

SANDRA REGINA CABEL

MICROPROPAGAÇÃO DE CINAMOMO
(*Melia azedarach*, L.)

CURITIBA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SANDRA REGINA CABEL

MICROPROPAGAÇÃO DE CINAMOMO
(*Melia azedarach*, L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrônomicas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette

CURITIBA

2006



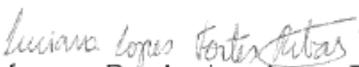
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **SANDRA REGINA CABEL**, sob o título "**MICROPROPAGAÇÃO DE CINAMOMO (*Melia azedarach* L.)**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 31 de Agosto de 2006.


Professora Dr^a. Luciana Lopes Fortes Ribas
Primeira Examinadora


Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Segundo Examinador


Professor Dr. Flavio Zanette
Presidente da Banca e Orientador

***À minha filha Luiza,
o meu eterno 'bebê',
o meu amor maior,
a minha alegria de viver,
o meu maior orgulho!***

DEDICO

***“Pedras no caminho?
Guardo todas... um dia vou
construir um castelo...”***

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pela possibilidade de realizar o mestrado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, e especialmente ao coordenador, Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi, uma das pessoas mais nobres que eu tive a oportunidade de conhecer e conviver;

Ao Prof. Dr. Flávio Zanette, pela dedicada orientação, amizade, ensinamentos transmitidos, e incentivos para a realização deste curso de pós-graduação;

À banca de pré-defesa e defesa composta pelos Professores: Dr. Luiz Antonio Biasi, Dra. Luciana L.F. Ribas e Dr. Flávio Zanette, pelos preciosos ensinamentos, direcionamentos e sugestões;

À Professora Dra. Marguerite Quoirin, pela amizade, ensinamentos, com quem foi um privilégio conviver por este período;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o período desta pesquisa;

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto;

À Empresa Rio do Pinho, ao Eng. Agr. Odoni Bertocini e ao Sr. Eliseu Leandro, que gentilmente cederam as mudas de cinamomo para o início dos trabalhos;

À Companhia Paranaense de Energia Elétrica – COPEL, que, ao ceder o caminhão equipado com plataforma elevatória para o Projeto Araucária, foi também de fundamental importância para a coleta de material vegetal de árvore adulta de cinamomo;

À Lucimara Antunes, pela sua amizade, paciência e colaboração;

Às minhas 'amigas de infância' e de sempre Giselda Alves e Simone W. Polack pelo convívio que trouxe doces lembranças da graduação;

Aos meus novos amigos e para sempre irmãos de coração: Lizane Souza, Roberson Dibax, Justina Anselmini, Regina Quisen, Tássio Rech e Marília Pereira, por simplesmente existirem e fazerem parte da minha vida, tornando muito mais leves e alegres os meus dias;

Aos estagiários Francine, Sibelle, Thiago e, apesar da distância, Mathilde (França);

À toda a minha família, que sempre me apoiou e confiou em meu potencial... em especial aos queridos tio Hélio e meu irmão, Carlos Eduardo (Caco), meus grandes motivadores;

À minha filha, Luiza, meu amor maior e meu maior orgulho e

À minha mãe, Dine, grande amiga, pela sua força, seu amor e paciência.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	Xii
LISTA DE QUADROS	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DE <i>Melia azedarach</i> L.	
2.1.1 Propagação da <i>Melia Azedarach</i> , L.	4
2.1.1.1 Propagação sexuada.....	4
2.1.1.2 Propagação vegetativa.....	5
2.2 MICROPROPAGAÇÃO	
2.2.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes.....	6
2.2.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas.....	6
2.2.3 Estágio 2: Multiplicação.....	8
2.2.4 Estágio 3: Enraizamento.....	10
2.2.5 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de microestacas enraizadas.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 LOCAL E DATA DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	15
3.2 PLANTAS JUVENIS	
3.2.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes	
3.2.1.1 Origem do material vegetal.....	15
3.2.1.2 Pré-desinfestação das mudas.....	15
3.2.1.3 Coleta dos explantes.....	16
3.2.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas	
3.2.2.1 Desinfestação dos explantes.....	16
3.2.2.2 Estabelecimento dos explantes em meio de cultura asséptico.....	16
3.2.3 Estágio 2: Multiplicação	
3.2.3.1 Origem do material vegetal.....	17
3.2.3.2 Avaliações Preliminares.....	18
3.2.3.3 Experimento: Efeito de 9 concentrações de BAP suplementadas ao meio básico de sais de MS na multiplicação <i>in vitro</i> de 2 tipos de microestacas de <i>Melia azedarach</i> L.	18

3.2.4 Estágio 3: Enraizamento	
3.2.4.1 Origem do material vegetal.....	20
3.2.4.2 Experimento: Efeito de 3 diluições de sais de MS suplementados com 5 concentrações de AIB no enraizamento de microestacas de <i>Melia azedarach</i> L.	20
3.2.5 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de microestacas enraizadas	
3.2.5.1 Origem do material vegetal.....	21
3.2.5.2 Experimento 1: Efeito de 3 substratos, na primeira fase de aclimatização de microestacas de (<i>Melia azedarach</i> L.), enraizadas com 10 e 21 dias, sob sistema de irrigação intermitente.....	22
3.2.5.3 Experimento: Efeito de 3 substratos, na segunda fase de aclimatização ou rustificação de microestacas enraizadas de <i>Melia azedarach</i> L., em embalagens de polietileno e com irrigação manual.....	24
3.3 PLANTAS ADULTAS	
3.3.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes	
3.3.1.1 Origem do material vegetal.....	26
3.3.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas	
3.3.2.1 Coleta e pré-desinfestação dos segmentos apicais.....	26
3.3.2.2 Experimento: Efeito de 4 concentrações de NaOCl em 2 tempos de exposição na desinfestação de segmentos nodais, retirados de ramos de árvore adulta de <i>Melia azedarach</i> L.	27
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 PLANTAS JUVENIS	
4.1.1 Estágios 0 e 1: Seleção e preparo de plantas matrizes e estabelecimento de culturas assépticas.....	29
4.1.2 Estágio 2: Multiplicação	
4.1.2.1 Avaliações Preliminares	
4.1.2.1.1 Ensaio preliminar de multiplicação de segmentos uninodais com meio MS, onde foram testados 3 tipos de citocininas: BAP, 2-iP e KIN, nas concentrações: 1,11 e 2,2 µM (BAP); 1,23 e 2,46 µM (2-iP) e 1,16 e 2,32 µM (KIN).....	30

4.1.2.1.2 Ensaio preliminar onde foram testados meios de cultura com 3 composições básicas de sais (MS, QL e WPM), suplementadas com 1,11 µM e 2,2 µM BAP	31
4.1.2.1.3 Ensaio preliminar onde foi observado o efeito do carvão ativado adicionado ao meio de multiplicação: MS +1,11 µM BAP, na formação de calos na base das brotações.....	32
4.1.2.1.4 Ensaio preliminar onde foi observado o efeito da orientação do explante no meio de cultura.....	33
4.1.2.2 Experimento: Efeito de 9 concentrações de BAP suplementadas ao meio básico de sais de MS na multiplicação <i>in vitro</i> de 2 tipos de microestacas de <i>Melia azedarach</i> L.	33
4.1.3 Estágio 3: Enraizamento	
4.1.3.1 Experimento: Efeito de 3 diluições de sais de MS suplementados com 5 concentrações de AIB no enraizamento de microestacas de <i>Melia azedarach</i> L.	38
4.1.4 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de microestacas enraizadas	
4.1.4.1 Experimento: Efeito de 3 substratos, na primeira etapa de aclimatização de microestacas de (<i>Melia azedarach</i> L.), enraizadas com 10 e 21 dias, sob sistema de irrigação intermitente.....	42
4.1.4.2 Experimento: Efeito de 3 substratos, na segunda etapa de aclimatização ou rustificação de microestacas enraizadas de <i>Melia azedarach</i> L., em embalagens de polietileno e com irrigação manual.....	48
4.2 PLANTAS ADULTAS	
4.2.1 Estágio 0 e 1: Seleção, preparo de plantas matrizes e estabelecimento de culturas assépticas	
4.2.1.1 Experimento: Efeito de 4 concentrações de NaOCl em 2 tempos de exposição na desinfestação de segmentos nodais, retirados de ramos de árvore adulta de <i>Melia azedarach</i> L.	54
5 CONCLUSÃO.....	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
7 REFERÊNCIAS.....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Análise química dos substratos – 1) Plantmax HT® (100%); 2) Plantmax HT® (50%) + CAC (50%); 3) CAC (100%).....	24
TABELA 2 –	Determinação rápida das propriedades físicas dos substratos, segundo metodologia de Fretz <i>et al.</i> , 1979.....	24
TABELA 3 –	Resultados da análise de variância para as variáveis número médio de brotos e de folhas na multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas apicais e subapicais de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Média de 3 subcultivos.....	34
TABELA 4 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de brotos, na multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas apicais e subapicais de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Médias de 3 subcultivos.....	34
TABELA 5 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de folhas, na multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas apicais e subapicais de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Médias de 3 subcultivos.....	36
TABELA 6 –	Resultados da análise de variância para as variáveis número de gemas, incremento na altura do caule e altura do maior broto na multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas apicais e subapicais de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 9 concentrações de BAP.....	36
TABELA 7 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das variáveis número de gemas, incremento na altura do caule (cm) e altura do maior broto (cm) na multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas apicais e subapicais de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Médias de 3 subcultivos.....	37
TABELA 8 –	Resultados da análise de variância para as variáveis: porcentagem de enraizamento, número e comprimento (cm) das raízes primárias no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.....	38
TABELA 9 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável porcentagem de enraizamento, no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.....	39
TABELA 10 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de raízes primárias, no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.....	40

TABELA 11 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável comprimento de raízes primárias, no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.....	40
TABELA 12 –	Resultados da análise de variância para as variáveis: incremento na altura do caule (cm) e número de folhas no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Melia azedarach</i> submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.....	41
TABELA 13 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável incremento na altura do caule no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.....	41
TABELA 14 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de folhas, no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.....	42
TABELA 15 –	Resultados da análise de variância para as variáveis: incremento no número e comprimento de raízes primárias (cm), e nota para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de <i>Melia azedarach</i> L. na primeira fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, sob irrigação intermitente.....	43
TABELA 16 –	Resultados da análise de variância para incremento na massa fresca total (g), altura da parte aérea (cm), número de gemas e folhas de microestacas enraizadas de <i>Melia azedarach</i> L., na primeira fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, sob irrigação intermitente.....	46
TABELA 17 –	Resultados da análise de variância para as variáveis: incremento no número e comprimento de raízes primárias (cm), e nota para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de <i>Melia azedarach</i> , L. na segunda fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, com irrigação manual.....	49
TABELA 18 –	Resultados da análise de variância para o incremento na massa fresca total (g), altura da parte aérea (cm), número de gemas e folhas de microestacas enraizadas de <i>Melia azedarach</i> L., na segunda fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, com irrigação manual.....	51
TABELA 19 –	Resultados da análise de variância para as variáveis: sobrevivência, contaminação com bactéria e oxidação, expressas em porcentagem, na desinfestação de segmentos nodais de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 4 concentrações de NaOCl e 2 tempos de exposição.....	54

TABELA 20 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável porcentagem de sobrevivência e contaminação por bactéria, na desinfestação de segmentos nodais de planta adulta de <i>Melia azedarach</i> L. submetidas a 4 concentrações de NaOCI e 2 tempos de exposição.....	55
TABELA 21 –	Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável porcentagem de oxidação, na desinfestação de segmentos nodais de planta adulta de <i>Melia azedarach</i> , L. submetidas a 4 concentrações de NaOCI e 2 tempos de exposição.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Critério de avaliação para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de cinamomo (<i>Melia azedarach</i> L.) sob o efeito de 3 substratos, avaliadas após permanência de 20 dias em casa-de-vegetação, sob irrigação intermitente. Foram definidas 4 notas (1 a 4) em ordem crescente de desenvolvimento.....	23
FIGURA 2 –	Critério de avaliação para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de Cinamomo (<i>Melia azedarach</i> L.) avaliadas após permanência de 10 dias sob irrigação intermitente, e 30 dias sob irrigação manual. Foram definidas 4 notas (1 a 4), em ordem crescente de desenvolvimento.....	25
FIGURA 3 –	Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento no número de raízes primárias.....	44
FIGURA 4 –	Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento no comprimento das raízes primárias (cm).....	45
FIGURA 5 –	Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável nota para desenvolvimento radicial.....	45
FIGURA 6 –	Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento na massa fresca total (g).....	47
FIGURA 7 –	Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento na altura da parte aérea (cm).....	47
FIGURA 8 –	Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento no número de gemas.....	48
FIGURA 9 –	Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento no número de folhas.....	48
FIGURA 10 –	Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento no número de raízes primárias.....	49

FIGURA 11 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para o variável incremento no comprimento das raízes primárias (cm).....	50
FIGURA 12 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável nota para desenvolvimento radicial.....	50
FIGURA 13 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento na massa fresca total (g).....	51
FIGURA 14 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento na altura da parte aérea (cm).....	52
FIGURA 15 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento no número de gemas.....	52
FIGURA 16 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de <i>Melia azedarach</i> , L. enraizadas <i>in vitro</i> , para a variável incremento no número de folhas.....	53
FIGURA 17 – (A) Arvore de cinamomo (<i>Melia azedarach</i>), variedade comum, com mais de 20 anos de idade, localizada na esquina entre as ruas Recife e Chichorro Júnior, no bairro Juvevê, Curitiba/Pr. Foto tirada em 10/01/2006. (B) Árvore de cinamomo (<i>Melia azedarach</i>) variedade sombrinha. Fonte: www.waste.ideal.es/cinamomo.htm . (C) Folhas de <i>Melia azedarach</i> composta por 9 folíolos. Fonte: www.forestry.auburn.edu/.chinaberry.htm . (D) Flores da mesma espécie em diferentes estádios de desenvolvimento. Fonte: www.floridanature.org/species.asp?species=melia_azedarach . (E) Frutos carnosos do cinamomo <i>Melia azedarach</i> dispostos em ráculos. Fonte: www.tncweeds.ucdavis.edu/photosq-p.html e drupas (F). Fonte: www.semencesdupuy.com . (G) Fruto de <i>Melia azedarach</i> ; à direita corte transversal mostrando os lóculos em número de 4, e sementes extraídas do fruto (H). Fonte: www.alpine-plants-jp.com/himitunohanazono . Figuras encontradas na WEB em 19/01/2006.....	65

- FIGURA 18 – (A) Mudas de cinamomo (*Melia azedarach*) com 7 meses de idade (dezembro de 2003), trazidas do distrito do Rio do Pinho/SC. Em (B), muda transferida para vaso com vermiculita mantida em casa-de-vegetação, com 9 meses de idade (fevereiro de 2004), sob irrigação manual. (C) Muda com 10 meses de idade, sendo 7 dias após coleta das brotações para estabelecimento *in vitro*. No detalhe, as setas indicam o intenso crescimento vegetativo. Segmentos apicais de *Melia azedarach* coletados para estabelecimento *in vitro*. (D) Segmento apical fracionado para desinfestação sob condições assépticas. (E) Segmento uninodal de cinamomo com 10 mm após a desinfestação e após padronização para o isolamento, com 5 mm para isolamento (F). Segmento nodal de isolado em meio de cultura (G) e desenvolvimento da gema após 15 dias do isolamento (H)..... 67
- FIGURA 19 – Microestaca enraizada de *Melia azedarach* e mantida em sala de crescimento por 10 dias (A) e 21 dias (B). Microestacas padronizadas em 15 mm para a etapa de enraizamento *in vitro* (C). Mudanças de cinamomo na primeira etapa da aclimatização, em bandejas, submetidas aos tratamentos com 3 substratos: (D) Plantmax HT[®]100%; (E) Plantmax HT[®]50%+CAC(50%) e (F) CAC(100%). Mudanças com torrão formado (G) – da esquerda para a direita: Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®] 50%+CAC(50%) e CAC (100%) e em (E), as mesmas mudas, porém com raízes nuas para avaliação..... 69
- FIGURA 20 – Muda de cinamomo (*Melia azedarach*): (A) transplantada para embalagem de polietileno na segunda etapa da aclimatização; (B) Em caixas plásticas após o transplante para embalagens de polietileno na segunda etapa da aclimatização; (C) em embalagens de polietileno, submetidas aos tratamentos com 3 substratos, sendo da esquerda para a direita: Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®]50%+CAC(50%) e CAC(100%). (D) Muda pertencente ao tratamento com substrato Plantmax HT[®]50%+ CAC(50%), com detalhe para as raízes bem desenvolvidas e (E) sem a embalagem de polietileno, com torrão formado. Da esquerda para a direita: Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®]50%+CAC(50%) e CAC(100%) e em (F) com raízes nuas para avaliação..... 71
- FIGURA 21 – (A) Árvore adulta de cinamomo (*Melia azedarach*) selecionada para matriz doadora de explantes para estabelecimento *in vitro*. Campus do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Curitiba/PR. (B) Segmentos apicais constituídos de brotações novas, de ramos da estação, com 7 a 10 mm de diâmetro e 150 a 200 mm de comprimento. Segmento apical após a eliminação das folhas (C); a seta indica porção do ramo do ano anterior mantida na desinfestação. O mesmo segmento, (D), em imersão em solução de NaOCl. Brotações fracionadas em segmentos uninodais, com 10 mm de comprimento (E). Desenvolvimento dos primórdios foliares de ápices caulinares de *Melia azedarach* L., isolados de planta adulta (F)..... 73

- FIGURA 22 – Avaliações preliminares de multiplicação de segmentos uninodais de cinamomo (*Melia azedarach*) com BAP, Kin e 2-iP: (A) brotação obtida após 30 dias em meio de multiplicação (MS+1,11 µM BAP), ilustrando a dominância apical e a possibilidade de repicagem por meio de seccionamentos no eixo vertical; (B) Brotação com crescimento desordenado, após 30 dias em meio de multiplicação contendo Kin; (C e D) brotações cloróticas, pouco desenvolvidas, submetidos ao tratamento com a citocinina 2iP. No detalhe, a formação de calo compacto. Avaliações preliminares de multiplicação de segmentos uninodais de cinamomo (*Melia azedarach* L) com meios básicos de sais de MS, QL e WPM: brotações obtidas com meio MS+1,11 µM BAP (E), com brotações verdes e vigorosas; (F), brotações obtidas com meio QL+1,11 µM BAP, com aspecto frágil e coloração amarelada. Ainda, em F, a seta indica ocorrência de necrose apical. Avaliações preliminares de multiplicação de segmentos uninodais na presença e ausência de carvão ativado em meio MS+1,11 µM BAP): (G) brotação em meio com 0,2% (m/v) de carvão ativado e (H), o mesmo meio, porém sem o carvão ativado, onde as setas inferiores indicam a formação de calo na base das brotações e as setas superiores indicam ocorrência de necrose apical dos brotos..... 74
- FIGURA 23 – Microestacas de *Melia azedarach* L. enraizadas em meio (A) MS/2+2,46 µM de AIB (incremento na altura do caule); (B) MS/2+4,92 µM de AIB (número de raízes e porcentagem de enraizamento); (C) MS+4,92 µM de AIB (comprimento das raízes)..... 76
- FIGURA 24 – Microestacas de *Melia azedarach* L. multiplicadas em meio (A) MS+1,66 de BAP (apical); (B) MS+1,66 µM de BAP (subapical) – número de brotos e de gemas por explante; (C) MS+3,33µM de BAP (subapical) – número de brotos e formação de calo na base da brotação..... 76

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Cronograma de irrigação automática intermitente em casa-de-vegetação.....	22
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AIB	ácido Indol-3-butírico
ANA	ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
CA	carvão ativado
CAC	casca de arroz carbonizada
CTC	capacidade de troca catiônica
C.V.	coeficiente de variação
2-iP	N ⁶ -(2-isopentenil)adenina
etOH	etanol
GA ₃	ácido giberélico
Kin	cinetina; 6-furfurilaminopurina
®	marca registrada
MS	meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
MS1/2	meio MS com a metade da concentração de sais
MS1/3	meio MS com um terço da concentração de sais
µM	micromol
NaOCl	hipoclorito de sódio
QL	meio de cultura Quoirin e Lepoivre (1977)
WPM	meio de cultura Wood Plant Medium de Lloyd e McCown (1980)

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido para estabelecer um protocolo de micropropagação de plantas de cinamomo (*Melia azedarach*, L.). Inicialmente, utilizou-se explantes de plantas juvenis para os estudos das diversas fases da micropropagação e posteriormente o modelo foi adaptado para explantes provenientes de plantas adultas. O material vegetal juvenil foi obtido de mudas 8 meses de idade, cujos segmentos uninodais foram desinfestados e estabelecidos *in vitro*. Em seguida, para a fase de multiplicação dos brotos, foram testadas 9 concentrações de BAP (0; 0,55; 1,11; 1,65; 2,22; 2,77; 3,33; 3,66 e 4,4 μM) em meio básico de MS. Para o enraizamento das microestacas, avaliou-se o efeito de 5 concentrações de AIB (0; 2,46; 4,92; 7,38 and 9,84 μM) combinadas a 3 diluições do meio MS (1/3, 1/2 e 1). Para a aclimatização em casa-de-vegetação, foram testados 3 substratos (Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®]50%+CAC(50%) e CAC(100%)), para microestacas enraizadas *in vitro* durante 21 dias. Para o material vegetal coletado de planta adulta, primeiramente foi realizada uma pré-desinfestação dos segmentos apicais, e em seguida foi avaliado o efeito de 4 concentrações de NaOCl (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) em 2 tempos de exposição (10 e 15 minutos) para a desinfestação e estabelecimento *in vitro*. O protocolo para a micropropagação de planta juvenil para as condições testadas, ficou assim definido: segmentos uninodais foram desinfestados com 30 segundos em etanol 70% (v/v) seguido de 10 minutos em solução contendo NaOCl 0,5% (v/v) com adição de Tween 20 a 0,1% (v/v) e isolados em meio básico MS contendo 4,4 μM de BAP, 0,3 μM de GA₃ e 0,05 μM de ANA. Com relação à multiplicação, a concentração de 1,66 μM de BAP promoveu os melhores resultados, com taxa de multiplicação de 4,75 para microestacas axilares e 17,94 gemas formadas por microestaca, o que possibilita a multiplicação através do seccionamento do eixo vertical das brotações. Os melhores resultados para enraizamento foram obtidos com o meio MS/2 acrescido de 4,92 μM de AIB com 90% de enraizamento e 3,65 raízes por microestaca. Na aclimatização, o melhor resultado foi obtido com o transplante de microestacas em substrato Plantmax HT[®] (50%)+CAC (50%). O estabelecimento de ápices caulinares coletados de planta adulta foi possível com a imersão dos segmentos apicais durante 24 horas em solução contendo fungicida sistêmico tiofanato metílico - Cercobin[®] a 0,7 g.L⁻¹ (p/v) seguida de imersão em NaOCl a 1,0% (v/v) por 12 horas. Para a desinfestação dos segmentos nodais com 10 mm de comprimento o melhor resultado foi a combinação de 30 segundos de etanol 70% (v/v), seguido de 10 minutos em NaOCl a 0,5% (v/v) com 0,1% (v/v) de Tween 20. Os ápices meristemáticos foram isolados em meio MS acrescido de 4,4 μM de BAP, 0,3 μM de GA₃ e 0,05 μM de ANA. O estabelecimento dos explantes deu-se após 45 dias do isolamento quando se pôde observar 85% dos explantes viáveis, com o desenvolvimento dos primórdios foliares.

