	12,883	14,857
Coeficiente de Variação		8,07%	7,67%	7,29%	6,02%	6,67%

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PERCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTO DE CANJARANA UTILIZANDO SEGMENTOS NODAIS E APICAIIS CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS, COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		Cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Tipo de Segmento	1	0,053*	0,154**	0,307**	0,362**	0,103**
Concentrações de BAP	4	0,204**	0,073**	0,131**	0,224**	0,069**
Segmento X BAP	4	0,024 ^{ns}	0,065**	0,069**	0,141**	0,040**
Erro Experimental	70	0,009	0,009	0,012	0,010	0,009
Total	79					
Teste de Bartlett-x ²		11,69	7,98	12,14	11,15	9,54
Coeficiente de Variação		9,19%	8,58%	9,77%	8,95%	9,03%

NOTA: Os dados foram transformados para (x+1).

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

^{ns} – não significativo

ANEXO 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A COMPARAÇÃO DA PERCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTOS OBSERVADOS EM SEGMENTOS NODAIS E APICAIS DE CANJARANA, CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-IP, NO CULTIVO INICIAL E EM 3 SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		Cultivo inicial	1°subcultivo	2°subcultivo	3°subcultivo
Tipo de Segmento	1	0,039*	0,311**	0,133**	0,009 ^{ns}
Concentrações de BAP	4	0,096**	0,049**	0,242**	0,008 ^{ns}
Segmento X BAP	4	0,018 ^{ns}	0,026 ^{ns}	0,033*	0,003 ^{ns}
Erro Experimental	70	0,008	0,013	0,009	0,008
Total	79				
Teste de Bartlett-x ²		4,331	13,645	10,125	13,304
Coeficiente de Variação		8,35%	10,36%	8,85%	9,03%

NOTA 1: Os dados foram transformados para (x+1)

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO MÉDIO DE BROTOS EM EXPLANTES COM BROTOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS E APICAIS DE CANJARANA, CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS, COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Tipo de Segmento	1	3,042**	2,245**	2,156**	2,262**	2,754**
Concentrações de BAP	4	0,292**	4,432**	5,919**	2,683**	4,355**
Segmento X BAP	4	0,120**	1,793**	1,409**	1,012**	0,994**
Erro Experimental	70	0,021	0,006	0,012	0,012	0,013
Total	79					
Teste de Bartlett-x ²		14,68	8,22	14,13	11,45	16,02
Coeficiente de Variação		11,37%	5,86%	7,67%	7,99%	8,41%

NOTA: Os dados foram transformados para (x+1)

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PERCENTAGEM DE EXPLANTES MORTOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS E APICAIS DE CANJARANA, CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS, COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Tipo de Segmento	1	0,138**	0,049*	0,051**	0,098*	0,050*
Concentrações de BAP	4	0,380**	0,624**	0,014*	0,184**	0,207**
Segmento X BAP	4	0,108**	0,119**	0,013 ^{ns}	0,073**	0,024*
Erro Experimental	70	0,007	0,009	0,006	0,011	0,005
Total	79					
Teste de Bartlett-x ²		8,444	13,935	6,245	12,790	6,886
Coeficiente de Variação		7,56%	7,70%	7,52%	9,84%	6,40%

NOTA: Os dados foram transformados para (x+1)

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PERCENTAGEM DE EXPLANTES MORTOS OBTIDOS A PARTIR SEGMENTOS NODAIS E APICAIS DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2-iP, NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Tipo de Segmento	1	0,009 ^{ns}	0,217 ^{ns}	0,580**	0,049*	0,139**
Concentrações de 2-iP	4	0,046**	0,218**	0,070**	0,108**	0,119**
Segmento X 2-iP	4	0,074**	0,058 ^{ns}	0,090**	0,031*	0,094**
Erro Experimental	70	0,011	0,030	0,010	0,009	0,008**
Total	79					
Teste de Bartlett-x ²		16,168	15,283	13,484	5,655	7,412
Coeficiente de Variação		9,87%	14,98%	8,78%	8,77%	8,46%