Palavras-chave: Meliaceae, regulador de crescimento, cultura de tecidos.

ABSTRACT

This present work was developed in order to obtain a procedure of micropropagation of cinamomo plants (*Melia azedarach*, L.). Firstly, explants from juvenile plants were used for the study of the different steps of the micropropagation and then the model was adapted for explants coming from adult plants. The juvenile vegetal material was taken from nursery plants with age of 8 months, whose nodal segments were disinfested and established *in vitro*. After that, for shoots multiplication step, 9 concentrations of BAP were tested (0; 0.5; 1.11; 1.66; 2.22; 2.77; 3.32; 3.66 and 4.44 μM) in MS (Murashige & Skoog, 1962) basic medium. For the rooting of the microcuttings, the effect of 5 concentrations of IBA (0; 2.46; 4.92; 7.38 and 9.84 μM) were evaluated, combined with 3 dilutions of the MS medium (1/3, 1/2 and 1). For acclimatization in greenhouse conditions, 3 substrates were compared Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®]50%+CAC (50%) and CAC (100%), for *in vitro* rooted microcuttings during 21 days. For the collected vegetal material of adult plant, firstly was done a previous disinfestations of the apical segments, then the effect of 4 concentrations of NaOCl (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0%) was evaluated in 2 expositions (10 and 15 minutes) for the disinfestation and *in vitro* establishment. The procedure for micropropagation from juvenile plants for the tested conditions therefore was defined: nodal segments were disinfested with the combination of 30 seconds in etOH 70% (v/v) and 10 minutes in NaOCl 0.5% (v/v) solution with Tween 20 to 0.1% (v/v); then, the explants were isolated in MS basic medium with 4.4 μM BAP, 0.3 μM GA₃ and 0.05 μM NAA. In relation to the multiplication, the 1.66 μM BAP concentration promoted the best results, with the rate of multiplication of 4.75 for axillary buds and 17.94 buds formed for microcutting, it makes possible the multiplication through the section of the vertical axle of the shoots. The best results for rooting were MS/2 increased of 4.9 μM AIB with 90% of rooting and 3.65 roots for microcutting. In the acclimatization, the best result, for the tested conditions, was the transplant of microcuttings in substrate Plantmax HT[®] (50%)+CAC (50%). The establishment of shoot tip apices collected from adult plant was possible with the immersion of the apical segments during 24 hours in solution of the Thiophanate Methyl - Cercobin[®] fungicide to 0.7 g.L⁻¹ (w/v) followed by immersion in NaOCl to 1.0% (v/v) for 12 hours. For the disinfestations of nodal segments with length of 10mm the best result was the combination in 30 seconds of etOH 70% (v/v), followed by 10 minutes in NaOCl 0.5% (v/v) with 0.1% (v/v) of Tween 20. Shoot tips were isolated on MS medium added with 4.4 μM BAP, 0.3 μM GA₃ and 0.05 μM NAA. The explants establishment happened after 45 days of isolation when it could be observed 85% of the viable explants, with the development of the primary leaves.

Key-words: Meliaceae, growth regulator, tissue culture.

1 INTRODUÇÃO

O cinamomo (*Melia azedarach* L.) é uma árvore da família das meliáceas, nativa do sul da Ásia, bem adaptada no Brasil.

Plantas de cinamomo da variedade Comum podem ser encontradas facilmente na arborização urbana compondo o paisagismo em ruas, praças e avenidas principalmente na região Sul do Brasil. Mais recentemente, a variedade Gigante está sendo plantada em grandes áreas para exploração da madeira, também no Sul do Brasil.

Esta espécie vem despertando grande interesse por suas propriedades repelentes e inseticidas, e a ocorrência de vários compostos da classe dos limonóides (Itokawa *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996).

A ação biocida da azadirachtina, extraída, sobretudo das sementes, já é bastante conhecida e divulgada no meio rural, com eficiência para mais de 430 espécies de pragas (Martinez, 2002). Esta substância vem sendo testada no controle do mosquito da dengue (*Aedes aegypti*), e da aranha-marrom (gênero *Loxosceles*) por pesquisadores da UFPR, no qual o presente trabalho está inserido.

Os efeitos deste limonóide provocam diferentes reações nos insetos, inibindo a alimentação, retardando o crescimento; reduzindo a fecundidade, além de causar alterações morfogenéticas e comportamentais (Breuer *et al.*, 2003).

Em trabalhos mais recentes, são apresentados estudos sobre a interação de inseticidas microbianos e botânicos, enfatizando o uso de *Bacillus thuringiensis* e *M. azedarach* no manejo integrado de pragas. O uso de plantas inseticidas está sendo alvo de muitos estudos de toxicidade a insetos (Berlitz e Fiuza, 2005).

No entanto, existe uma grande variabilidade genética no cinamomo, que é propagado predominantemente por sementes, influenciando a produção de azadirachtina nas sementes. Plantas com sementes que apresentam concentrações desejáveis do princípio ativo podem ser multiplicadas pelas técnicas de propagação vegetativa, ocasionando uma estabilidade genética.

Sementes coletadas de árvores de várias regiões do Brasil estão sendo testadas em laboratórios quanto à concentração de azadirachtina. Desses lotes, algumas sementes previamente identificadas, estão sendo semeadas para a produção de mudas. Essas mudas, consideradas plantas-matrizes, doadoras de explantes para os trabalhos com micropropagação em laboratório, são mantidas em casa-de-vegetação. Com isso, e com um protocolo adequado para a sua propagação vegetativa, poderá ser mantido um banco de germoplasma amplo, em um curto espaço de tempo. De posse dos resultados das

concentrações consideradas ótimas do princípio ativo nas sementes, através de testes para sua comprovação, as plantas mantidas *in vitro* poderão ser identificadas, e clonadas para aumentar o número de indivíduos com essas características desejáveis.

O objetivo geral do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação para explantes oriundos de mudas de cinamomo (*Melia azedarach* L) para a possível formação de banco de germoplasma *in vitro*. Este protocolo definido irá servir também como modelo para a micropropagação de explantes obtidos de plantas adultas.

Para explantes coletados de plantas juvenis de *Melia azedarach* L.:

- Determinar uma metodologia para desinfestação e estabelecimento *in vitro* para a instalação de culturas assépticas;
- Testar concentrações de fitorreguladores para obtenção de novas brotações, e com isso determinar a melhor metodologia para a fase de multiplicação de microestacas;
- Testar diluições de meio básico de sais e fitorreguladores para obtenção de microestacas enraizadas, e com isso determinar a melhor metodologia para a fase de enraizamento;
- Avaliar o tempo de permanência em meio de enraizamento para a aclimatização e o substrato que proporciona melhor sobrevivência e crescimento das mesmas.

Para explantes coletados de plantas adultas de *Melia azedarach* L.:

- Determinar uma metodologia adequada às condições encontradas para coleta, pré-desinfestação, desinfestação e estabelecimento *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DE *Melia azedarach* L.

O cinamomo, *Melia azedarach* L., é uma árvore da família Meliaceae sendo conhecida pelos nomes populares de ‘Cinamomo-Gigante’, ‘Contas-de-Santa-Bárbara’ e ‘Lilás-de-Soldado’, no Brasil; ‘Paraíso’ na Argentina; ‘China-berry’, ‘Syringa berrytree’ ou ‘Persian lilac’ nos Estados Unidos. Foi introduzida no Brasil no século XIX.

De acordo com o sistema de Cronquist (1981), a taxonomia de *Melia azedarach* L. obedece à seguinte hierarquia:

- **Divisão** : Magnoliophyta (Angiospermas)
- **Classe** : Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
- **Ordem** : Sapindales
- **Família** : Meliaceae
- **Espécie**: *Melia azedarach* Linnaeus (Sp. Pl. 384. 1753).

Dentro da mesma espécie existem três variedades – a comum (Figura 17A), a sombrinha (Figura 17B) e a gigante – não muito claramente definidas e capazes de cruzar entre si. A forma gigante, às vezes denominada variedade ‘*Sempervirens*’, foi introduzida em 1946/1947 na Argentina, com sementes provenientes do Brasil. Esta se diferencia das demais por seu maior tamanho, dominância apical, retidão do tronco, folhas de coloração verde mais escura e frutos maiores, com maior número de lóculos. Sua folhagem persiste por quase todo o inverno e, por conseqüência, as plantas são mais sensíveis ao frio (Carvalho, 1999). Com a ascensão do cinamomo-gigante para a produção de madeira, prevê-se que as variedades sombrinha e comum de *Melia azedarach* ficarão restritas a usos específicos, como arborização.

Árvore caducifólia, e semidecidual, pouco longeva, com 10 a 20 metros de altura e 40 a 60 cm de DAP (diâmetro na altura do peito), atingindo até 40 metros de altura e 100 cm de DAP na idade adulta. Apresenta forma expandida irregular, de folhagem muito distribuída e desordenada. A casca varia de lisa a levemente fissurada nas árvores maiores, de coloração pardo-escura.

As folhas são alternas, compostas de 5 a 9 folíolos peciolados, opostos, ovais, ligeiramente dentados, de 2 a 5 cm de comprimento, (Figura 17C). As flores são pequenas, de 0,5 a 2 cm de comprimento, lilases quando em botão, com perfume muito agradável (Figura 17D).

Os frutos são drupáceos, carnosos, globosos, glabros, de 1,5 a 2 cm de diâmetro, de cor amarelo-escuro quando maduro (Figura 17E), dispostos em ráculos muito ornamentais, com caroço ósseo (Figura 17F) de 2 a 3 lóculos com até seis sementes (Figura 17G). As sementes são alongadas (Figura 17H).

Trata-se de uma planta polígama (Styles, 1972). Sua polinização é realizada por abelhas e diversos insetos pequenos. A floração ocorre de junho a outubro no Paraná, e de setembro a novembro no Rio Grande do Sul (Girardi, 1975). Os frutos e persistem na árvore depois da queda das folhas durante o inverno. O processo reprodutivo do cinamomo tem início a partir de um ano de idade. A dispersão de frutos e sementes é autocórica, principalmente por gravidade (barocórica).

2.1.1 Propagação da *Melia azedarach* L.

2.1.1.1 Propagação sexuada

Esta espécie se propaga predominantemente por sementes. Entretanto, este método conduz a uma grande variabilidade genética. Para grandes plantios de cinamomo gigante, onde o objetivo é a produção de madeira, assim como a extração da azadirachtina, a heterogeneidade entre indivíduos causa sérios inconvenientes, sobretudo, na rentabilidade da exploração.

A frutificação é intensa e anual. Os frutos devem ser coletados quando mudam a coloração, passando do verde para o amarelado.

Para plantio em viveiro, os frutos devem ser macerados na água para que seja retirada a sua parte carnosa. As sementes não apresentam dormência, e mantêm sua viabilidade por um ano em condições de ambiente não controlado e por até dois anos em câmara fria. Para acelerar a germinação e torná-la mais uniforme, as sementes são imersas em água por período de até 72 horas (Carvalho, 1999).

A semeadura pode ser feita diretamente nos recipientes, sacos de polietileno, bandejas de poliestireno expandido (isopor), ou tubetes de tamanho médio, devendo ser semeado apenas um fruto. A germinação é epígea, iniciando-se entre 25 a 41 dias após a semeadura. O poder germinativo varia de 65 a 80% (Carvalho, 1999). Ainda, segundo o mesmo autor, a repicagem, quando necessária, é feita a partir dos 15 dias após a germinação, quando a plântula emite as primeiras folhas definitivas. O tempo de permanência das mudas no viveiro varia de acordo com as regiões climáticas, sendo de seis meses nos trópicos a até doze meses nas regiões subtropicais.

2.1.1.2 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa do cinamomo é feita, em campo, por estaquia. Entretanto, segundo Carvalho (1999), a rebrota diminui ou causa problemas no colo da planta tornando-a menos resistente por ser facilmente atacada por fungos. Abedini *et al.* (1991) obtiveram 95% de estacas enraizadas de cinamomo (estacas com 40 cm de comprimento retiradas de rebrotes de árvores com 2 anos de idade e estacas com 30 cm de comprimento retiradas de árvores de 1 ano), em imersão lenta em 25 ppm de ANA.

Os métodos de enxertia por borbúlia e garfagem apresentaram 70 e 20% de êxito, respectivamente (Gurgel Filho, 1959).

Os principais relatos de cultivo *in vitro* de cinamomo são: cultura de segmentos nodais a partir de plantas adultas para produção de brotações axilares (Domecq, 1988), produção de clones a partir de explantes oriundos de plântulas (Sugatha e Chandran, 1997), produção de brotos e calos a partir de ápices e segmentos nodais de plântulas (Tharkur, Rao e Bapat, 1998), e a neo-formação de gemas florais em segmentos do hipocótilo (Sato e Esquibel, 1995; Handro e Floh, 2001).

Trabalhos correlatos realizados com a espécie pertencente à mesma família, *Azadirachta indica* A. Juss (neem), reportam a regeneração *in vitro* a partir de anteras e calos derivados de anteras (Gautam, Nanda e Grupta, 1993); sementes maduras e imaturas (Murthy e Saxenas, 1998); folhas e discos foliares (Ramesh e Padhya, 1990; Eeswara *et al.*, 1997; Wewetzer, 1997); gemas axilares e segmentos nodais axilares (Joshi e Thengane, 1996). Kearney (1993) afirmou que brotos de neem poderiam ser obtidos a partir de explantes foliares em meio suplementado com BAP. Salvi *et al.* (2001) utilizaram a combinação de 8,8 μM de BAP com 0,5 μM de AIA para a regeneração de explantes de plântulas, tais como: cotilédones, hipocótilo, epicótilo, gemas de nós radiculares e nó cotiledonar.

Taboada, Gulotta e López (1995) apresentaram resultados preliminares para cultivo *in vitro* de gemas axilares obtidas de planta adulta de *Melia azedarach*, variedade paraíso gigante. Vila, Rey e Mroginski (2004) obtiveram brotações de indivíduos adultos de cinamomo, a partir de segmentos uninodais.

Mais recentemente, Vila *et al.* (2005), obtiveram sucesso com a regeneração de plantas *in vitro* de *Melia azedarach* L. a partir de cultura de raízes oriundas de plântulas.

2.2 MICROPROPAGAÇÃO

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, pelo tamanho dos propágulos utilizados, consiste em cultivar assepticamente explantes em meio nutritivos contendo concentrações adequadas de fitorreguladores para indução de crescimento, proliferação e enraizamento.

2.2.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes

Plantas selecionadas como doadoras de explantes, ou plantas-matrizes, devem apresentar algumas características importantes, tais como representar com fidelidade a espécie ou cultivar em questão, serem vigorosas e não apresentar sintomas de doenças (George, 1993). O estado fisiológico da planta, de onde serão retirados os explantes, tem grande influência no posterior comportamento das culturas.

Em plantas arbóreas, florestais e frutíferas, a seleção de plantas elite é baseada nos espécimes mais velhos e comprovadamente sadios e produtivos. A propagação vegetativa convencional destas plantas torna-se mais difícil. O cultivo *in vitro* continuado pode restaurar a juvenilidade nestes genótipos facilitando a propagação clonal massal (Guerra, Nodari e Diola, 2005).

Murashige (1974) selecionou alguns fatores importantes que devem ser considerados na seleção dos explantes: o órgão utilizado como fonte de explantes, a sua idade fisiológica e ontogenética, a estação do ano no qual este é obtido, o tamanho do mesmo e a qualidade da planta matriz.

A retirada de explantes deve ser feita de preferência a partir de brotações novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, após o período de dormência, durante os meses mais quentes do ano (primavera e verão).

2.2.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas

As plantas que crescem em ambiente externo são contaminadas por organismos que se encontram principalmente nas suas superfícies. Estes microorganismos, particularmente bactérias e fungos, se não forem devidamente eliminados por processos de desinfestação, competem com o crescimento do material vegetal quando introduzido em cultivo *in vitro*.

Antes de iniciar uma cultura *in vitro* é necessária a utilização de desinfestantes químicos para remover os microorganismos. Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o álcool etílico (etOH), e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio (NaOCl) e de

cálcio (CaOCl_2). Algumas gotas de espalhante adesivo devem ser adicionadas às soluções a base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos vegetais. O Tween 20 é o mais recomendado em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v), segundo Grattapaglia e Machado (1998). O hipoclorito de sódio (NaOCl) é muito utilizado e a sua concentração pode variar entre 0,25 a 2% (v/v) dependendo do material vegetal e o período de exposição do tecido (George, 1993).

Tanto a concentração das soluções desinfestantes como os tempos de exposição dos explantes podem variar muito. Com isso, quanto maior a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e o tempo de exposição de maneira inversamente proporcional.

Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta. Na seleção destes, devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação (Grattapaglia e Machado, 1998). Ainda, segundo os mesmos autores, teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, porém, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência. Estes são encontrados em gemas caulinares apicais e axilares.

Torres *et al.* (1998) complementam que ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*. Eles possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas, sem passar pela fase de calo. Além disso, uma outra vantagem no uso deste tipo de explante é a garantia da manutenção da identidade genética do material regenerado, pois células dos meristemas mantêm mais uniformemente a sua estabilidade genética.

Normalmente haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética. Uma ampla fonte de tecidos, normalmente negligenciada, são as raízes, as quais possuem tecidos meristemáticos nos ápices, além do seu próprio periciclo. Mas o fato das raízes estarem em contato com o solo torna impraticável a sua desinfestação, sendo estas utilizadas somente a partir de plantas pré-estabelecidas *in vitro* (Peres, 2002).

Quando os explantes são de pequenas dimensões (cultivo de ápices caulinares), a multiplicação geralmente visa a eliminar viroses. O cultivo de ápices de maiores dimensões é empregado com o objetivo de multiplicação vegetativa quando a infecção por vírus não é

um problema importante (Margara¹, 1978, citado por George, 1993.). Com isso, a escolha do explante apropriado, constitui o primeiro passo para o estabelecimento *in vitro* dos cultivos.

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no início do cultivo. Apesar de não haver uma formulação padrão estabelecida, o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com suas modificações e diluições tem apresentado bons resultados para diversas espécies.

A adição de fitorreguladores, como citocininas, auxinas e giberelina (na forma de GA₃) têm o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados da planta matriz.

As concentrações de citocinina podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Das citocininas comercialmente disponíveis, 6-benzilaminopurina (BAP) é a que em geral apresenta melhores resultados. Meios com 0,01 a 4,44 µM de BAP têm sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas e lenhosas.

As auxinas podem ser necessárias para complementar o teor endógeno ou suprir as necessidades de meristemas isolados. Segundo Smith e Murashige (1970)², citados por Grattapaglia e Machado (1998), sugerem que as zonas de produção de auxina não são propriamente os meristemas, e sim, os primórdios foliares e as folhas em expansão. Entretanto, quantidades excessivas de auxina podem estimular a produção de calo, o que não é o objetivo nesta fase, salvo em casos de regeneração de tecidos não meristemáticos.

As giberelinas, na forma de ácido giberélico (GA₃) podem ser utilizados na ordem de décimos de miligrama por litro. Este fitorregulador pode ser útil no alongamento das partes aéreas.

2.2.3 Estágio 2: Multiplicação

A multiplicação *in vitro*, como o próprio nome sugere, tem como objetivo a obtenção do maior número de brotações possível, no menor espaço de tempo e com o mínimo de variação de explante para explante. Como esta etapa da micropropagação antecede o enraizamento das brotações formadas, torna-se determinante para o sucesso da próxima fase.

Explantes de algumas espécies lenhosas, especialmente árvores, apresentam hábito de crescimento monopodial natural e não ramificam suficientemente *in vitro* (George, 1993).

¹ MARGARA, J. Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture '*in vitro*'. **Compt. Rend. Seances Acad. Agric**, France, v.64, p. 654-661.

² SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal Botany**, v.57, p. 562-568, 1970.

Mantêm um caule único do qual são retirados segmentos nodais para iniciar novas subculturas (Grattapaglia, 1998). Trata-se de um sistema de fácil manipulação, porém, com taxas de multiplicação geralmente inferiores quando comparado ao sistema de subdivisão de tufo ou brotos múltiplos. Entretanto, com a cultura de nós, ou de segmentos nodais ocorre uma menor probabilidade na formação de calos e brotações adventícias, e, portanto, os riscos de haver indução de irregularidades genéticas após em subcultivos sucessivos são mínimos (George, 1993). Por esta razão, culturas de segmentos nodais são, cada vez mais recomendados para trabalhos de pesquisas como o provável método de micropropagação que menos induz à mutações.

Os meios básicos utilizados para esta fase também podem variar muito, sobretudo na formulação de macronutrientes. A fonte de nitrogênio e o balanço de íons nitrato e amônio são comumente mais estudados e modificados. Formulações especialmente para espécies lenhosas têm sido descritas, tais como o QL (Quoirin e Lepoivre, 1977) e WPM (Lloyd e McCown, 1980).

As citocininas são fundamentais para a quebra da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares, sendo que o tipo e a concentração adequada para cada espécie, e até, para a mesma cultivar dentro da mesma espécie, são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

As concentrações de citocininas para multiplicação estão entre 0,1 a 5 mg.L⁻¹ (George, 1993).

O carvão ativado (CA) adicionado ao meio de cultura é empregado para: adsorver substâncias secretadas pelos explantes, ou ainda, compostos presentes no ágar que de alguma forma poderiam inibir o crescimento vegetal; impedir o crescimento indesejado de calos; promover a morfogênese, sobretudo a embriogênese e promover a formação de raízes (onde o efeito parece ser devido a sua propriedade de excluir suficientemente a luz do meio e promover reação fisiológica que ocorre no escuro).

Há evidências de que o carvão ativado (CA) adsorve os fitorreguladores, sobretudo as auxinas presentes no meio de cultura. De acordo com Nissen e Sutter (1988; 1990), quando o CA é adicionado ao meio de cultura MS, na concentração de 0,1% (m/v), este pode, efetivamente adsorver 10 µM AIA e 10 µM AIB. Estes autores recomendam que, ao utilizar grandes concentrações de CA no meio de cultura, as quantidades de auxinas devem ser adicionadas na ordem de 10 a 100 vezes mais.

Porém, não só as auxinas podem ser adsorvidas pelo carvão ativado: citocininas e o ácido abscísico também podem ser inviabilizados. Maene e Debergh (1985) constataram que 0,3% (m/v) de CA no meio pode adsorver 22,2 µM BAP; Takayama e Misawa (1980) ao utilizar 0,5% (m/v) de CA, verificaram uma adsorção de 44,4 µM BAP.

2.2.4 Estágio 3: Enraizamento

Uma das limitações da micropropagação das espécies lenhosas é a fase de enraizamento *in vitro*. Para muitas espécies, principalmente as plantas herbáceas, essa fase não mostra grandes problemas.

De acordo com Taiz e Zeiger (1998), os fitorreguladores, auxinas, são as substâncias que influenciam na formação de primórdios radiciais.

O enraizamento de microestacas é considerado, por vários autores, um dos estádios mais críticos do processo de propagação massal de plantas perenes (Wang, 1999), pois depende do genótipo e de sua condição fisiológica no momento da indução ao enraizamento (Martins e Pedrotti, 2001).

Segundo Hartmann *et al.* (1997), a emissão de raízes por uma microestaca pode ser dividida em três fases, que compreendem a desdiferenciação celular, a indução e a organização dos primórdios radiciais.

Em protocolos estabelecidos para a micropropagação de muitas espécies, sobretudo as lenhosas, o enraizamento é induzido *in vitro* com a utilização de meio de cultura contendo uma auxina (Deklerk *et al.*, 1997). Para a maioria das espécies a auxina é necessária na fase de indução das raízes, enquanto que na fase de diferenciação dos primórdios e no crescimento das raízes, a presença de auxinas no meio de cultura pode inibir o processo (Deklerk, 1995). Vila *et al.* (2002), concordam com este argumento, quando definiram como protocolo para enraizamento de *Melia azedarach* L. duas fases distintas: a primeira, com a indução das raízes em microestacas, utilizando MS com 12,3 μM de AIB durante 4 dias e a segunda, com a subsequente transferência das microestacas para MS sem fitorregulador pelos 26 dias restantes.

Thakur, Rao e Bapat (1998), não encontraram esta dificuldade para o enraizamento de *Melia azedarach* L. tendo em vista que estabeleceram um protocolo mantendo as microestacas durante 30 dias em meio MS/2 suplementado com 4,92 μM de AIB.

A reversão da fase adulta à fase juvenil é denominada rejuvenescimento. O rejuvenescimento, naturalmente, ocorre durante a reprodução sexuada e na apomixia. Durante a propagação vegetativa o rejuvenescimento também pode ocorrer e tem sido alcançado de várias maneiras: (1) poda drástica, (2) aplicações de citocininas, (3) propagação seriada via enxertia, (4) propagação seriada via estaquia e (5) micropropagação.

A propagação vegetativa de árvores adultas requer material fisiologicamente juvenil (gemas epicórmicas basais) ou com rejuvenescimento da habilidade de formar raízes em material adulto (Hartney, 1980). As árvores adultas necessitam de técnicas especiais de

reverter a juvenilidade para resgatar condições favoráveis para enraizamento e crescimento *in vitro*.

Diversas práticas têm sido adotadas para obter brotações juvenis ou promover o rejuvenescimento de tecidos adultos, podendo ser realizadas tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro*. Uma das práticas de rejuvenescimento utilizadas em plantas lenhosas tem sido a micropropagação por subcultivos sucessivos *in vitro* em meio de cultura contendo citocinina (Grattapaglia e Machado, 1998). A restauração de características juvenis, como o maior potencial de enraizamento, tem sido observada em *Eucalyptus* com o aumento do número de subcultivos (Assis, 1996). Ramos obtidos na copa de árvores adultas não enraízam inicialmente, mas depois de vários subcultivos, o rejuvenescimento ocorreu com relação à sua capacidade de enraizamento.

Villa, Rey e Mroginski (2004) trabalhando com *Melia azedarach* L. obtiveram sucesso com o estabelecimento *in vitro* de segmentos uninodais retirados de ramos de plantas com mais de 20 anos de idade, mantidas com porte baixo mediante podas drásticas freqüentes.

2.2.5 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de microestacas enraizadas

Uma das etapas mais importantes da micropropagação é a aclimatização. As plantas micropropagadas, que antes desta fase cresciam sob condições totalmente controladas, passam para condições naturais e, por ser uma mudança brusca, isto deve ocorrer paulatinamente, pois as plantas não estão adaptadas ao novo ambiente.

Devido às características peculiares de plantas propagadas *in vitro*, a transferência direta para as condições de campo ocasiona grande percentual de perdas. Assim, é necessária uma fase intermediária entre o laboratório e a área de cultivo, denominada aclimatização e em geral é realizada em casa-de-vegetação (Preece e Sutter, 1991). Esta passagem é crítica e representa em alguns casos, um fator limitante do processo.

Apesar de inúmeras variáveis interferirem na aclimatização de plantas micropropagadas, duas delas merecem uma atenção especial: o tipo e a qualidade da microestaca enraizada e o material ou mistura de materiais utilizados como substratos.

a) Tipo e qualidade das microestacas enraizadas

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), raízes curtas, em geral, são mais desejáveis, pois além de facilitarem a lavagem, a retirada do meio de cultura aderido, e a introdução da planta no substrato, normalmente estão numa fase de crescimento ativo, o

que aumenta a sobrevivência e evita o enovelamento. Por esta razão, várias pesquisas são realizadas com o objetivo de definir qual o melhor tempo de permanência das microestacas em contato com o meio de enraizamento para garantir as maiores porcentagens de sobrevivência na aclimatização.

Ribas e Zanette (1992) concluíram que as brotações de macieira, cv. Gala devem permanecer no meio de indução de enraizamento durante 6 dias, sendo que, após este período, as mudas podem ser transplantadas diretamente para o substrato sem haver necessidade de permanecerem no meio de desenvolvimento das raízes.

Para Pereira e Fortes (2001), a aclimatização do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido pode ser feita após 12 dias de permanência das brotações em meio de cultura de enraizamento com sobrevivência superior a 90% das plantas, verificado o período do ano, embora estas apresentem menor vigor (massa seca das raízes e parte aérea) até 30 dias de aclimatização, quando comparadas com plantas originadas de brotações que permaneceram maior período de tempo em meio de cultura de enraizamento. Já Souza (2004), concluiu que a permanência de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' no meio de enraizamento até o completo desenvolvimento das raízes (30 dias) promoveu melhor crescimento das plantas após o transplante, do que aquelas que permaneceram apenas para a indução da rizogênese (10 dias).

Em contrapartida, o transplante de mudas com uma parte aérea muito grande, resultado de uma permanência excessiva em meio de cultura, tende a apresentar problemas de sobrevivência. Isso normalmente ocorre porque, sob condições *in vitro*, as plantas crescem em um ambiente de alta umidade do ar, com redução das trocas gasosas, baixa intensidade luminosa e fornecimento de sacarose como fonte de energia. As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentrações de CO₂ e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento (Caldas, Harridasan e Ferreira, 1998). Quando transferidas para casa-de-vegetação, as plantas passam a ser autotróficas, sendo que os carboidratos devem ser produzidos por meio da fotossíntese. Quando submetidas às novas condições ambientais, as mudas apresentam altas taxas de transpiração, em função da condutividade hidráulica de suas folhas, provocando um déficit hídrico elevado, podendo ocorrer a sua morte (Pierik, 1987).

Algumas práticas já consagradas são usadas para diminuir este impacto entre os ambientes: de *in vitro* para *ex vitro*. Dentre elas, uma pré-adaptação à condição autotrófica na planta *in vitro* pode ser estimulada com a redução ou até com a eliminação da fonte de

açúcar no meio de enraizamento, ainda, com o aumento da concentração de CO₂ e da intensidade luminosa no ambiente de incubação, dando condições da planta realizar a fotossíntese (Grattapaglia e Machado, 1999).

b) Substratos

A seleção do substrato é de fundamental importância no crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente no sucesso da aclimatização. É o substrato que, de acordo com suas propriedades, pode facilitar ou impedir o enraizamento e crescimento das plantas.

Entende-se como substrato para plantas o meio onde se desenvolvem as raízes das plantas cultivadas fora do solo. Serve de suporte às plantas, podendo ainda regular a disponibilidade de nutrientes para as raízes. Pode ser formado de solo mineral ou orgânico, de um só ou de vários materiais em mistura (Kämpf, 2000).

Na aclimatização de plantas, em casa-de-vegetação, o substrato é condicionado em vasos, sacos plásticos, bandejas, e, apesar das restrições do espaço ocupado, a planta deve encontrar condições satisfatórias para seu crescimento e desenvolvimento. Para isso, as características consideradas essenciais para o substrato são: economia hídrica; aeração; permeabilidade; poder de tamponamento para valor de pH; capacidade de retenção de nutrientes; alta estabilidade e estrutura (para evitar compactação); alto teor de fibras resistentes à decomposição (para evitar a compostagem no vaso), e estar livre de agentes causadores de doenças, pragas e propágulos de plantas daninhas (Kämpf, 2000). Ainda, segundo a autora, dificilmente se encontra um só material com todas essas características para uso como substrato. O condicionador de substratos é um componente que irá melhorar, de modo significativo, as propriedades do meio de cultivo.

Os diversos substratos existentes constituem-se de formas comerciais de pronto uso os quais podem ser acrescidos de vários materiais como, casca de arroz carbonizada, vermiculita, terra de barranco, húmus e outros (Faquim e Vilela 1996).

O Plantmax[®] é um substrato comercial muito utilizado para a produção de mudas. Trata-se de um produto compostado e estabilizado com cascas processadas e enriquecidas, vermiculita expandida e turfa, que garantem qualidade, homogeneidade e alto controle de sanidade. Possui em torno de 33% de matéria orgânica, 79% de porosidade total, que fornece boa capacidade de retenção de água e aeração (Mendonça *et al.*, 2003).

Atualmente, a casca de arroz carbonizada é utilizada, praticamente, em quase todas as misturas de substrato, tendo em vista o seu baixo custo e a facilidade de aquisição.

Obtida pela carbonização da casca de arroz, é normalmente submetida à incineração por fogo brando. Trata-se de um processo simples, porém lento.

A casca de arroz carbonizada (CAC) é um material de baixa densidade, baixa capacidade de retenção de água e baixa capacidade de troca catiônica (CTC), sendo, entretanto, superior à CTC da areia (Rodrigues *et al.*, 2003). Oferece boa aeração, drenagem rápida e eficiente, e um pH em torno da neutralidade. É rico em minerais, principalmente Ca, K e Si (Minami, 1995 e Kämpf, 2000). Tem baixa densidade e peso específico, além de lenta biodegradação, permanecendo em sua forma original por longos períodos de tempo. Apresentam um alto poder energético, já que contêm quase 80% de sua massa em carbono. Suas cinzas são compostas basicamente de sílica e, portanto, bastante alcalinas. Este material pode ser utilizado como condicionador em misturas com materiais de maior retenção de água, pois possui alto espaço de aeração e porosidade total, melhorando as relações de volume ar/água. Segundo Minami (1995), possui forma floculada, é leve, de fácil manuseio, livre de nematóides e patógenos devido ao processo de carbonização. Segundo Kämpf (2000), possui espaço de aeração superior a 42% e porosidade total acima de 80%, características ideais para substratos utilizados em recipientes com pequeno volume.

Klein *et al.* (2002), avaliando as alterações nas propriedades físico-hídricas de substratos comerciais, com a mistura de casca de arroz carbonizada em diferentes proporções, concluíram que a casca de arroz pode ser utilizada para otimizar as propriedades físico-hídricas de substratos hortícolas, melhorando a disponibilidade de água às plantas e a porosidade de aeração.

A seleção do substrato ou dos produtos que o compõem, ocorre principalmente em função de sua disponibilidade e propriedades físicas, uma vez que são utilizados substratos com baixos níveis de nutrientes (Gomes *et al.*, 1985). Para Hoffman *et al.* (1994), a facilidade de obtenção dos componentes de baixo custo também deve ser considerada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL E DATA DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Todos os experimentos e testes preliminares referentes ao presente trabalho foram realizados no laboratório de Micropropagação de Plantas e casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no período de dezembro de 2003 a maio de 2006.

3.2 PLANTAS JUVENIS

3.2.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes

3.2.1.1 Origem do material vegetal

O material vegetal utilizado foi proveniente da empresa de sementes Rio do Pinho, do Distrito do Rio do Pinho, município de Canoinhas, SC, que cedeu, em dezembro de 2003, 50 mudas de cinamomo, com 7 meses de idade, produzidas por sementes coletadas de árvores com idade superior a 15 anos (Figura 18A).

3.2.1.2 Pré-desinfestação das mudas

As mudas foram transplantadas para vasos plásticos (com 120 mm de diâmetro e 100 mm de altura, com volume de 684 cm³) contendo Plantmax HT[®] (50%) e vermiculita de textura média (50%) e mantidas em casa-de-vegetação. Os vasos foram levados para irrigação intermitente, onde permaneceram por 15 dias. Após este período, as mudas foram transferidas para a parte da casa-de-vegetação com irrigação manual (Figura 18B). Nesta etapa, foram feitas aplicações quinzenais com o fungicida sistêmico tiofanato metílico – Cercobin 700PM[®] (0,7 g L⁻¹) intercaladas às aplicações com fertilizante foliar mineral Biofert[®] (5 mg L⁻¹).

3.2.1.3 Coleta dos explantes

A coleta das brotações foi feita utilizando-se uma tesoura de poda (devidamente desinfestada com etOH 70% no intervalo de coleta do material de uma muda para outra), com o corte dos segmentos apicais com 15 cm a 20 cm de comprimento, contendo, em média, 12 gemas por segmento. Estes segmentos foram imediatamente acondicionados em frascos contendo água, identificados segundo a numeração dos vasos em casa-de-vegetação.

Os segmentos apicais coletados foram levados para o laboratório, onde, após a total eliminação das folhas na altura do pecíolo foram fracionados em segmentos nodais com 10 mm de comprimento, contendo uma gema (Figura 18D). Estes foram transferidos para frascos contendo água deionizada e levados à câmara de fluxo laminar, onde se iniciou a desinfestação.

3.2.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas

3.2.2.1 Desinfestação dos explantes

Os segmentos nodais com 10 mm (Figura 18E) foram submetidos aos tratamentos para desinfestação superficial, combinando o uso de etOH 70% (v/v) durante 30 segundos, seguido de NaOCl na concentração de 0,5% (v/v), com a adição de Tween 20 a 0,1% (v/v), durante 10 minutos, sob constante agitação. Após o tratamento, os segmentos foram submetidos à três lavagens com água deionizada esterilizada.

3.2.2.2 Estabelecimento dos explantes em meio de cultura asséptico

O meio de cultura testado para o estabelecimento *in vitro* foi o meio básico de sais (macronutrientes e micronutrientes) de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com vitaminas e aminoácido de MS (0,1 mg.L⁻¹ de tiamina, 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina, 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mg.L⁻¹ de glicina), 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, e 4,44µM BAP, 0,30 µM de ácido giberélico (GA₃) e 0,05 µM de ácido alfa-naftalenoacético (ANA). O pH foi ajustado para 5,8 antes de adicionar o agente geleificante, o ágar bacteriológico Himedia® na concentração de 6 g.L⁻¹. Após o preparo, o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, em um volume de 10 mL para cada tubo, que foram fechados com tampas de polipropileno, seguindo-se autoclavagem durante 20

minutos a 1,5 atm de pressão e temperatura de 121 °C. Os tubos contendo meio de cultura foram inclinados após autoclavagem, para que após geleificados, aumentassem a sua área superficial.

Os segmentos uninodais (segmentos formados por um único nó) foram preparados para isolamento em meio de cultura, padronizados com 5 mm de comprimento (Figura 18F), cortando-se uma pequena porção das extremidades.

Imediatamente após o isolamento dos explantes (Figura 18G), estes permaneceram em sala de crescimento, no escuro, por um período de cinco dias, visando a diminuir a oxidação causada pela liberação de compostos fenólicos no meio de cultura. Uma outra providência tomada para esta mesma finalidade foi, no dia seguinte ao isolamento, mudar os explantes de lugar no meio de cultura, no mesmo tubo de ensaio. Após este período de escuro, os explantes foram transferidos para prateleiras contendo placas de isopor revestidas por plástico transparente. As condições ambientais da sala de crescimento eram as seguintes: intensidade luminosa de 24 $\mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 16 horas, temperatura média de 26 °C, e umidade relativa de 42%.

Semanalmente avaliou-se a porcentagem de contaminação fúngica, bacteriana e a porcentagem de explantes oxidados. Aos 30 dias de cultivo, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e estabelecimento dos explantes. A sobrevivência foi indicada pelo desenvolvimento da gema do segmento nodal.

Enquanto os explantes se desenvolviam na sala de crescimento, isolamentos foram feitos provenientes de novas brotações das mudas matrizes (Figura 18). Estas continuaram a receber pulverizações quinzenais intercaladas de Biofert® e tiofanato metílico. Este procedimento foi realizado até o início de maio, quando as plantas começaram a entrar em período de dormência.