NOTA: Os dados foram transformados para (x+1)

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA TAXA DE MULTIPLICAÇÃO EM SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS DE CANJARANA, EM MEIO DE CULTURA MS COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP e BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Repetição	7	0,006 ^{ns}	0,009 ^{ns}	0,020 ^{ns}	0,028 ^{ns}	0,004 ^{ns}
Tratamentos	2	0,160**	0,251**	0,751**	0,088 ^{ns}	0,012 ^{ns}
Erro Experimental	14	0,012	0,009	0,017	0,027	0,009
Total	23					
Teste de Bartlett-x ²		1,912	1,02	3,43	0,898	0,189
Coeficiente de Variação		9,57%	7,85%	9,50%	14,20%	8,88%

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS PERCENTAGENS DE EXPLANTES COM BROTO OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP e BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Repetição	7	0,038 ^{ns}	0,093 ^{ns}	0,031 ^{ns}	0,075 ^{ns}	0,046 ^{ns}
Tratamentos	2	0,313*	0,295*	0,103 ^{ns}	0,082 ^{ns}	0,225**
Erro Experimental	14	0,068	0,091	0,032	0,071	0,015
Total	23					
Teste de Bartlett-x ²		2,702	4,831	2,550	0,454	2,433
Coeficiente de Variação		21,3%	24,7%	15,0%	21,2%	10,4%

NOTA: Os dados foram transformados para (x+1)

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 1% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO MÉDIO DE BROTO EM EXPLANTES COM BROTO A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP e BAP+ 2-iP), NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Repetição	7	0,045 ^{ns}	0,075 ^{ns}	0,077 ^{ns}	0,014 ^{ns}	0,019 ^{ns}
Tratamentos	2	1,957**	0,292*	1,326**	0,797**	4,542**
Erro Experimental	14	0,062	0,060	0,030	0,018	0,015
Total	23					
Teste de Bartlett-x ²		0,16	1,59	1,06	0,09	0,28
Coeficiente de Variação		14,68%	16,786%	10,11%	7,24%	6,77%

NOTA: Os dados foram transformados para (x+1)

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PERCENTAGEM DE EXPLANTES MORTOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE REBROTAS DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS, COM TRÊS TRATAMENTOS (2-iP, BAP e BAP+ 2-iP), NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		1°subcultivo	2°subcultivo	3°subcultivo	4°subcultivo
Repetição	7	0,017 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0,018 ^{ns}
Tratamentos	2	0,588 **	0,151 **	0,267 **	0,008 ^{ns}
Erro Experimental	14	0,006	0,009	0,006	0,015
Total	23				
Teste de Bartlett-x ²		0,490	2,353	2,026	2,935
Coeficiente de Variação		6,62%	8,29%	6,67%	10,96%

NOTA 1: Os dados foram transformados para (x+1)

NOTA 2: Não foi realizada análise estatística para o cultivo inicial, pois todos os valores dos dados eram nulos.

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO OBSERVADAS EM SEGMENTOS NODAIS E APICAIIS DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo	4° subcultivo
Tipo de Segmento	1	0,024 ^{ns}	0,015 ^{ns}	0,077**	0,004 ^{ns}	0,017 ^{ns}
Concentrações de BAP	2	0,244**	0,043 ^{ns}	0,037**	0,021 *	0,006 ^{ns}
Segmento X BAP	2	0,024 ^{ns}	0,014 ^{ns}	0,025*	0,002 ^{ns}	0,006 ^{ns}
Erro Experimental	42	0,012	0,015	0,005	0,006	0,007
Total	47					
Teste de Bartlett-x ²		7,617	9,791	3,306	4,358	2,333
Coeficiente de Variação		10,40%	11,73%	6,77%	7,38%	8,27%