3.2.3 Estágio 2: Multiplicação

3.2.3.1 Origem do material vegetal

O material vegetal utilizado foi proveniente do estabelecimento *in vitro* de segmentos uninodais isolados assepticamente de mudas mantidas em casa-de-vegetação. Estes segmentos permaneceram em meio básico de sais, vitaminas e aminoácido de MS, suplementado com fitorreguladores (4,4 μM BAP; 0,3 μM GA₃ e 0,05 μM ANA) em sala de crescimento por 45 dias desde o seu isolamento.

3.2.3.2 Avaliações preliminares

Os ensaios preliminares não têm compromisso com a demonstração de dados comprovados estatisticamente, mas são importantes ferramentas para a determinação de alguns aspectos relevantes para, enfim, proceder-se a instalação de um experimento formal. Neste caso, foram realizados quatro testes preliminares com o objetivo de adequar: o tipo de fitorregulador para esta fase, com duas concentrações consideradas dentro de uma faixa usual; a composição de sais de e meios básicos de macro e micronutrientes, além de avaliar o efeito do carvão ativado adicionado ao meio de cultura, e, por último, verificar a melhor orientação da microestaca no meio de cultura (vertical ou horizontal).

- Ensaio preliminar de multiplicação de segmentos uninodais em meio MS, onde foram testados 3 tipos de citocininas: BAP, 2-iP e KIN, nas concentrações: 1,1 e 2,2 μM (BAP); 1,23 e 2,46 μM (2-iP) e 1,16 e 2,32 μM (KIN).
- Ensaio preliminar de multiplicação onde foram testados meios de cultura com 3 composições básicas de sais (MS, QL e WPM), suplementados com 1,1 e 2,2 μM de BAP.
- Ensaio preliminar onde foi observado o efeito do carvão ativado adicionado ao meio de multiplicação: MS+1,1 μM BAP, na formação de calos na base das brotações.

Os ensaios foram avaliados durante o cultivo inicial (primeiro subcultivo) e em dois subcultivos subseqüentes.

3.2.3.3 Experimento: Efeito de 9 concentrações de BAP suplementadas ao meio básico de sais MS na multiplicação *in vitro* de 2 tipos de microestacas de *Melia azedarach* L.

Os explantes (segmentos nodais) estabelecidos em meio MS, e, portanto provenientes do cultivo inicial foram preparados e padronizados com 5 mm de comprimento (Figura 12A) em dois tipos de microestacas: apicais e axilares, e submetidas aos tratamentos com 9 concentrações de BAP.

a) Fator A: Tipo de microestacas

T1 – apicais

T2 – axilares

b) Fator B: Concentrações de BAP

T1 – 0 μ M BAP

T2 – 0,55 μ M BAP

T3 – 1,11 μ M BAP

T4 – 1,66 μ M BAP

T5 – 2,22 μ M BAP

T6 – 2,77 μ M BAP

T7 – 3,33 μ M BAP

T8 – 3,66 μ M BAP

T9 – 4,44 μ M BAP

Os tratamentos representam o arranjo fatorial de 9 concentrações do fitorregulador BAP e 2 tipos de microestacas. Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada repetição representada por 10 unidades experimentais.

O meio básico de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácido utilizado para a multiplicação *in vitro* das microestacas foi o MS, suplementado com as 9 concentrações de BAP, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar o agente geleificante, o ágar bacteriológico Himedia® na concentração de 6g.L⁻¹. Os meios de cultura correspondentes aos tratamentos foram distribuídos em frascos de vidro (com diâmetro de 35 mm e altura de 70 mm, com capacidade total para 60 mL), num total de 10 mL para cada frasco, que foram fechados com papel alumínio, seguindo-se autoclavagem durante 20 minutos a 1,5 atm de pressão e temperatura de 121 °C.

Após a transferência das microestacas para os meios, os frascos foram levados para a sala de crescimento, onde permaneceram durante 30 dias, sob as seguintes condições ambientais: intensidade luminosa de 24 μ Mol.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C, e umidade relativa de 40%.

A avaliação da sobrevivência; número de brotações formadas, gemas e folhas; incremento na altura e formação de calos na base das microestacas microestacas foi realizada após 30 dias.

O experimento foi repetido para segundo e terceiro subcultivos subseqüentes.

3.2.4 Estágio 3: Enraizamento

3.2.4.1 Origem do material vegetal

Microestacas mantidas *in vitro* em sala de crescimento, provenientes do terceiro subcultivo, estabelecidas em meio de cultura de multiplicação MS+1,66 μ M de BAP durante 30 dias, foram repicadas para o experimento de enraizamento.

O padrão para as microestacas ficou definido em avaliações preliminares, com comprimento de 15 mm a partir do ápice para a base e retirada total das folhas (Figura 19C).

3.2.4.2 Experimento: Efeito de 3 diluições de sais de MS suplementadas com 5 concentrações de AIB no enraizamento de microestacas de *Melia azedarach* L.

Os tratamentos para enraizamento foram combinados em 3 diluições de macronutrientes e micronutrientes do meio básico de sais MS, MS reduzido à metade (MS/2) e MS reduzido a 1/3 (MS/3), com 5 concentrações da auxina AIB (0; 2,46; 4,92; 7,38 e 9,84 μ M).

a) Fator A: Diluições de MS

T1 – MS

T2 – MS/2

T3 – MS/3

b) Fator B: Concentrações de AIB

T1 – 0,00 μ M AIB

T2 – 2,46 μ M AIB

T3 – 4,92 μ M AIB

T4 – 7,38 μ M AIB

T5 – 9,84 μ M AIB

Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de vidro (com diâmetro de 35 mm e altura de 70 mm, com capacidade total para 60 mL), num total de 10 mL para cada frasco,

que foram fechados com papel alumínio, seguindo-se autoclavagem durante 20 minutos a 1,5 atm de pressão e temperatura de 121 °C.

Os tratamentos representam o arranjo fatorial de 5 concentrações do fitorregulador AIB e 3 diluições de sais de MS. Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada unidade experimental representada por 10 microestacas.

Após a repicagem, os frascos foram mantidos em sala de crescimento, onde permaneceram por 30 dias, sob as seguintes condições: temperatura de 25±2 °C, umidade relativa média de 40 %, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 24 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Após este período, as microestacas foram avaliadas quanto à porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes primárias formadas; incremento na altura do caule; número de folhas.

3.2.5 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de microestacas enraizadas

3.2.5.1 Origem do material vegetal

O material vegetal utilizado consistiu de microestacas enraizadas *in vitro* em meio de cultura MS/2, ou seja, com a composição de sais de micronutrientes e macronutrientes de MS reduzidos à metade, suplementado com vitaminas e aminoácido de MS, 4,92 μM de AIB, 30 g.L^{-1} de sacarose e 100 mg.L^{-1} de mio-inositol.

As microestacas foram preparadas e padronizadas com a eliminação das folhas e mantendo-se cada broto com 15 mm de comprimento, a partir do ápice.

As repicagens para enraizamento foram realizadas em duas fases, tendo em vista que o experimento teve como objetivo, testar, além do efeito dos 3 diferentes tipos de substratos na aclimatização, avaliar dois tipos de microestacas enraizadas em tempo de permanência diferentes no meio de cultura de: 10 (Figura 19A) e 21 dias (Figura 19B). Desta forma, as repicagens para meio de enraizamento foram feitas em 21 de novembro e 2 de dezembro de 2005. Após o período de incubação, as microestacas enraizadas foram avaliadas quanto à massa fresca, número e comprimento médio das raízes primárias, altura do caule, número de primórdios radiciais, número de gemas, número de folhas e presença ou ausência de calos, antes da instalação do experimento.

3.2.5.2 Experimento1: Efeito de 3 substratos, na primeira fase de aclimatização de microestacas enraizadas *in vitro* de *Melia azedarach*, L. com 10 e 21 dias, sob sistema de irrigação intermitente.

- Fator A: 2 Tipo de Microestacas

T1 – Microestacas enraizadas com 10 dias

T2 – Microestacas enraizadas com 21 dias

- Fator B: 3 Tipos de Substratos

T1 – Plantmax HT[®] 100%

T2 – Plantmax HT[®] 50% + CAC 50%

T3 – CAC 100%

Logo após a sua avaliação, as microestacas enraizadas foram transplantadas para os 3 tipos de substratos, em bandejas de polipropileno expandido (isopor) com 128 células. Cada célula corresponde a um volume de 28,3 cm³. Foram utilizadas um total de 360 microestacas, (180 enraizadas em 21 dias e 180 enraizadas em 10 dias), distribuídas em 3 repetições com 20 microestacas, para cada tipo de substrato.

Utilizou-se, para este experimento, 6 bandejas. Cada bandeja teve 60 células preenchidas correspondendo a 1 repetição contendo 20 microestacas para cada substrato.

O transplante das microestacas enraizadas foi realizado em casa-de-vegetação climatizada, e tão logo as bandejas eram identificadas, foram transferidas para local com sistema de irrigação intermitente, sob cronograma previamente estabelecido (Quadro 1), onde permaneceram por um período de 20 dias.

A temperatura e a umidade relativa do ar neste período de 20 dias foram anotadas diariamente (com 3 repetições: 8:00 horas, 12:00 horas e 18:00 horas) com auxílio de um termohigrômetro e as médias obtidas foram: 27,4 °C para temperatura e 95,3% de umidade relativa do ar.

QUADRO 1 – Cronograma de irrigação automática intermitente em casa-de-vegetação.

TURNO	HORÁRIO	INTERVALO	REGA
1	08:00 – 17:00	30 minutos	15 segundos
2	17:00 – 23:00	60 minutos	15 segundos
3	23:00 – 08:00	180 minutos	15 segundos

Após os 20 dias sob irrigação intermitente, no dia 02 de janeiro de 2006, as microestacas foram retiradas das bandejas, e com as raízes nuas foram avaliadas quanto: a massa fresca total (g), número de raízes primárias, comprimento médio das raízes (cm), altura do caule (cm), número de gemas, número de folhas e classe de desenvolvimento de raízes (foram atribuídas notas de 1 a 4, sendo 1 correspondente ao menor desenvolvimento e 4 ao maior desenvolvimento (Figura 1).

Com os resultados das avaliações realizada no momento do transplântio, em 12 de dezembro de 2005, e de posse dos resultados das avaliações após os 20 dias de aclimatização, ou seja, em 02 de janeiro de 2006, foi possível obter os incrementos para as variáveis avaliadas, com exceção da nota de desenvolvimento de raízes.



FIGURA 1 – Critério de avaliação para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de cinamomo (*Melisa azedarach* L.) sob o efeito de três substratos, após permanência de 20 dias em casa-de-vegetação, sob irrigação intermitente. Foram definidas quatro notas (1 a 4) em ordem crescente de desenvolvimento.

Os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo cada repetição representada por 20 microestacas enraizadas. Os tratamentos representam três tipos de substratos (Plantmax HT[®] 100%; Plantmax HT[®] 50% + CAC 50% e CAC 50%) com 2 tipos de microestacas provenientes de sala de crescimento, onde permaneceram em meio de enraizamento durante 10 e 21 dias.

3.2.5.3 Experimento 2: Efeito de 3 substratos, na segunda fase de aclimatização ou rustificação de microestacas enraizadas de *Melia azedarach* L., em embalagens de polietileno e com irrigação manual.

Após as avaliações do primeiro experimento, as microestacas enraizadas foram transplantadas para embalagens de polietileno com volume de 400 cm³ (Figura 20A) contendo os mesmos 3 tipos de substratos do experimento anterior. Foram utilizadas um total de 180 plantas, sendo 3 repetições com 20 plantas, por tratamento, que ficaram assim distribuídos:

T1 – Plantmax HT[®] 100%

T2 – Plantmax HT[®] 50% + CAC 50%

T3 – CAC 100%

TABELA 1 – Análise química dos substratos – 1) Plantmax HT[®] (100%); 2) Plantmax HT[®] (50%) + CAC (50%) e 3) CAC (100%).

Substrato	pH	H	Ca ⁺²	Ca ⁺²	K ⁺	T	P mg/dm ³	C g/dm ³	pH SMP	V %
	CaCl ₂	+ Al ⁺³	+ Mg ⁺²	(cmolc/dm ³)						
1	5,1	4,6	19,85	13,10	1,65	26,10	620,8	123,5	6,10	82,38
2	5,5	3,5	11,62	7,55	1,09	16,21	451,2	55,8	6,40	78,41
3	5,7	2,5	1,51	0,73	0,57	4,58	252,8	12,4	6,90	45,41

A quantidade de Al⁺³ foi igual a zero para os substratos analisados.

TABELA 2 – Determinação rápida das propriedades físicas dos substratos, segundo metodologia de Fretz *et al.*, 1979.

Tratamentos	D (g.L ⁻¹)	EPT (%)	ARCC (%)	EACC (%)
Plantmax HT [®] (100%)	496,4	47,60	25,67	21,93
Plantmax HT [®] (50%)+CAC(50%)	344,3	59,05	43,41	15,64
CAC 100%	246,3	66,66	56,69	9,97

D= densidade seca; EPT= espaço poroso total; ARCC= água retida na capacidade de campo; EACC= espaço de ar na capacidade de campo.

As embalagens de polietileno após o transplante das microestacas enraizadas, foram colocadas em uma caixa plástica (Figura 20B) e transferidas para irrigação intermitente em virtude das microestacas enraizadas estarem com as raízes nuas. Ali permaneceram por um período de 10 dias, para, após este período, serem, mantidas sob

irrigação manual, por um período de 30 dias, onde foram irrigadas numa frequência de 4 vezes ao dia.

As temperaturas e a umidades relativas do ar neste período de 20 dias foram anotadas diariamente (com 3 repetições: 8:00 horas, 12:00 horas e 18:00 horas) com auxílio de um termohigrômetro, sendo que no período de 20 dias em que as microestacas enraizadas permaneceram sob irrigação manual, onde as médias obtidas foram: 43 °C para temperatura e 52% de umidade relativa do ar.

Após 40 dias, mantidas em casa-de-vegetação sendo, 10 sob irrigação intermitente e 30 com irrigação manual, no dia 10 de fevereiro de 2006, as microestacas enraizadas foram submetidas à avaliação quanto: à massa fresca total (g), número de raízes primárias, comprimento médio das raízes (cm), altura da parte aérea (cm), número de gemas, número de folhas e classe de desenvolvimento de raízes (foram atribuídas notas de 1 a 4, sendo 1 correspondente ao menor desenvolvimento e 4 ao maior desenvolvimento (Figura 2).

Com os resultados das avaliações realizadas no momento do transplântio para este experimento, em 02 de janeiro de 2006, e de posse dos resultados das avaliações em 10 de fevereiro de 2006, foi possível obter os incrementos para as variáveis, com exceção da nota para desenvolvimento radicial.



FIGURA 2 – Critério de avaliação para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de Cinamomo (*Melia azedarach* L.) após permanência de 10 dias sob irrigação intermitente e 30 dias sob irrigação manual. Foram definidas 4 notas (1 a 4), em ordem crescente de desenvolvimento.

Os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo cada repetição representada por 20 mudas. Os tratamentos representam três tipos de substratos (Plantmax HT[®] 100%; Plantmax HT[®] 50% + CAC 50% e CAC 50%) com microestacas provenientes de sala de crescimento, onde permaneceram em meio de enraizamento durante 21 dias.

3.3 PLANTAS ADULTAS

3.3.1 Estágio 0: Seleção e preparo de plantas matrizes

3.3.1.1 Origem do material vegetal

O material vegetal utilizado foi proveniente de uma árvore de cinamomo (*Melia azedarach* L.), selecionada para este projeto, com idade superior a de 15 anos, e aproximadamente 6 m de altura, localizada no Campus do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, município de Curitiba, PR (Figura 10A). Os procedimentos com esta árvore matriz foram iniciados em julho de 2004, com podas para renovação das brotações.

3.3.2 Estágio 1: Estabelecimento de culturas assépticas

3.3.2.1 Coleta e pré-desinfestação dos segmentos apicais.

Segmentos apicais, formados a partir de brotações novas de ramos da estação, com 7 a 10 mm de diâmetro e 150 a 200 mm de comprimento (Figura 21B), contendo aproximadamente 50 mm de ramo da estação anterior, foram coletados do caule da árvore adulta no início de agosto de 2005. Para a coleta, foi necessária a utilização de caminhão equipado com plataforma elevatória, gentilmente cedida pela COPEL, Companhia Paranaense de Energia Elétrica.

Os segmentos apicais coletados foram levados para o laboratório, onde, após a eliminação das folhas na altura do pecíolo, foram escovados com detergente (Figura 21C). Uma atenção especial foi dada à cunha formada pela gema axilar e o caule onde se deposita uma grande quantidade de partículas contaminantes. Depois de escovados, foram enxaguados em água corrente. Em seguida, iniciou-se uma pré-desinfestação, mantendo a porção do ramo do ano anterior em uma solução do fungicida sistêmico tiofanato metílico –

Cercobin 700 PM[®] a 0,7 g.L⁻¹ durante 24 horas, seguida de imersão em solução de NaOCl a 1% (v/v) durante as próximas 12 horas (Figura 21D). Esta combinação de concentração de NaOCl com tempo de exposição do material vegetal (12 horas) ficou definido em avaliações preliminares. Muito importante neste procedimento foi manter uma porção do caule do ano anterior, ou seja, material lenhoso, para evitar problemas com oxidação dos tecidos mais tenros dos brotos novos.

Finalizada a pré-desinfestação, as brotações coletadas foram seccionados em segmentos nodais com 10 mm de comprimento (Figura 21E). Estes foram transferidos para frascos contendo água deionizada e levados à câmara de fluxo laminar, onde se iniciou a desinfestação.

3.3.2.2 Experimento: Efeito de 4 concentrações de NaOCl em 2 tempos de exposição na desinfestação de segmentos nodais, retirados de ramos de árvore adulta de *Melia azedarach* L.

Os segmentos nodais preparados de acordo os procedimentos descritos anteriormente, foram submetidos aos tratamentos para desinfestação superficial, combinando o uso de etanol (etOH) 70% durante 30 segundos, aos seguintes tratamentos:

a) Fator: Tempo de exposição dos explantes à solução de NaOCl

T1 – exposição de 10 minutos

T2 – exposição de 15 minutos

b) Fator: Concentrações de NaOCl

T1 – 0,5% de NaOCl + Tween 20 a 0,1%

T2 – 1,0% de NaOCl + Tween 20 a 0,1%

T3 – 1,5% de NaOCl + Tween 20 a 0,1%

T4 – 2,0% de NaOCl + Tween 20 a 0,1%

O tratamento testemunha, sem NaOCl não foi incluído neste experimento uma vez que foi constatado por meio de testes preliminares, que este apresentou 100% de contaminação bacteriana.

Após o tratamento, os segmentos foram submetidos à três lavagens com água deionizada esterilizada.

Os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada parcela representada por 10 explantes. Os tratamentos

representam o arranjo fatorial de 4 concentrações de NaOCl (0,5, 1,0, 1,5 e 2%), e 2 tempos de exposição dos explantes (10 e 15 minutos).

O meio de cultura testado para o estabelecimento *in vitro* dos ápices caulinares foi o meio básico de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácido de MS, suplementado com 4,44 μM de BAP, 0,30 μM de GA₃, 0,05 μM de ANA, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar o agente geleificante, o ágar bacteriológico Himedia® na concentração de 6 g.L⁻¹. Este foi distribuído em tubos de ensaio de 25 x 150mm, em um volume de 10 mL para cada tubo, que foram fechados com tampas plásticas, seguindo-se autoclavagem durante 20 minutos a 1,5 atm de pressão e temperatura de 121 °C. Os tubos contendo meio de cultura foram inclinados após autoclavagem, para que após geleificados aumentassem a sua área superficial.

Os ápices meristemáticos foram isolados em meio de cultura, com auxílio de um microscópio estereoscópico, e com tamanho aproximado de 1 mm.

Imediatamente após o isolamento dos explantes, estes permaneceram em sala de crescimento, no escuro, por um período de 5 dias, visando a diminuir a oxidação causada pela liberação de compostos fenólicos no meio. Uma outra providência tomada para esta mesma finalidade foi a de, algumas horas após o isolamento, mudar os explantes de lugar no meio de cultura, no mesmo tubo de ensaio. Após este período de escuro, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com intensidade luminosa de 24 $\mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C, e umidade relativa de 40%.

Semanalmente avaliou-se a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, além da porcentagem de explantes oxidados. Aos 30 dias de cultivo, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e aos 45, o estabelecimento dos explantes. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde e o estabelecimento foi determinado pelo desenvolvimento dos primórdios foliares visíveis a olho nu.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa MSTAT (Michigan State University). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto sua homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLANTAS JUVENIS

4.1.1 Estágios 0 e 1: Seleção, preparo de plantas matrizes e estabelecimento de culturas assépticas.

Ao se proceder a desinfestação de segmentos nodais coletados de plantas juvenis com idade a partir de 8 meses, não foi verificada a presença de contaminação fúngica. Este resultado pode ter ocorrido pelo fato de que as mudas utilizadas como plantas-matrizes estavam em casa-de-vegetação e foram pulverizadas quinzenalmente com fungicida sistêmico tiofanato metílico – Cercobin 700PM[®], a 0,7 g.L⁻¹. Este tratamento dado às plantas matrizes, considerado uma pré-assepsia, segundo Gratapaglia e Machado (1998), é uma medida preventiva contra a contaminação dos explantes. Este resultado também foi observado por Ribas (1999), quando trabalhou com mudas de *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg (peroba-rosa), mantidas em casa-de-vegetação e pulverizadas semanalmente com 0,5 g. L⁻¹ de benomyl (fungicida sistêmico – Benlate 500[®]).

As aplicações quinzenais com fertilizante foliar mineral Biofert[®] intercaladas às aplicações com fungicida sistêmico, possivelmente foram responsáveis pela renovação mais rápida das brotações das plantas matrizes (Figura 18C).

Para a contaminação com bactérias, a porcentagem foi muito baixa, não chegando a 10% dos explantes isolados. Com relação à porcentagem de oxidação, esta não foi observada. Provavelmente este resultado foi devido às providências tomadas: a desinfestação de um número reduzido de explantes no mesmo frasco, à mudança de posição do explante no meio de cultura algumas horas após o seu isolamento, e à permanência de 5 dias em ambiente escuro em sala de crescimento.

O estabelecimento dos explantes (segmentos nodais) foi verificado com o desenvolvimento das gemas aos 45 dias após o isolamento em meio de cultura. Já aos 15 dias após o isolamento, este desenvolvimento era visível (Figura 18H).

O meio de cultura utilizado (MS suplementado com 4,44 μ M de BAP; 0,30 μ M de GA₃ e 0,05 μ M de ANA), já pode ser considerado clássico para o estabelecimento de explantes, seja para ápices caulinares, gemas ou segmentos nodais de plantas herbáceas ou lenhosas. Erig e Fortes (2002) utilizaram esta mesma formulação para estabelecimento *in vitro* de gemas e meristemas de pereira (*Pyrus sp*), cultivares Carrick e Garber.

4.1.2 Estágio 2: Multiplicação

4.1.2.1 Avaliações preliminares

4.1.2.1.1 Ensaio preliminar de multiplicação de segmentos uninodais com meio MS, onde foram testados 3 tipos de citocininas: BAP, 2-iP e KIN, nas concentrações: 1,11 e 2,2 μM (BAP); 1,23 e 2,46 μM (2-iP) e 1,16 e 2,32 μM (KIN).

Os explantes primários (segmentos nodais contendo uma gema) foram isolados em meio MS suplementado com 4,44 μM de BAP, 0,30 μM de GA₃ e 0,05 μM de ANA para o estabelecimento da cultura. Percebeu-se, nesta fase, que após 20 dias, houve a formação de calos na base dos explantes, e, a partir daí o surgimento de necrose apical seguida de abscisão foliar.

Provavelmente, a formação de calos na base da brotação esteja relacionada ao efeito residual dos fitorreguladores suplementados ao meio de iniciação da cultura.

Os melhores resultados para a multiplicação de microestacas apicais e axilares foram obtidos com BAP, em todas as concentrações, quando comparado com as outras citocininas: 2i-P e KIN. A taxa média de multiplicação atingiu 4,6 (dados não apresentados) para a concentração de 1,11 μM BAP. Neste caso prevaleceu o crescimento no eixo vertical, onde, com a repicagem foi possível a separação dos segmentos uninodais (Figura 22A).

A suplementação com KIN não apresentou resultados satisfatórios, uma vez que não houve multiplicação de brotos, mas um crescimento desordenado das folhas e em detrimento do desenvolvimento das gemas. Outra característica indesejável observada nas brotações que foram submetidas ao tratamento com KIN, independentemente da concentração utilizada, foi a falta de alongamento destas (Figura 22 B).

Com a citocinina 2-iP, os resultados foram ainda menos satisfatórios, tendo em vista que houve maior formação de calos já no início do período de incubação, o que impediu o desenvolvimento das microestacas, (Figuras 11C e D).

Quanto à formação de calos, esta foi menor em meio contendo KIN. Em meio suplementado com BAP, houve a formação de calos, porém mais tardia, quando comparado à KIN e 2-iP.

4.1.2.1.2 Ensaio preliminar onde foram testados meios de cultura com 3 composições básicas de sais (MS, QL e WPM), suplementadas com 1,11 μM e 2,22 μM de BAP.

A partir dos resultados obtidos no teste anterior, onde ficou definido BAP como o fitorregulador mais indicado para a fase de multiplicação de cinamomo, outro ensaio preliminar foi instalado para a verificação de diferentes composições de macro e micronutrientes no desenvolvimento das brotações. Este ensaio teve também como objetivo, observar a formação ou não de calos na base das microestacas, sendo este o maior entrave observado para o desenvolvimento e multiplicação das brotações.

Foram utilizados como meios básicos além do MS (controle), o WPM e QL, utilizado para espécies lenhosas.

O cálcio apresenta limitações na sua translocação na planta intacta, que às vezes, são observadas também *in vitro*. Como o cálcio depende da transpiração da planta para seu transporte no xilema, as condições de alta umidade do ar que se estabelecem *in vitro* podem induzir a deficiência de cálcio em partes aéreas em micropropagação. Sintomas de necrose apical do caule de batata (*Solanum tuberosum*) *in vitro* foram observados por Sha, McCown e Peterson (1985)³, citados por Caldas *et al.* (1998).

Algumas diferenças mais significativas no meio QL e WPM têm relação ao fornecimento do cálcio na forma de nitrato de cálcio (QL) e a combinação de nitrato de cálcio + cloreto de cálcio (WPM), este último em menores concentrações. Acredita-se que, pelo fato do nitrato de cálcio ser mais facilmente deslocável nos tecidos da planta, quando comparado ao cloreto de cálcio, estas duas composições de sais possam diminuir o efeito da necrose apical nas brotações.

Ao contrário do que foi observado por Ribas (1999) que considerou o meio básico WPM como o mais indicado para a espécie *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg (peroba-rosa), para o cinamomo, o meio WPM proporcionou brotações pouco vigorosas, com folhas expandidas e cloróticas e com crescimento lento.

Para o meio QL, os resultados com a obtenção de novas brotações foram satisfatórios, com taxas médias de 4,34 para 1,11 μM BAP e 5,96 para 2,22 μM BAP. Apesar dos bons resultados para as variáveis número de brotos formados, e do incremento na altura média dos brotos, que chegou a 12,22 mm para 1,11 μM BAP e 10,88 mm para 2,22 μM BAP, observou-se que a parte aérea formada apresentou coloração amarelada,

³ SHA, L.; MCCOWN, B.H.; PETERSON, L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, p.631-634, 1985.

com brotos mais finos e frágeis, além da formação exagerada de calos na base (Figura 22F).

O melhor meio de cultura básico testado para o cinamomo foi o MS, o qual, apresentou taxas médias de multiplicação superiores ao observado com o meio QL (4,83 para 1,11 μM BAP e 4,2 para 2,22 μM BAP) e incremento médio na altura das brotações de 11,3 mm para 1,11 μM BAP e 9,8 mm para 2,22 μM BAP. O diferencial para o meio MS está no aspecto vigoroso das novas brotações, de coloração verde intenso e com formação mais tardia de calos na base (Figura 22 E).

4.1.2.1.3 Ensaio preliminar onde foi observado o efeito do carvão ativado adicionado ao meio de multiplicação: MS +1,11 μM BAP, na formação de calos na base das brotações.

Os calos formaram-se na base das brotações, a partir da segunda semana após a repicagem para o meio de multiplicação. A princípio foram pequenos, friáveis e de coloração clara; após este período, cresceram de tamanho (chegando a 10 mm de diâmetro), tornaram-se compactos, e de coloração marrom-claro. Não apresentaram qualquer indicação para regeneração de brotações adventícias. Após a sua formação, iniciou-se a necrose apical. Provavelmente esta necrose apical seja consequência da formação de calos na base das brotações, que formam uma barreira física, ou seja, um impedimento para absorção dos componentes presentes no meio de cultura.

Com a repicagem destas brotações para meio de cultura contendo carvão ativado (CA) a 0,2% (m/v), não houve a formação de calos na base. Apesar do excelente aspecto dos brotos, com uma coloração verde intenso, houve apenas o desenvolvimento das primeiras folhas formadas. Com isso, as brotações se mantêm inalteradas, sem crescimento e sem a formação de novos brotos (Figura 22G). Para o meio de multiplicação sem a adição de CA houve um bom desenvolvimento das brotações, porém com a formação de calos na base (Figura 22 H), seguida da necrose apical (após 20 dias de incubação), como já era esperado.

A formação de calos pode estar relacionada ao efeito residual do BAP do meio de cultura de estabelecimento (4,4 μM de BAP).

Portanto, recomenda-se a utilização do CA em meio de cultura entre os subcultivos na fase de multiplicação. Com este procedimento, provavelmente ocorra um melhor controle sobre a formação de calos.

Uma segunda recomendação seria reduzir o intervalo de repicagens para 20 dias.

4.1.2.1.4 Ensaio preliminar onde foi observado o efeito da orientação do explante no meio de cultura.

Não houve diferença significativa quanto à orientação vertical e horizontal do explante de cinamomo em meio de cultura para o número de brotos formados.

Durante a multiplicação *in vitro*, alguns tratamentos podem ser dados aos explantes para estimular uma maior proliferação (Grattapaglia e Machado, 1998). Vieitez *et al.* (1993) obtiveram uma eficiente produção de brotações em *Quercus rubra*, combinando três tratamentos que favoreceram o crescimento das gemas laterais: excisão do ápice, cultivo na orientação horizontal e tratamento com citocininas.

Este resultado está de acordo com Zimmerman e Fordham (1989), que não obtiveram diferença significativa quanto à orientação vertical e horizontal do explante, para o número de brotações de macieira 'Delicious' com comprimento maior que 5 mm, após três semanas de cultivo. Chevreau e Leblay (1993) obtiveram maior altura das brotações de pereira, cv. Passe Crassane, com os explantes colocados na vertical sem excisão do ápice.

Erig e Schuch (2002) trabalhando com o porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' não encontraram diferenças quanto à orientação de explantes no meio de cultura de multiplicação para a variável altura do maior broto.

Portanto, recomenda-se a utilização de explantes na orientação vertical no meio de cultura, tendo em vista que há uma tendência de crescimento no eixo vertical para as condições estudadas, além de possibilitar um número maior de explantes por frasco.

4.1.2.2 Experimento: Efeito de 9 concentrações de BAP suplementadas ao meio básico de sais MS na multiplicação *in vitro* de 2 tipos de microestacas de *Melia azedarach*, L.

Os dados apresentados referem-se às médias dos 3 primeiros subcultivos, uma vez que não houve diferenças nos resultados obtidos.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados das variáveis número de brotos, e folhas, e os valores de qui-quadrado (X^2) referentes ao teste de Bartlett.

A análise de variância revelou, para a variável número médio de brotos e de folhas que os fatores tipo de explante e concentrações de BAP não são independentes, pois a interação foi significativa ao nível de 1%.

TABELA 3 – Resultados da análise de variância para as variáveis número médio de brotos e folhas na multiplicação *in vitro* de microestacas apicais e axilares de *Melia azedarach*, L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Média de 3 subcultivos.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		Número de brotos	Número de folhas
A-Explante	1	0,298 ^{ns}	10,904 ^{**}
B-Concentração	8	10,096 ^{**}	103,427 ^{**}
Interação A X B	8	3,679 ^{**}	4,432 ^{**}
ERRO	54	0,333	1,005
Total	71		
CV (%)		17,63	21,85
Teste de Bartlett		0,673 ^{ns}	0,662 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

^{**} F significativo ao nível de 1% de probabilidade

Como os fatores são dependentes para a variável número de brotos, o teste de comparação de médias (Tabelas 4) demonstrou que, para microestacas apicais, o tratamentos com 1,1 µM de BAP é superior estatisticamente à maioria dos tratamentos e não difere das concentrações 1,66 e 4,44 µM de BAP, com média de 4,83 brotos por explante. Para microestacas axilares, o tratamentos com e 1,66 µM BAP destacou-se dos demais, com médias de 4,75 brotos por explante e não diferiu das concentrações 0,55, 1,11 e 3,33 µM de BAP (Figuras 24A e B).

TABELA 4 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de brotos, na multiplicação *in vitro* de microestacas apicais e axilares de *Melia azedarach*, L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Médias de 3 subcultivos.

Concentrações de BAP (µM)	Tipos de microestacas	
	Apicais	Axilares
0	1,00 F	2,33 DE
0,55	3,66 C	3,91 AB
1,11	4,83 A	4,33 AB
1,66	4,08 ABC	4,75 A
2,22	2,16 E	0,66 F
2,77	2,49 DE	3,74 BC
3,33	3,83 BC	4,41 AB
3,66	3,33 CD	2,19 CD
4,44	4,66 AB	1,83 E

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A testemunha, sem a adição de BAP apresentou um pequeno desenvolvimento. As gemas axilares desenvolveram de 2 a 3 folhas, que mantiveram-se inalteradas até o final do período de incubação. A ausência de formação de calos na base das microestacas também foi observada para a testemunha.

Os resultados obtidos estão de acordo com Nunes *et al.* (1999) que obtiveram as maiores taxas de multiplicação para o porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', utilizando concentrações de BAP entre 1,11 e 4,44 μM .

Para os autores Shahzad e Siddiqui (2001) o maior número de brotações múltiplas de cinamomo foram obtidos com as concentrações de BAP de 4,44 a 10 μM BAP com 0,2 mg.L^{-1} NAA.

Segundo Liew *et al.* (1998), para outra meliácea, *Azadirachta excelsa*, os melhores resultados para a fase de multiplicação de segmentos nodais oriundos de plantas juvenis, foram obtida com 3,33 μM de BAP e 0,27 μM de ANA. Este tratamento induziu boa taxa de multiplicação (4,3).

Thakur *et al.* (1998) trabalhou com segmentos nodais obtidos de plântulas de *Melia azedarach*, que produziu múltiplos brotos com 17,76 μM de BAP. Apesar de apresentarem concentrações consideradas altas, em trabalhos realizados com *Swietenia macrophylla*, outra meliácea, Cerdas *et al.* (1998) relataram que os melhores resultados para número médio de brotos formados por explante foram obtidos com 44 μM de BAP.

No presente trabalho, concentrações crescentes a partir de 3,33 μM de BAP foram consideradas muito elevadas, em virtude da presença excessiva de calos na base dos explantes (Figura 24C). Os calos formados podem ter causado um impedimento mecânico para a absorção dos nutrientes presentes no meio de cultura.

O teste de comparação de médias (Tabelas 5) para a variável número de folhas revelou que o tratamento com 1,66 μM foi superior estatisticamente e diferente de todos os demais para os dois tipos de microestacas utilizados, com média de e 12,63 folhas para microestacas apicais e 14,98 folhas para microestacas axilares.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados das variáveis: número de gemas, incremento na altura do caule (cm) e comprimento do maior broto (cm) e os valores de qui-quadrado (X^2) referentes ao teste de Bartlett.

A análise de variância revelou, para as três variáveis estudadas, que os fatores tipo de explante e concentrações de BAP são independentes, uma vez que a interação entre os mesmos não foi significativa. Os dois fatores apresentaram diferenças estatísticas significativas ao nível de 1% de probabilidade para as três variáveis estudadas.

O teste de comparação de médias (Tabela 7) demonstrou que as microestacas apicais apresentaram resultados estatisticamente superiores às microestacas axilares, para número de gemas, incremento na altura do caule e altura do maior broto.

TABELA 5 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de folhas, na multiplicação *in vitro* de microestacas apicais e axilares de *Melia azedarach*, L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Médias de 3 subcultivos.

Concentrações de BAP (μM)	Tipos de microestacas			
	Apicais		Axilares	
0	1,58	E	2,33	CD
0,55	4,66	BC	3,16	BC
1,11	5,16	B	3,99	B
1,66	12,62	A	14,97	A
2,22	3,41	CD	1,08	D
2,77	4,24	BCD	3,41	BC
3,33	5,60	B	4,08	B
3,66	2,91	DE	2,33	CD
4,44	4,58	BC	2,41	CD

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 6 – Resultados da análise de variância para as variáveis número de gemas, incremento na altura do caule e altura do maior broto na multiplicação *in vitro* de microestacas apicais e axilares de *Melia azedarach*, L. submetidas a 9 concentrações de BAP

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		Número de gemas	Incremento na altura do caule (cm)	Altura do maior broto (cm)
A-Explante	1	28,438**	2,347**	3,823**
B-Concentração	8	171,888**	1,445**	1,975**
Interação A X B	8	2,422 ^{ns}	0,140 ^{ns}	0,239 ^{ns}
ERRO	54	1,229	0,148	0,178
Total	71			
CV (%)		18,78	63,52	27,68
Teste de Bartlett		0,107 ^{ns}	0,233 ^{ns}	0,802 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

Com relação ao tratamento com diferentes concentrações de BAP, para a variável número de gemas, o melhor resultado foi obtido com 1,66 μM de BAP, com uma média de 17,94 gemas por explante.

As concentrações de 0,55 e 1,11 μM de BAP foram superiores estatisticamente e diferentes dos demais tratamentos para incremento na altura do caule (com 1,32 e 1,13 cm) e altura do maior broto (com 2,36 e 2,16 cm).

Apesar de 0,55 e 1,11 μM de BAP terem apresentado os melhores resultados para incremento na altura do caule e altura do maior broto, pode-se verificar, neste caso, que pode estar ocorrendo estiolamento dos brotos, tendo em vista o reduzido número de gemas e folhas por explante para esta concentração.

TABELA 7 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias das variáveis número de gemas, incremento na altura do caule (cm) e altura do maior broto (cm) na multiplicação *in vitro* de microestacas apicais e axilares de *Melia azedarach*, L. submetidas a 9 concentrações de BAP. Médias de 3 subcultivos.

Concentrações de BAP (μM)	Média Geral		
	Número de gemas	Incremento na altura do caule (cm)	Altura do maior broto (cm)
0	3,41 DE	0,05 E	1,07 DE
0,55	5,91 B	1,13 AB	2,16 AB
1,11	5,37 BC	1,32 A	2,36 A
1,66	17,94 A	0,86 BC	1,86 BC
2,22	2,78 E	0,27 DE	0,89 E
2,77	4,58 CD	0,39 DE	1,35 DE
3,33	5,45 BC	0,60 CD	1,46 CD
3,66	3,41 DE	0,27 DE	1,25 DE
4,44	4,24 CD	0,53 CD	1,33 DE
Tipos de Microestacas		Média geral	
Apicais	6,53 A	0,78 A	1,75 A
Axilares	5,27 B	0,42 B	1,29 B

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Estes resultados foram observados nos três primeiros subcultivos consecutivos, e podem ser considerados satisfatórios, tendo em vista que além da multiplicação das gemas axilares, o crescimento no eixo vertical favorece a subdivisão em segmentos nodais, o que resulta em uma maior taxa de multiplicação.

Com os resultados obtidos, recomenda-se microestacas apicais e axilares de cinamomo na orientação vertical em meio MS suplementado com 1,66 μM de BAP, para a multiplicação, intercalando alguns subcultivos com MS sem adição de BAP ou MS com carvão ativado para minimizar o problema com a formação de calo na base das brotações.

4.1.3 Estágio 3: Enraizamento

4.1.3.1 Experimento: Efeito de 3 diluições de sais de MS suplementadas com 5 concentrações de AIB no enraizamento de microestacas de *Melia azedarach* L.

A análise de variância (Tabela 8) revelou, para as variáveis estudadas: porcentagem de enraizamento e número médio de raízes primárias que os fatores diluições de sais de MS e concentrações de AIB não são independentes, pois a interação foi significativa ao nível de 1%.

Para a variável comprimento das raízes não houve interação entre os fatores, sendo estes independentes. Somente o fator concentrações de AIB apresentou diferenças estatísticas significativas ao nível de 1% para esta variável.

TABELA 8 – Resultados da análise de variância para as variáveis: porcentagem de enraizamento, número e comprimento (cm) das raízes primárias no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Melia azedarach* submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		Enraizamento (%)	Número de raízes	Comp. das raízes
A - Dil. MS	2	2006,667**	4,101**	0,525 ^{ns}
B - Conc. AIB	4	12356,667**	17,262**	8,602**
Interação A X B	8	756,667**	1,482**	0,771 ^{ns}
ERRO	45	202,222	0,221	0,721
Total	59			
CV (%)		28,63	29,65	59,05
Teste de Bartlett		0,102 ^{ns}	0,786 ^{ns}	0,601 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

As médias da variável porcentagem de enraizamento são apresentadas na Tabela 9. Como os fatores são dependentes para esta variável, o teste de comparação de médias revelou que o tratamento com 4,92 μ M de AIB é superior e estatisticamente diferente dos demais para a diluição de sais a 1/3, com 85% de enraizamento. Para a diluição de sais a 1/2, os tratamentos com 4,92, 7,38 e 9,84 μ M de AIB não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram 90, 80 e 80% de enraizamento, respectivamente. Para a concentração de sais de MS sem diluição, o melhor resultado (70% de enraizamento) foi obtido com 9,84 μ M de AIB.