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PERCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTO UTILIZANDO SEGMENTOS NODAIS E APICAIS DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS TRÊS SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		cultivo inicial	1ºsubcultivo	2ºsubcultivo	3ºsubcultivo
Tipo de Segmento	1	0,208**	0,007 ^{ns}	0,075**	0,000 ^{ns}
Concentrações de BAP	2	0,052**	0,171**	0,027*	0,011 ^{ns}
Segmento X BAP	2	0,052**	0,006 ^{ns}	0,027*	0,006 ^{ns}
Erro Experimental	42	0,09	0,018	0,008	0,010
Total	47				
Teste de Bartlett-x ²		6,10	9,04	3,36	3,19
Coeficiente de Variação		9,07%	11,91%	8,67%	9,44%

NOTA 1: Os dados foram transformados para (x+1)

NOTA 2: Não foi observada a presença de explantes com brotos no 4º subcultivo

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PERCENTAGEM DE EXPLANTES MORTOS EM SEGMENTOS NODAIS (SN) E APICAIS (SA) DE CANJARANA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP, NOS QUATRO SUBCULTIVOS

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		1ºsubcultivo	2ºsubcultivo	3ºsubcultivo	4ºsubcultivo
Tipos de Segmento	1	0,001 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,044 ^{ns}	0,060*
Concentrações de BAP	2	0,004 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,053*	0,024 ^{ns}
Segmento X BAP	2	0,011 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,024 ^{ns}	0,015 ^{ns}
Erro Experimental	42	0,007	0,004	0,014	0,009
Total	47				
Teste de Bartlett-x ²		3,140	1,651	9,862	10,186
Coeficiente de Variação		8,44%	6,35%	10,83%	9,01%

NOTA 1: Os dados foram transformados para (x+1)

NOTA 2: Não foi realizada análise estatística para o cultivo inicial, pois todos os valores dos dados eram nulos.

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PERCENTAGEM DE MICROESTACAS DE CANJARANA ENRAIZADAS EM MEIO DE CULTURA MS/2 ADICIONADO DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE AIB NO 1º E 2º EXPERIMENTO

Fonte de Variação	Graus de Liberdade		Quadrado Médio	
	1º Experimento	2º Experimento	1º Experimento	2º Experimento
Repetição	3	3	0,023 ^{ns}	0,020 ^{ns}
Tratamentos	3	3	0,092*	0,174**
Erro Experimental	9	9	0,018	0,011
Total	15	15	0,011	0,013
Teste de Bartlett-x ²	1,11 ^{ns}	1,13 ^{ns}		
Coeficiente de Variação			22,32	14,38%

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES POR MICROESTACAS DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS/2 ADICIONADO DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE IBA NO 1º E 2º EXPERIMENTO

Fonte de Variação	Graus de Liberdade		Quadrado Médio	
	1º Experimento	2º Experimento	1º Experimento	2º Experimento
Repetição	3	3	0,019 ^{ns}	0,159 ^{ns}
Tratamentos	3	3	6,951**	1,979*
Erro Experimental	9	9	0,094	0,311
Total	15	15	0,332	0,474
Teste de Bartlett-x ²	2,41 ^{ns}	2,88 ^{ns}		
Coeficiente de Variação			11,65%	26,00%

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade

ANEXO 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O COMPRIMENTO MÉDIO DAS RAÍZES DE MICROESTACAS DE CANJARANA EM MEIO DE CULTURA MS/2 ADICIONADO DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE AIB NO 1º E 2º EXPERIMENTO

Fonte de Variação	Graus de Liberdade		Quadrado Médio	
	1º Experimento	2º Experimento	1º Experimento	2º Experimento
Repetição	3	3	0,050 ^{ns}	0,159 ^{ns}
Tratamentos	3	3	0,379**	1,979*
Erro Experimental	9	9	0,018	0,311
Total	15	15	0,021	0,474
Teste de Bartlett-x ²	1,85 ^{ns}	6,04 ^{ns}		
Coeficiente de Variação			22,84%	25,19%

^{ns} – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* – significativo ao nível de 5% de probabilidade

** – significativo ao nível de 1% de probabilidade