TABELA 9 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável porcentagem de enraizamento, no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Melia azedarach*, L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.

Diluições de MS	Concentrações de AIB (μM)				
	0	2,46	4,92	7,38	9,84
1/3	0 C	10 C	85 A	65 B	70 B
1/2	0 C	55 B	90 A	80 A	80 A
1	0 C	40 B	50 B	50 B	70 A

As médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Estes resultados já eram esperados, uma vez que diluições das formulações básicas têm em geral possibilitado melhores resultados com enraizamento. Mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir esta fase da micropopagação (Grattapaglia e Machado, 1998).

No presente trabalho, o enraizamento das microestacas em meio MS sem diluições só tornou-se satisfatório quando a concentração de auxina foi elevada a 9,84 μM .

O efeito favorável de soluções minerais diluídas no enraizamento pode ser explicado pela redução na concentração do nitrogênio (Driver e Suttle, 1987).

Dimassi-Theriou (1995) relatou que reduzindo a concentração de minerais do meio MS à metade, obteve incrementos no enraizamento e no alongamento de raízes *in vitro* do porta-enxerto de pessegueiro GF 677.

O material vegetal utilizado para o experimento de enraizamento foi estabelecido *in vitro* a partir de plantas juvenis, com idade entre 8 e 10 meses. Esta característica de juvenilidade, associada ao fornecimento exógeno da auxina AIB garantiram boas porcentagens de enraizamento mesmo em microestacas no seu terceiro subcultivo.

O teste de comparação de médias (Tabela 10) para a variável número médio de raízes primárias, revelou que o tratamento com 4,92 μM de AIB, foi superior estatisticamente quando suplementado ao meio básico de sais diluído à metade (MS/2), com 3,65 raízes primárias formadas por microestaca (Figura 20B), e para a diluição à terça parte (MS/3), com 2 raízes primárias formadas. Para a concentração de 9,84 μM de AIB, os melhores resultados foram obtidos quando suplementada à concentração normal de MS, com 3,5 raízes primárias (Figura 20C) e MS/3 (com 2,10 raízes primárias).

TABELA 10 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de raízes primárias, no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Melia azedarach*, L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.

Diluições de MS	Concentrações de AIB (μM)				
	0	2,46	4,92	7,38	9,84
1/3	0,00 C	0,35 C	2,00 A	1,50 B	2,10 A
1/2	0,00 E	0,90 D	3,65 A	2,65 C	3,20 B
1	0,00 D	0,90 C	1,25 C	1,80 B	3,50 A

As médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados obtidos para esta variável apresentaram uma mesma tendência para as concentrações diluídas de sais de MS. Para a concentração normal de MS o melhor resultado coincide com a concentração de 9,84 μM de AIB, onde a porcentagem de enraizamento foi estatisticamente superior.

O teste de comparação de médias (Tabela 11) para a variável comprimento médio das raízes, onde os fatores são independentes, revelou que o melhor resultado foi obtido com a concentração de 4,92 μM de AIB, com 2,20 cm de comprimento, apesar de não diferir estatisticamente da concentração de 7,38 μM .

TABELA 11 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável comprimento de raízes primárias, no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Melia azedarach*, L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.

	Concentrações de AIB (μM)				
	0	2,46	4,92	7,38	9,84
Média Geral	0,00 C	1,61 B	2,20 A	1,87 AB	1,52 B

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A análise de variância (Tabela 12) demonstrou para a variável estudada: incremento médio na altura do caule, que os fatores diluições de sais de MS e concentrações de AIB são dependentes, pois houve interação e esta foi significativa ao nível de 1%. Entretanto, para número de folhas, não houve interação entre os fatores, apesar de individualmente apresentarem diferenças significativas para a variável estudada, ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 12 – Resultados da análise de variância para as variáveis: incremento na altura do caule (cm) e número de folhas no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Melia azedarach* submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		Increm. Altura	Número de Folhas
A- Conc. MS	2	0,385**	4,243**
B- Conc. AIB	4	1,945**	12,693**
Interação A X B	8	0,155**	0,787 ^{ns}
ERRO	45	0,021	0,710
Total	59		
CV (%)		30,55	37,17
Teste de Bartlett		0,097 ^{ns}	0,144 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

O teste de comparação de médias (Tabelas 13) para a variável incremento na altura do caule revelou que o tratamento com 2,46 μM de AIB é superior estatisticamente e diferente de todos os demais para as 3 concentrações de sais, com médias de 0,95; 1,32 e 1,12 cm, respectivamente para MS/3; MS/2 e MS (Figura 20A).

TABELA 13 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável incremento na altura do caule no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Melia azedarach* L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.

Diluições de MS	Concentrações de AIB (μM)				
	0	2,46	4,92	7,38	9,84
1/3	0,40 B	0,95 A	0,11 C	0,07 C	0,11 C
1/2	0,86 B	1,32 A	0,40 C	0,20 D	0,24 D
1	0,27 C	1,12 A	0,75 B	0,22 C	0,05 D

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Para a variável número de folhas, o melhor resultado foi observado com 2,46 μM de AIB, sendo este superior e estatisticamente diferente dos demais (Tabela 14).

Os resultados obtidos com as avaliações referentes a parte aérea das microestacas no experimento de enraizamento sugerem uma nova discussão quanto à utilização de meio básico de MS e MS/2 suplementado com 2,46 μM de AIB para a etapa de multiplicação de microestacas, uma vez que não há formação de calos na base dos brotos, o que se torna um obstáculo para a proliferação das gemas, além de encurtar o ciclo de repicagens.

TABELA 14 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável número de folhas no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Melia azedarach* L. submetidas a 3 diluições de sais de MS e 5 concentrações de AIB após 21 dias.

Concentrações de AIB (μM)	Número de folhas
0	2,35 B
2,46	3,95 A
4,92	2,03 BC
7,38	1,78 C
9,84	1,75 D
Diluições de MS	Número de Folhas
1/3	1,76 B
1/2	2,38 AB
1	2,66 A

As médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A combinação de uma concentração alta de sais com uma concentração baixa de AIB, pode proporcionar uma menor resposta imediata para a indução ao enraizamento de *Melia azedarach*, embora possa apresentar um bom crescimento e desenvolvimento da parte aérea. Com a indução de raízes, a planta tende a entrar em equilíbrio hormonal e com isso, manter-se por mais tempo sob condições *in vitro*, em crescimento monopodial, o que pode ser perfeitamente aproveitado para a subdivisão através de segmentos nodais no eixo vertical, como no caso da videira (*Vitis* spp) que apresenta este mesmo comportamento *in vitro*.

4.1.4 Estágio 4: Transplântio e aclimatização de microestacas enraizadas.

4.1.4.1 Experimento 1: Efeito de 3 substratos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach* L. enraizadas *in vitro* com 21 dias, sob sistema de irrigação intermitente.

As microestacas que permaneceram 10 dias (Figura 19A) em meio de enraizamento antes da instalação do experimento não sobreviveram para a avaliação desta primeira fase de aclimatização. As causas da morte das mesmas podem estar relacionadas à sua menor resistência à transferência para condições *ex vitro*.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), quando as raízes não estão completamente formadas, o sistema caulinar transpira numa taxa muito acima da

capacidade de absorção do sistema radicial, e, devido a isto, a planta pode desidratar e morrer.

Desta forma, o delineamento experimental programado, foi reduzido ao efeito de 3 substratos na aclimatização de microestacas enraizadas com 21 dias.

A variável percentagem de sobrevivência não foi analisada estatisticamente, uma vez que não houve morte de microestacas com 21 dias na avaliação realizada. A percentagem de sobrevivência foi de 100% para os 3 substratos testados.

A análise de variância (Tabela 15) revelou que as diferenças entre os tratamentos foram significativas ao nível de 1% para as variáveis estudadas: incremento no número de raízes e nota para desenvolvimento radicial. Para a variável incremento no comprimento de raízes não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados.

O teste de comparação de médias (Figuras 3 e 4) para as variáveis incremento no número e comprimento de raízes primárias revelou que os resultados não apresentaram diferença significativa para os tratamentos realizados.

Apesar dos valores não apresentarem diferença estatística entre si, o tratamento com CAC 50% para incremento no número de raízes apresentou média de 0,405, comparado a 0,320 e 0,322, respectivamente para Plantmax HT[®] 100% e Plantmax HT[®] 50% + CAC 50%.

TABELA 15 – Resultados da análise de variância para as variáveis: incremento no número e comprimento de raízes primárias (cm), e nota para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de *Melia azedarach* na primeira fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, sob irrigação intermitente.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		Número de raízes	Comprimento de raízes	Nota
Substratos	2	0,164**	0,089 ^{ns}	6,647**
Erro	57	0,009	1,114	0,199
Total	59			
CV (%)		30,02	49,96	19,63
Teste de Bartlett		0,458 ^{ns}	0,512 ^{ns}	0,405 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

Com relação à nota para desenvolvimento radicial, o tratamento com Plantmax HT[®] foi superior estatisticamente e diferente dos demais.

Nesta primeira fase de aclimatização, sob irrigação intermitente, pode-se considerar que a composição do substrato apresenta pouca influência no sistema radicial das microestacas enraizadas.

No entanto, a permanência de 21 dias em meio de cultura de enraizamento, pode ter contribuído para os resultados obtidos, pois neste período as raízes já estavam bem formadas (Figura 19B).

Os resultados obtidos para a espécie em estudo, para número e comprimento de raízes contrariam aqueles encontrados por McClelland *et al.* (1990) onde ressaltam que as raízes produzidas *in vitro* não são funcionais quando transferidos para a fase de aclimatização.

Carvalho *et al.* (1999) trabalhando com aclimatização de mudas de cafeeiro também concluíram que a formação de raízes *in vitro* contribuiu para o desenvolvimento do sistema radicial. Hoffmann *et al.* (1999) afirmaram que uma boa condição de enraizamento e desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido tem conseqüências positivas sobre o crescimento da muda durante a aclimatização.

Bosa *et al.* (2003) ressaltaram a importância da permanência de microestacas de gipsofila *in vitro* devido à formação de raízes, porém afirmaram que este resultado pode ter ocorrido pelo maior acúmulo de carboidratos nos tecidos, conferindo maior resistência às folhas.

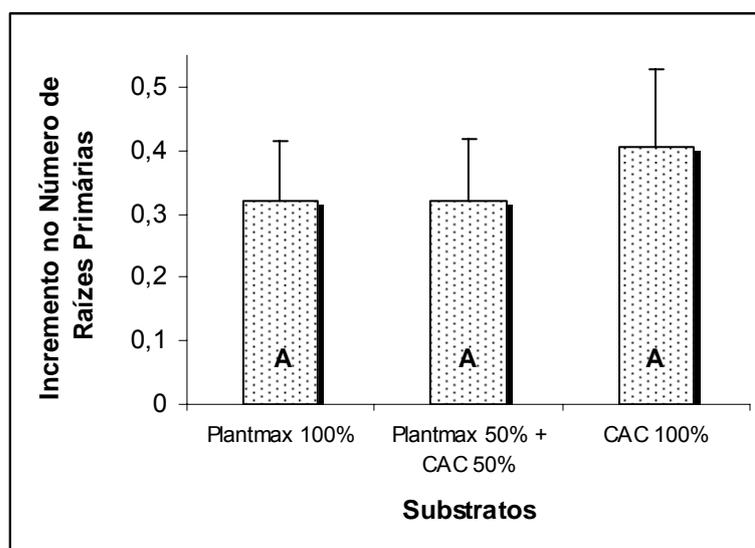


FIGURA 3 – Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no número de raízes primárias.

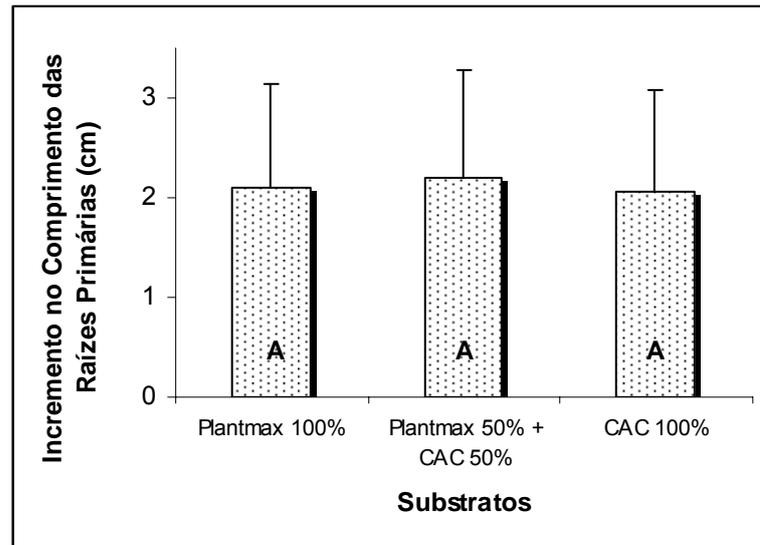


FIGURA 4 – Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no comprimento das raízes primárias (cm).

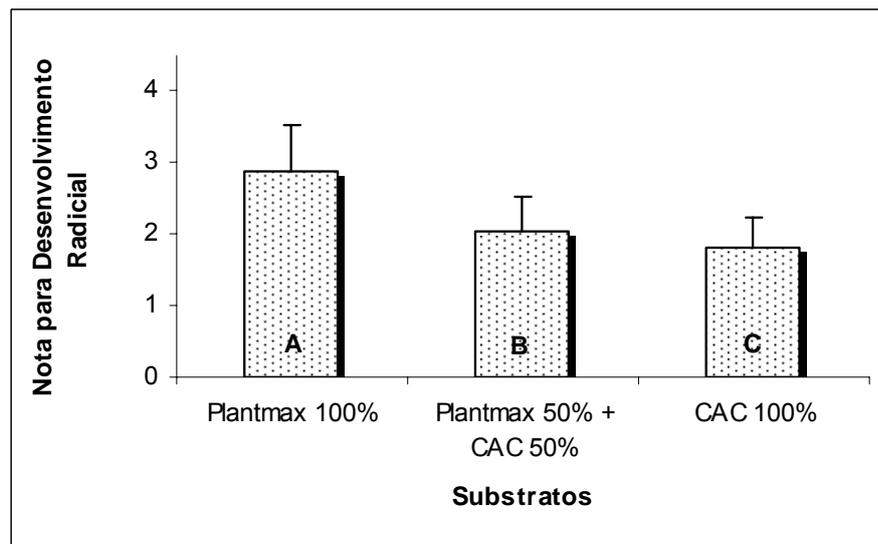


FIGURA 5 – Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável nota para desenvolvimento radicial.

A análise de variância (Tabela 20) revelou que as diferenças entre os tratamentos foram significativas ao nível de 1% para as variáveis estudadas: incremento na massa fresca, na altura da parte aérea, no número de gemas e folhas.

TABELA 16 – Resultados da análise de variância para incremento na massa fresca total (g), altura da parte aérea (cm), número de gemas e folhas de microestacas enraizadas de *Melia azedarach* L., na primeira fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, sob irrigação intermitente.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO			
		Massa Fresca	Altura	Gemas	Folhas
Substratos	2	1,002**	38,731**	34,681**	14,399**
Erro	57	0,007	0,441	0,882	0,667
Total	59				
CV%		16,42	30,09	35,05	34,38
Teste de Bartlett		0,190 ^{ns}	0,512 ^{ns}	0,839 ^{ns}	0,764 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

O teste Tukey para comparação de médias (Figuras 6, 7 e 8) para as variáveis estudadas: incremento na massa fresca, na altura da parte aérea e no número de gemas determinou que o tratamento com o substrato Plantmax HT[®] 100% foi superior e diferente estatisticamente dos demais. Para a variável incremento no número de folhas, os melhores resultados foram obtidos com os tratamentos: Plantmax HT[®] 100%, com 3,10 folhas e Plantmax HT[®] 50%+CAC 50%, com 2,73 folhas.

Para a parte aérea de microestacas enraizadas de cinamomo, o tipo de substrato apresenta influência para esta fase de aclimatização.

Apesar das condições de elevada umidade na casa-de-vegetação sob irrigação intermitente durante o período de aclimatização, o substrato Plantmax HT[®] 100% com suas características físicas de menor espaço poroso total (Tabela 2), quando comparado aos demais substratos testados, contrariaram a expectativa de apresentar problemas com encharcamento nas bandejas.

O substrato com menor porosidade e maior retenção de água pode diminuir o espaço de aeração e, por conseguinte, a porcentagem de enraizamento e sobrevivência, pois a alta capacidade de retenção de água pode proporcionar deficiência de O₂, dificultando a absorção de água e nutrientes.

Mesmo apresentando elevada capacidade de retenção de umidade, quando comparado aos demais substratos, o Plantmax HT[®] proporcionou raízes bem formadas, sendo que as microestacas enraizadas puderam absorver os nutrientes e desenvolver sua parte aérea significativamente (Figura 19D, G e H).

Para o tratamento de adição de CAC ao Plantmax HT[®], as respostas foram muito próximas para o incremento no número de gemas e folhas, porém, para a altura e massa fresca os resultados ficaram muito aquém ao obtido com o Plantmax HT[®] 100%.

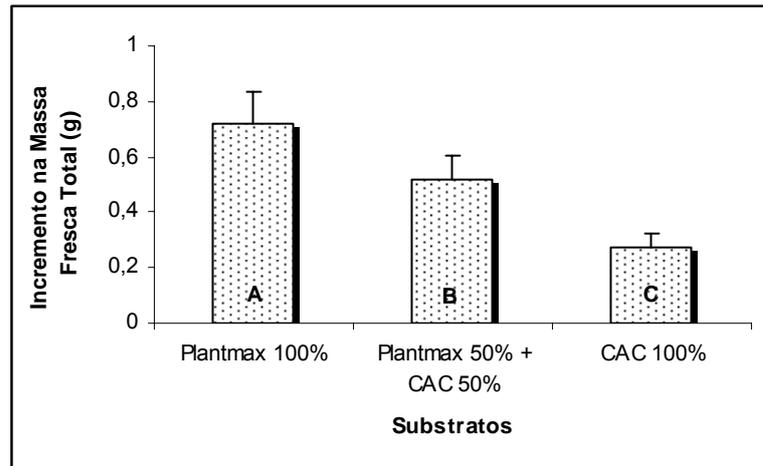


FIGURA 6 – Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento na massa fresca total (g).

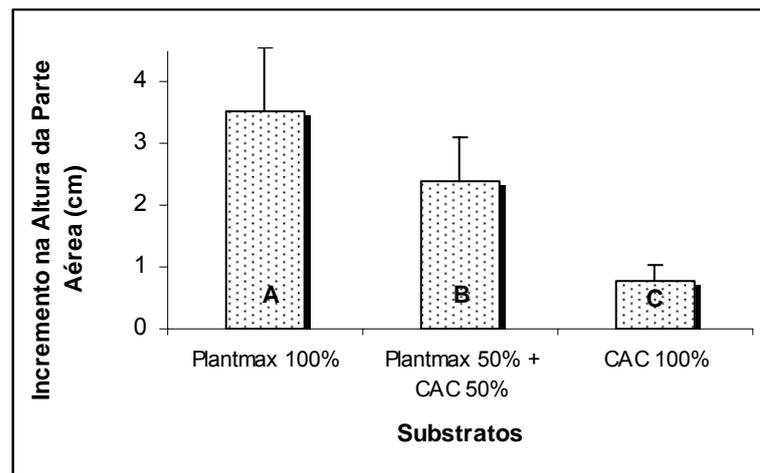


FIGURA 7 – Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento na altura da parte aérea (cm).

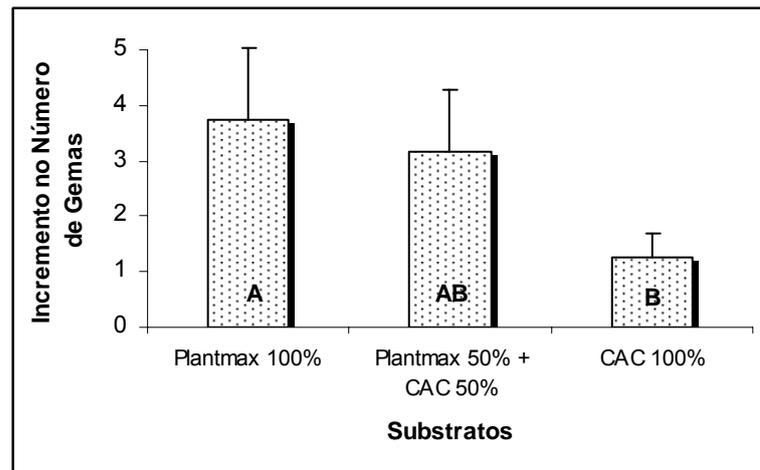


FIGURA 8 – Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no número de gemas.

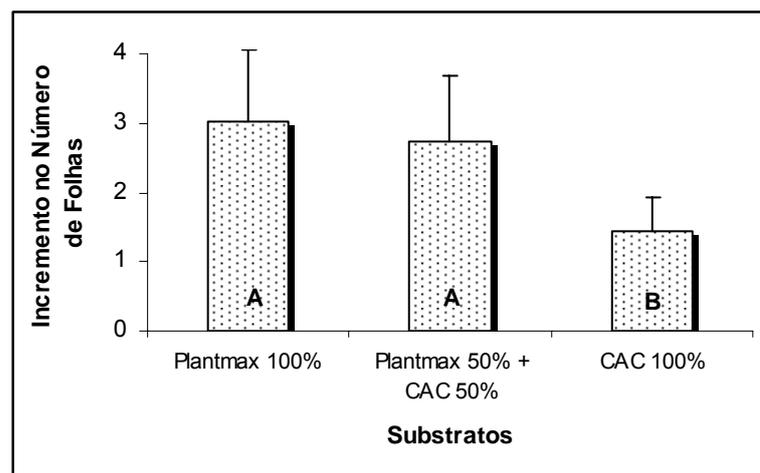


FIGURA 9 – Comparação das médias dos tratamentos na primeira fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no número de folhas.

4.1.4.2 Experimento 2: Efeito de 3 substratos, na segunda fase de aclimatização ou rustificação de microestacas enraizadas de *Melia azedarach* L., em embalagens de polietileno e com irrigação manual.

A análise de variância (Tabela 17) revelou que as diferenças entre os tratamentos foram significativas ao nível de 1% para as variáveis estudadas: incremento no número de raízes primárias, comprimento das raízes primárias e nota para desenvolvimento radicial.

TABELA 17 – Resultados da análise de variância para as variáveis: incremento no número e comprimento de raízes primárias (cm), e nota para desenvolvimento radicial de microestacas enraizadas de *Melia azedarach*, L. na segunda fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, com irrigação manual.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		Número de raízes	Comprimento de raízes	Nota
Substratos	2	4,305**	40,954**	6,771**
Erro	57	0,016	1,657	0,186
Total	59			
CV (%)		21,24	28,36	20,67
Teste de Bartlett		0,176 ^{ns}	0,064 ^{ns}	0,051 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

O teste Tukey de comparação de médias (Figuras 10, 11 e 12) para as variáveis estudadas: incremento no número e comprimento das raízes primárias formadas, e nota para desenvolvimento radicial, revelou que os tratamentos com os substratos Plantmax HT[®] 50%+CAC 50% e Plantmax HT[®]100% foram superiores e diferentes estatisticamente da CAC 100%.

Para a segunda fase da aclimatização, diferentemente dos resultados encontrados para a primeira fase, o tipo de substrato tem efeitos significativos no sistema radicial de *Melia azedarach*, L.

Com a mudança de recipiente, para embalagens de polietileno, e, sobretudo sob as condições de irrigação manual, os substratos com as melhores características físicas e químicas supriram as exigências das raízes para o seu desenvolvimento.

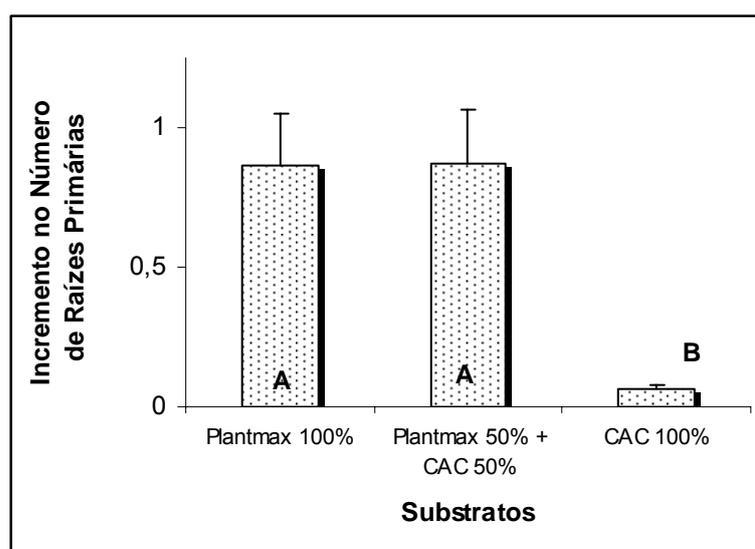


FIGURA 10 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no número de raízes primárias.

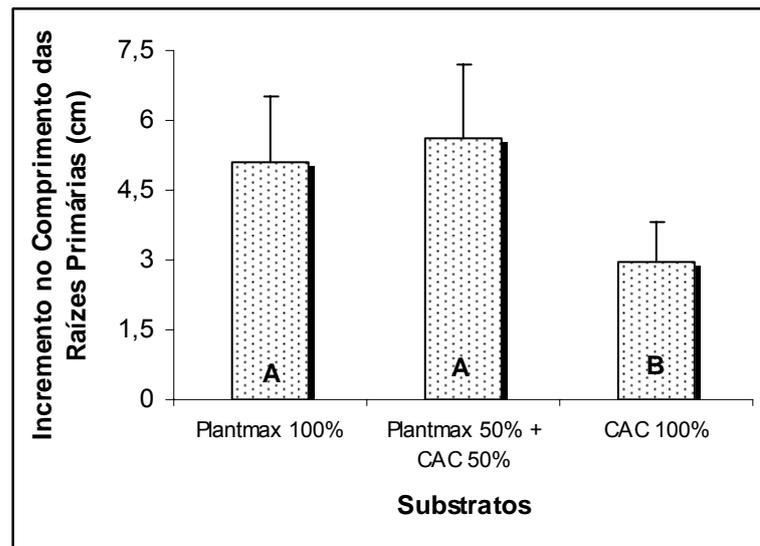


FIGURA 11 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no comprimento das raízes primárias (cm).

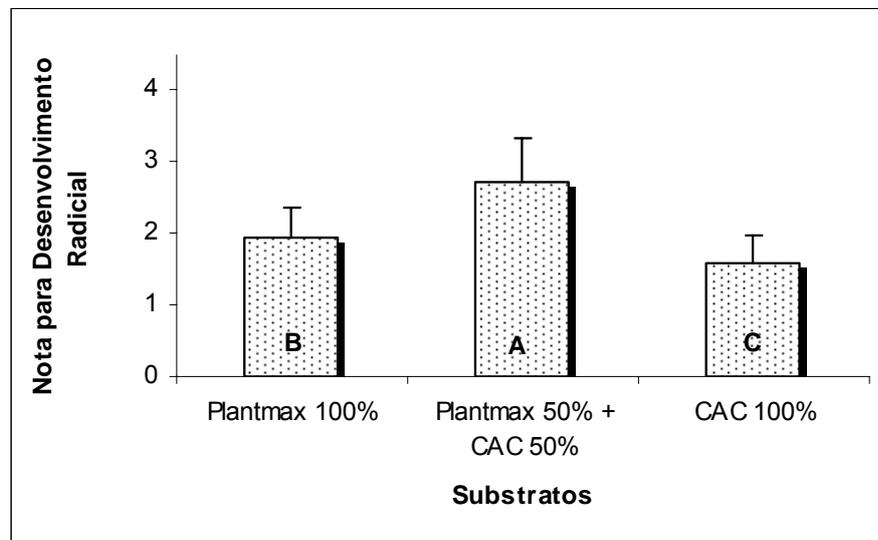


FIGURA 12 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável nota para desenvolvimento radicial.

A análise de variância (Tabela 18) revelou que as diferenças entre os tratamentos foram significativas ao nível de 1% para as variáveis estudadas: incremento na massa fresca, na altura da parte aérea, no número de gemas e folhas.

TABELA 18 – Resultados da análise de variância para o incremento na massa fresca total (g), altura da parte aérea (cm), número de gemas e folhas de microestacas enraizadas de *Melia azedarach*, L., na segunda fase de aclimatização, em casa-de-vegetação, com irrigação manual.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO			
		Massa Fresca	Altura	Gemas	Folhas
Substratos	2	17,759**	254,446**	15,628**	11,265**
Erro	57	0,080	2,043	0,339	0,353
Total	59				
CV%		13,74	17,98	18,49	22,57
Teste de Bartlett		0,554 ^{ns}	0,153 ^{ns}	0,093 ^{ns}	0,542 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

O teste Tukey de comparação de médias (Figura 13) para a variável incremento da massa fresca total, determinou que os melhores resultados foram obtidos com Plantmax HT[®] 50%+CAC 50% e Plantmax HT[®] 100%.

Para as variáveis incremento na altura da parte aérea e no número de gemas e folhas (Figuras 14, 15 e 16) o tratamento com o substrato Plantmax HT[®] 50%+CAC 50% foi superior e diferente estatisticamente dos demais.

Com estes resultados, pôde-se avaliar a importância e eficiência da casca de carvão carbonizada como condicionador de substrato, melhorando principalmente as características físicas da mistura final.

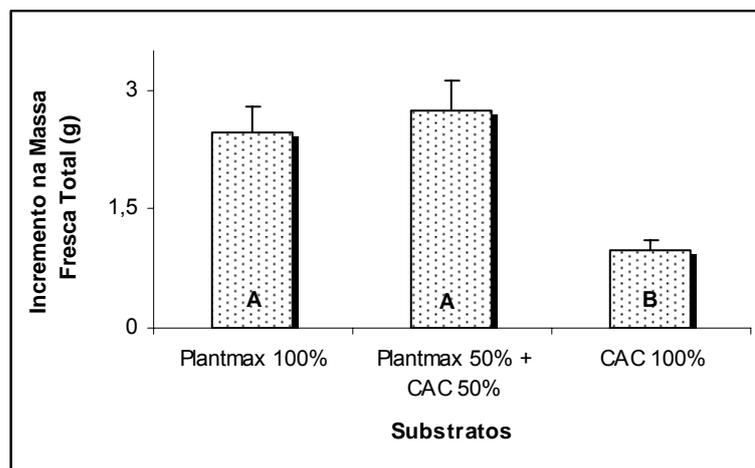


FIGURA 13 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento na massa fresca total (g).

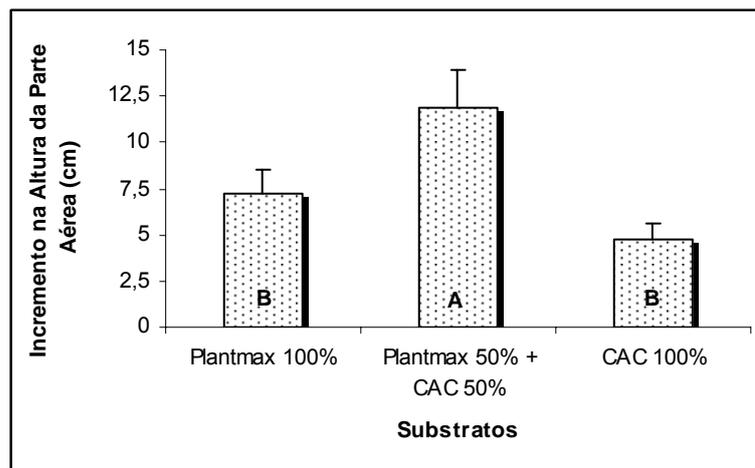


FIGURA 14 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento na altura da parte aérea (cm).

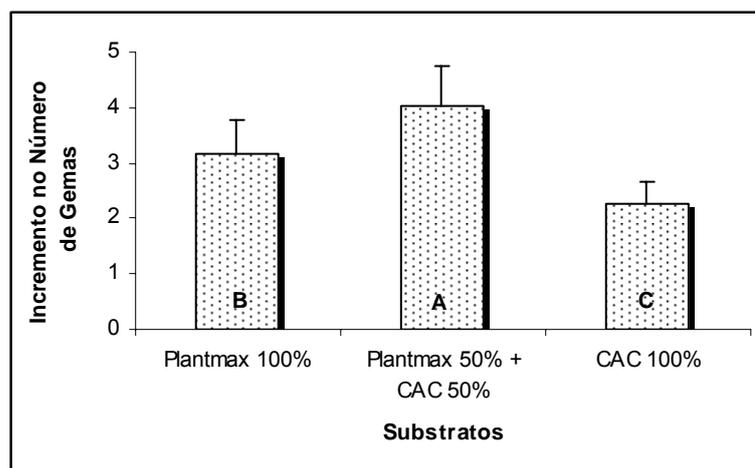


FIGURA 15 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no número de gemas.

A CAC 100%, utilizada como substrato representou o pior tratamento entre os utilizados para este experimento.

Nesta segunda fase da aclimação, as microestacas enraizadas receberam irrigação manual e permaneceram sob condições de baixa umidade relativa e temperatura elevada. A partir desta fase, as plantas podem ser consideradas rustificadas sob o ponto de vista de estarem preparadas para o transplante a campo.

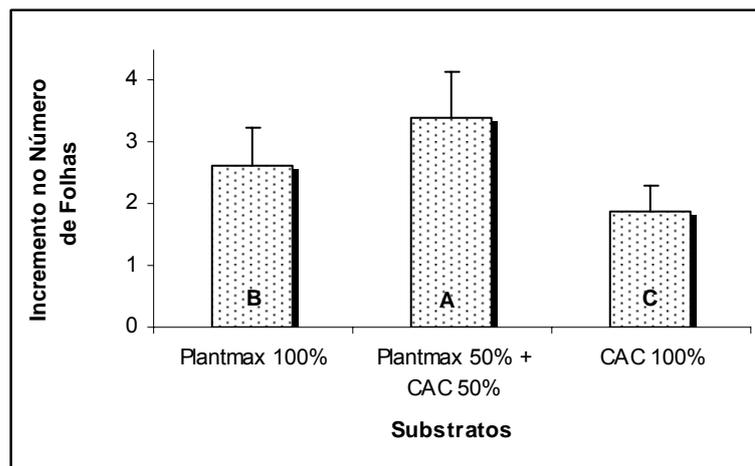


FIGURA 16 – Comparação das médias dos tratamentos na segunda fase de aclimatização de microestacas de *Melia azedarach*, L. enraizadas *in vitro*, para a variável incremento no número de folhas.

A mistura Plantmax HT[®]50% + CAC 50% destacou-se em relação aos substratos puros - Plantmax HT[®]100% e CAC 100% - (Figuras 23D, E e F). Estes resultados estão de acordo com Mendonça *et al.* (2003). Estes autores afirmaram que a qualidade físico-química do substrato teve grande influência no desenvolvimento de mudas de mamoeiro, uma vez que as misturas de substratos apresentaram melhores resultados quando comparados aos substratos puros.

A qualidade química do substrato puro Plantmax HT[®] (Tabela1) não foi suficiente para a obtenção de melhores resultados na segunda fase da aclimatização, ou rustificação das microestacas enraizadas, o que significa que a qualidade física também exerce grande influência. A adição de 50% de CAC ao Plantmax HT[®] proporcionou aumento do espaço poroso total e da água retida na capacidade de campo, devido às características típicas da CAC (Tabela 2).

Hoffmann *et al* (1999) também destacaram a importância da quantidade de macroporos presentes nos substratos, pois comprovaram que a aeração insuficiente prejudica o enraizamento do porta-enxerto de macieira Marubakaido, uma vez que a absorção de água pelas raízes torna-se deficiente.

Portanto, a adição da casca de arroz carbonizada ao Plantmax HT[®] ofereceu boa qualidade físico-química ao substrato, o que contribuiu para o melhor crescimento e desenvolvimento aéreo e radicial da muda produzida.

4.2 PLANTAS ADULTAS

4.2.1 Estágio 0 e 1: Seleção, preparo de plantas matrizes e estabelecimento de cultura assépticas

5.2.1.1 Experimento: Efeito de 4 concentrações de NaOCl em 2 tempos de exposição na desinfestação de segmentos nodais, retirados de ramos de árvore adulta de *Melia azedarach* L.

Na Tabela 19 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados das variáveis estudadas porcentagem de sobrevivência, contaminação por bactérias e oxidação, no experimento: efeito de 4 diferentes concentrações de (NaOCl) em 2 diferentes tempos de exposição na desinfestação de segmentos nodais, retirados do caule de árvore adulta, e os valores de qui-quadrado (X^2) referentes ao teste de Bartlett.

A análise de variância (Tabela 19) revelou para as variáveis estudadas, que os fatores (4 concentrações de NaOCl em 2 tempos de exposição dos explantes) são independentes, pois a interação não foi significativa para as variáveis estudadas.

O efeito das concentrações foi significativo ao nível de 1% de probabilidade para todas as variáveis, enquanto o efeito referente ao tempo de exposição dos explantes somente foi significativo ao nível de 5% de probabilidade, para a variável porcentagem de oxidação.

TABELA 19 – Resultados da análise de variância para as variáveis: sobrevivência, contaminação com bactéria e oxidação, expressas em porcentagem na desinfestação de segmentos nodais de *Melia azedarach* L. submetidas a 4 concentrações de NaOCl e 2 tempos de exposição.

Fator de Variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		Sobrevivência	Bactéria	Oxidação
A-Tempo	1	840,156 ^{ns}	2,500 ^{ns}	1000,000*
B-Concentração	3	7247,887**	341,026**	8990,504**
Interação A X B	3	136,581 ^{ns}	15,844 ^{ns}	444,444 ^{ns}
ERRO	32	208,313	73,760	159,722
Total	57			
CV (%)		29,61	85,16	29,74
Teste de Bartlett		0,88 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,83 ^{ns}

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

O teste de comparação de médias (Tabela 20) revelou, para a variável porcentagem de sobrevivência, que o tratamento com 0,5% de NaOCl é estatisticamente diferente e

superior às demais concentrações testadas (com 80%), independente do tempo de exposição do explante.

Para a variável porcentagem de contaminação por bactérias, as médias obtidas com os tratamentos com 2 e 1,5% de NaOCl foram significativamente iguais e superiores aos demais tratamentos, com porcentagens de 5,33 e 6,67, respectivamente (Tabela 20).

TABELA 20 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável porcentagem de sobrevivência e contaminação por bactérias na desinfestação de segmentos nodais de planta adulta de *Melia azedarach* L. submetidas a 4 concentrações de NaOCl e 2 tempos de exposição.

	Concentrações de NaOCl (%)			
	0,5	1,0	1,5	2,0
Sobrevivência (%)	80,00 A	60,00 B	36,66 C	18,33 D
Contaminação por bactérias (%)	18,33 B	10,00 AB	6,67 A	5,33 A

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a variável porcentagem contaminação fúngica, não foi observado nenhuma ocorrência para os explantes desinfestados.

Quanto ao explante utilizado para estabelecimento *in vitro* (ápices meristemáticos com tamanho aproximado de 1 mm), de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), quanto menor o tecido isolado, maior é a chance de eliminação de microorganismos como fungos e bactérias.

TABELA 21 – Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias da variável porcentagem de oxidação, na desinfestação de segmentos nodais de planta adulta de *Melia azedarach*, L. submetidas a 4 concentrações de NaOCl e 2 tempos de exposição.

Concentração de NaOCl (%)	Oxidação (%)
0,5	11,67 A
1,0	25,00 B
1,5	55,00 C
2,0	78,33 D
Tempo de exposição (min)	Oxidação (%)
10	37,5 a
15	47,5 b

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a o nível de 5% de probabilidade.

Para a variável porcentagem de oxidação, o teste de comparação de médias (Tabela 22) revelou que o tratamento com 0,5% de NaOCl foi estatisticamente diferente e inferior aos demais, com 11,67% de explantes oxidados. O melhor tempo de exposição para a variável, foi de 10 minutos (37,5%).

Segundo Teixeira (1996), a ação bactericida das soluções de hipoclorito é devido à sua alta capacidade oxidante, que destrói a atividade das proteínas celulares.

Estacas ou explantes retiradas de brotações maduras estão mais freqüentemente sujeitas a sofrer necroses, quando comparados a material juvenil, especialmente quando desinfestados superficialmente e introduzidos em cultivo asséptico (Hanus e Rohr, 1987).

Rodrigues *et al* (2003) afirmam que diferentes tipos de fenóis presentes nos tecidos, ao entrarem em contato com o oxigênio, sofrem reações de oxidação, cujos produtos resultantes são tóxicos, causando escurecimento e necrose do tecido vegetal.

Pode-se observar que existe uma correlação direta entre as porcentagens de sobrevivência e de oxidação dos explantes uma vez que há uma tendência de morte do explantes oxidados para concentrações crescentes de NaOCl. Porém, a oxidação não está relacionada somente com a concentração de hipoclorito utilizada para a desinfestação dos tecidos vegetais. Ledo *et al.* (2004) complementam que a intensidade de oxidação pode estar relacionada com o tipo e idade fisiológica do explante, meio de cultura, presença de fitorreguladores e nível endógeno de fitorreguladores e de agentes geleificantes, e entre outros fatores, também depende da espécie a ser cultivada *in vitro*.

Esta espécie é muito utilizada na região sul do Brasil como árvore ornamental, que juntamente com outras espécies compõem o paisagismo urbano. Normalmente estas árvores não recebem quaisquer tratamentos culturais como poda de limpeza, ou poda de renovação dos ramos, muito menos uma poda drástica, práticas usuais em plantas doadoras de explantes.

Muito embora tenham sido realizadas podas nas estações do inverno e primavera no ano anterior, o que provavelmente contribuiu para o revigoramento das novas brotações, não se pode afirmar que este procedimento foi o suficiente para o sucesso da técnica aplicada. Não foram marcados os ramos podados para uma análise mais criteriosa quanto aos resultados obtidos com os isolamentos feitos naquelas ocasiões.

5 CONCLUSÕES

Para a micropropagação a partir de explantes coletados de plantas juvenis de *Melia azedarach* com 8 a 10 meses de idade, pode-se utilizar o seguinte protocolo:

Desinfestação dos segmentos uninodais em etanol 70% por 30 segundos e NaOCl 0,5% (v/v) + Tween 20 a 0,1% (v/v) por 10 minutos e isolamento em meio MS suplementado com 4,44 μM de BAP, 0,30 μM de GA_3 e 0,05 μM de ANA. Multiplicação em meio MS suplementado com 1,66 μM de BAP e enraizamento em meio MS/2 suplementado com 4,92 μM de AIB. Aclimatização de microestacas enraizadas em substrato Plantmax HT[®] 50% + CAC(50%).

Para o estabelecimento de ápices meristemáticos coletados de plantas adultas com idade superior a 15 anos pode-se utilizar a pré-desinfestação pela imersão do ramo inteiro portando na base 5 cm do ramo do ano anterior em solução do fungicida sistêmico tiofanato metílico – Cercobin 700PM[®] PM a 0,7 g.L⁻¹ (m/v) durante 24 horas seguida de imersão em NaOCl a 1% (v/v) por 12 horas. Para a desinfestação dos segmentos nodais pode-se usar a combinação de 30 segundos de etOH 70% (v/v), seguido de 10 minutos de NaOCl a 0,5% (v/v) + Tween 20 a 0,1% (v/v). Os ápices meristemáticos podem ser isolados em meio MS suplementado com 4,44 de BAP; 0,3 μM de GA_3 e 0,05 μM de ANA.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto à multiplicação de microestacas obtidas de planta juvenil de *Melia azedarach* L, as respostas à aplicação de BAP foram satisfatórias quanto à formação de novas brotações. No entanto, novas investigações deverão ser realizadas para elucidar os problemas ocorridos com a formação de calos na base dos explantes nesta fase da micropropagação.

Ainda, na multiplicação, sugere-se nova experimentação com relação ao preparo das microestacas, mantendo-se as folhas ou parte das mesmas, para avaliar o crescimento na presença e ausência de fitorregulador.

Quanto aos explantes estabelecidos a partir de planta adulta, recomenda-se a continuidade dos trabalhos com a aplicação do protocolo definido para plantas juvenis nas fases de multiplicação, enraizamento, transplântio e aclimatização.

A utilização da miniestaquia seriada para a formação de mudas pode ser um método alternativo promissor no rejuvenescimento de clones selecionados de árvores adultas. Desta forma, recomenda-se também estudar a resposta do cinamomo quanto ao enraizamento de miniestacas.

Do mesmo modo, a formação de um jardim miniclinal com mudas obtidas a partir da técnica da micropropagação para o enraizamento de microestacas pode ser uma alternativa econômica e viável para a propagação do cinamomo.

7 REFERÊNCIAS

- 1 ABEDINI, W.; CIOCCHINI G.; MARLATS R. Resultados de la clonación de *Melia azedarach*, L. y *Melia toosendan* Sieb et Zucch resistente al frío. **Investigación Agrária**. v.0, n.12, p.143-149. 1991.
- 2 ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.
- 3 ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 261-296.
- 4 BERLITZ, D.L.; FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis* e *Melia azedarach* – Aplicações e interações no controle de insetos-praga. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano VIII, n.35, julho/dezembro, p. 66-72. 2005.
- 5 BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 236 p. 1992.
- 6 BOSA, N. CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas miropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p. 207-210. 2003.
- 7 BRAHM, R. U.; OLIVEIRA, R. P. de. Potencial de multiplicação *in vitro* de cvs de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p.507-510. 2004.
- 8 BREUER, M.; HOSTE, B.; DE LOOF, A.; NAQVI, S.N.H. Effect of *Melia azedarach* extract on the activity of NADPH-cytochrome c reductase and cholinesterase in insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n.76, p.99-103. 2003.
- 9 CALDAS, L.S.; HARRIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.1 Brasília: EMBRAPA – CNPJ, 1998.
- 10 CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M.J; CARVALHO, G.R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arábica* L) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p. 483-490.1999.
- 11 CARVALHO, P.E.R. ***Melia azedarach* (Cinamomo)**. Instrução Técnica, nº 03, p.1- 9. EMBRAPA , Colombo, PR. 1999.
- 12 CERDAS, L.V.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Switenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v.46, n.2, p.225-228. 1998.
- 13 CHEVREAU, E.; LEBLAY, C. The effect of mother plant pretreatment and explant choice on regeneration from *in vitro* pear leaves. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.336, p.263-268, 1993.

- 14 CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1262 p. 1981.
- 15 DEKLERK, G.J.; BRUGGE, J.T.; MARINOVA, S. Effectiveness of indolacetic acid, indolbutyric acid and naphthalenacetic acid during adventitious root formation in vitro in Mallus 'Jork9'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.49, p. 39-44, 1997.
- 16 DEKLERK, G.J.; KEPPEL, M.; BRUGGE, J.T; MEEKES, H. Timing on the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, n.289, p.965-972, 1995.
- 17 DIMASSI-THERIOU, K. *In vitro* rooting of rootstock GF677 (*P. persica* x *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the nutrient and type of culture-tube sealing material. **J.Hort.Sci.** v.70, p. 105-108. 1995.
- 18 DOMECCQ, C. Cultivo *in vitro* de yemas axilares de **paraíso** gigante (*M. azedarach* L. var. *gigantea*). **Phyton**, v. 48, n.1-2, p. 33-42.1988.
- 19 DRIVER, J.A.; SUTTLE, G.R. Nursery handling of propagules. In: **Cell and Tissue Culture in Forestry**. (BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. eds), p. 320-335. Dordrecht, Netherlands. 1987.
- 20 ERIG, A.C; FORTES, G.R. de L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.577-582. 2002
- 21 ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, 2002.
- 22 EESWARA, J.P. SRUCHBURY, T.; ALLAN, E.J.; MORDUE, A.J. A standard procedure for the micropropagation of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). **Plant Cell Report**. v. 17, p. 215-219. 1997.
- 23 FAQUIM, V.A.E.F.; VILELA, L.A.A. **Produção de alface em hidroponia**. Lavras: UFLA, 50p. 1996.
- 24 FRETZ, T.A.; READ, P.E.; PEELE, M.C. **Plant propagation lab. Manual**. Minneapolis: Burgess Publishing Company. 1979. 317p.
- 25 GAUTAM, V.K., NANDA, K., GRUPTA, S.C. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. juss – a medicinal tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.34, p. 13-18. 1993.
- 26 GEORGE. E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Great Britain: Exegetics Limited, 1993.
- 27 GIRARDI, A.M.M. Meliaceae. **Boletim do Instituto Central de Biociências**, Série Botânica, Porto Alegre, v.33, n.3, p. 1-64, 1975.

- 28 GOMES, A. L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).
- 29 GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1. p. 183-260.
- 30 GUERRA, M.P; NODARI, R.O.; DIOLA, V. Material didático de apoio à disciplina biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina / Setor de Ciências Agrárias. Encontrado em <http://www.cca.ufsc.br/lfldgv/Apostila.htm>, em 10 de outubro de 2005.
- 31 GURGEL FILHO, O.A. A propagação vegetativa de essências florestais. **Revista da Agricultura**, São Paulo, v. 34, n.23, p.119-130. 1959.
- 32 HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Neo-formation of flower and other morphogenic responses in tissue cultures of *Melia azedarach*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 64, p. 73-76. 2001.
- 33 HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation, Principles and Practices**. 6. ed. New York: Englewood Clippis/Prentice hall: Prentice-Hall, 1997. 770p.
- 34 HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of the *Eucalyptus*. **Australian forest research**, v.10, n.3, p.191-211, 1980.
- 35 HOFFMANN, A.; CHALFUN, N.N.J; PASQUAL, M.; VEIGA, R.D. Efeito do substrato no enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 2, n. 2, p. 189-197, 1999.
- 36 HUANG, R.C.; TADERA, K.; YAGI, F. MINAMI, H.; OKAMURA, H; IWAGAWA, T.; NAKATANI, M. Limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v.43, n.5, p. 581-583. 1996.
- 37 ITOKAWA, H.; QIAO, Z.S; HIROBE, C.; TAKEYA, K. Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin Tokyo**, v.43, n. 7, p.1171-1175. 1995.
- 38 JOHANSSON, L. Effects of activated charcoal in anther cultures. **Physio. Plant.** 59: p. 397-403. 1983.
- 39 JOSHI, M.S.; THENGANE, S.R. In vitro propagation of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) by shoot proliferation. **Ind. J. Exp. Biol.** v. 34, p. 480-482. 1996.
- 40 KÄMPF, A.N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000, 254 p.
- 41 KEARNEY, M.C. **Plant cell and tissue culture of *Azadirachta indica* for the production of antifeedant compounds**. M.Sc. Thesis. University of Aberdeen, UK. 1993.

- 42 KLEIN, V. A.; CAMARA, R. K.; SIMON, M. A.; DIAS, S. T. Casca de arroz carbonizada como condicionador de substrato. In: FURLANI, A. M. C. **Caracterização, manejo e qualidade de substratos para produção de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2002.95. (Documentos IAC, 70).
- 43 LEDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; VIEIRA, G.S.S. Estabelecimento inicial de segmentos de ráquulas de coqueiro anão em diferentes condições de cultura in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 4p. 2004.
- 44 LIEW, T.K.; TEO, C.K.H. Multiple shoot production in vitro of the tropical timber tree, sentang (*Azadirachta excelsa* Linn.). **HortScience** , v.33, n.6. p.1073-1075. 1998.
- 45 LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Comb.Proc.Intl.Plant.Prop.Soc.**, v.30, p. 421-427, 1980.
- 46 MAENE, L. & DEBERGH, P. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. 1985. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** v.5, p. 23-33.
- 47 MARTINS, L.; PEDROTTI, E.L. Enraizamento in vitro e ex vitro dos porta-enxertos de mavcieira M7, M9 e Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v.23, n.1, p.11-16, 2001.
- 48 MARTÍNEZ, S.S. (Ed.). **O nim _ *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Iapar. 142p. 2002.
- 49 McCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.7, p. 797-800, 1990.
- 50 MENDONÇA, V.; NETO, S.E.A.; RAMOS, J.A.; PIO, R.; GONTIJO, T.C.A. Diferentes substratos e recipientes na formação de mudas de mamoeiro 'sunrise solo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.1, p.127-130. 2003.
- 51 MINAMI, K. Produção de mudas de qualidade em horticultura. São Paulo. Fundação Salim Maluf, 1995. 128p.
- 52 MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.
- 53 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.15, p. 437-497, 1962.
- 54 MURTHY, B.N.S, SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration of neen (*Azadirachta indica* A. Juss). **Plant Cell Reports**. v.17, n. 6-7, p. 469-475. 1998.
- 55 NUNES, J.C.O.; BARPP, A.; ILVA, F.C.; PEDROTTI, E.L. Micropropagação o porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir de cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p. 191-195, 1999.

- 56 PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Multiplicação e aclimatização de macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p. 417-420, 2001.
- 57 PERES, L. E. P. & KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Rep.** v.18. p.1002-1006, 1999.
- 58 PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Aclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: ZIMMERMAN, R.H. (E d). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.
- 59 PIERIK, R.L.M. Cultivo in vitro de las plantas superiores (versão espanhola de MATEO_SAGASTA, L.A.). Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 326p. 1987.
- 60 QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Improved médium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. **Acta Hort.**, Wageningen, v.78, p. 437-442, 1977.
- 61 RAMESH, K. PADHYA, M.A. In vitro propagation of neen, *Azadirachta indica* (A. Juss) from leaf discs. In. **J. Exp. Biol.** v. 28, p. 932-935.1990.
- 62 RIBAS, L.L.F. **Morfogênese in vitro e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. (Peroba-rosa)**. Curitiba, 1999. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- 63 RIBAS, L.L. F; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv. Gala através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.1, p.39-43,1992.
- 64 RODRIGUES, A.C; SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R.L.; FACHINELLO, J.C.; SILVA, J.B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. Em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, n.1, v.25, p.131-133. 2003.
- 65 SALVI, N.D.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S.; EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** v. 65, p. 159-162. 2001.
- 66 SATO, A; ESQUIBEL, M.A. *In vitro* precocious flowering of *Melia azedarach* hypocotyls segments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, p. 107-110. 1995.
- 67 SHAHZAD, A.; SIDDIQUI, S.A. **Micropropagation of *Melia azedarach*, L.** Phytomorphology 51(2) pp. 151-154, 2001. Golden Jubilee.
- 68 SOUZA, L.L. **Enraizamento e aclimação em diferentes substratos do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' (*Malus prunifolia* Borkh) micropropagadas.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 2004.
- 69 STYLES, B.T. The flower biology of the Meliaceae and its bearing on tree breeding. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.21, n.5, p. 149-204, 1972.

- 70 SUGATHA, M.; CHANDRAN, K. A commercially feasible micropropagation method for *Melia azedarach* L. **Ind. J. Expl. Bot.** v. 35, p. 787-791. 1997.
- 71 TABOADA, L., GULOTTA, C., LÓPEZ, C. – Resultados preliminares del cultivo *in vitro* de paraíso gigante (*Melia azedarach*, L. var. gigantea) mediante gemas axilares. **Revista Quebracho**, v.3. p. 43 – 48.1995.
- 72 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2 ed. Palo Alto. Readward City: The enjamin/Cummings. 1998. 564p.
- 73 TAKAYAMA, S. & MISAWA, M. Differentiation in *Lillium* bulb scales *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. **Physiol. Plant.** 48, p. 121-125. 1980.
- 74 THAKUR, R., RAO P. S., BAPAT V. A. *In vitro* regeneration in *Melia azedarach*, L. In: **Plant Cell Reports**, Springer-Verlag.v.18, n. 1 – 2, p. 127 – 131, 1998.
- 75 TEIXEIRA, D.M.C. **Desinfestação e esterilização**. In: TORRES, A.C; FERREIRA, A.T.; CAMPOS, M.A. Curso de Biologia Celular e Transformação de Plantas, CBAB/CNPH, Brasília/DF, 132 p. 1996.
- 76 TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. – **Cultura de Tecidos e Transformação Gnética de Pantas**. Ed. Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. v.1, p.133 – 145, 1998.
- 77 VILA, S.; GONZALEZ, A.; REY, H.; MROGINSKI, L. **Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segments of *Melia azedarach* L., (*Meliaceae*) seedlings**. In: Comunicaciones Científicas y tecnológicas, BIOONE - Fac. de Ciências Agrarias – UNNE - Universidade Nacional del Nordeste. Article: pp. 746-751, nov 2005.
- 78 VILA, S.K; REY, H.Y.; MROGINSKI, L. **Establecimiento *in vitro* de explantes y regeneracion de plantas de *Meila azedarach*, L.** In: Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, BIOONE – Fac. de Ciências Agrarias – UNNE - Universidade Nacional del Nordeste. Resumen: A-010, 2004.
- 79 VILA, S., A. SCOCCHI, A.; MROGINSKI, L. Plant regeneration from shoot apical meristems of *Melia azedarach* L. (*Meliaceae*). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24. n. 2. p.195-199. 2002.
- 80 WANG, Q. Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock BP10030. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.45, p. 209-213, 1991.
- 81 WEWETZER, A. tissue culture of *Azadirachta indica* (A. Juss) and it potencial for the production of azadirachtina. In: Kleeberg H.; ZEIBITZ, C.P.W. (eds). **Practice Oriented Results on Use and Production of Neem Ingredients and Pheromones**, p. 243-249. Druck and Graphic, Giessen. 1997.

FIGURA 17– (A) Árvore de cinamomo (*Melia azedarach*), variedade comum, com mais de 20 anos de idade, localizada na esquina entre as ruas Recife e Chichorro Júnior, no bairro Juvevê, Curitiba/Pr. Foto tirada em 10/01/2006. (B) Árvore de cinamomo (*Melia azedarach*) variedade sombrinha. Fonte: www.waste.ideal.es/cinamomo.htm. (C) Folhas de *Melia azedarach* composta por 9 folíolos. Fonte: www.forestry.auburn.edu/~chinaberry.htm. (D) Flores da mesma espécie em diferentes estádios de desenvolvimento. Fonte: www.floridanature.org/species.asp?species=melia_azedarach. (E) Frutos carnosos do cinamomo *Melia azedarach* dispostos em ráculos. Fonte: www.tncweeds.ucdavis.edu/photosg-p.html e drupas (F). Fonte: www.semencesdupuy.com. (G) Fruto de *Melia azedarach*; à direita corte transversal mostrando os lóculos em número de 4, e sementes extraídas do fruto (H). Fonte: www.alpine-plants-jp.com/himitunohanazono. Figuras consultadas online em 19/01/2006.

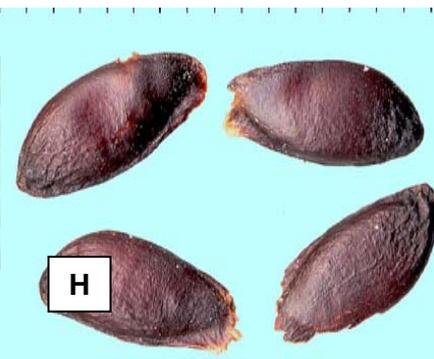
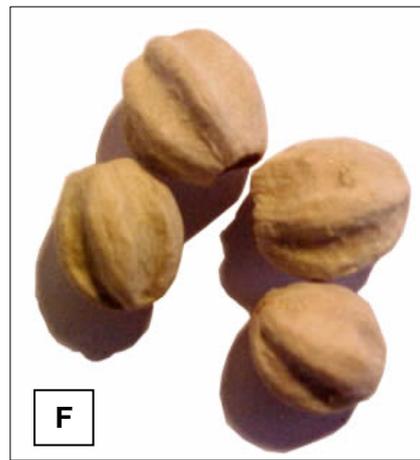


FIGURA 18 – (A) Mudanças de cinamomo (*Melia azedarach*) com 7 meses de idade (dezembro de 2003), trazidas do distrito do Rio do Pinho/SC. Em (B), muda transferida para vaso com vermiculita mantida em casa-de-vegetação, com 9 meses de idade (fevereiro de 2004), sob irrigação manual. (C) Muda com 10 meses de idade, sendo 7 dias após coleta das brotações para estabelecimento *in vitro*. No detalhe, as setas indicam o intenso crescimento vegetativo. (D) Segmento apical fracionado para desinfestação sob condições assépticas. (E) Segmento uninodal de cinamomo com 10 mm após a desinfestação e após padronização para o isolamento, com 5 mm para isolamento (F). Segmento nodal de isolado em meio de cultura (G) e desenvolvimento da gema após 15 dias do isolamento (H).

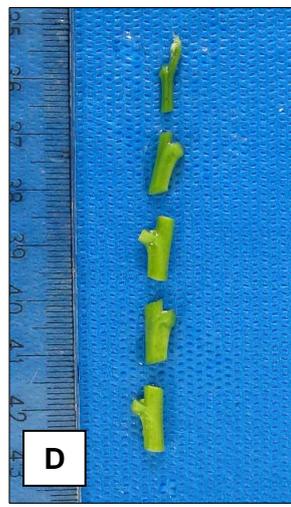
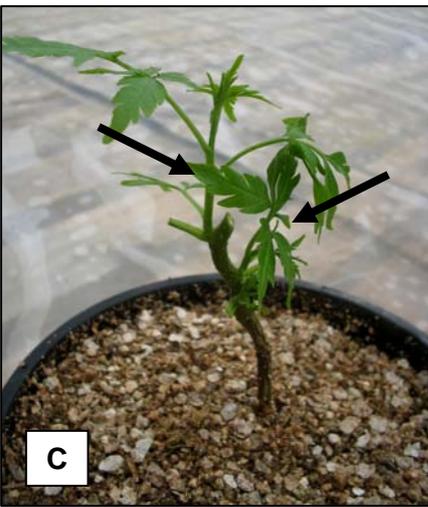
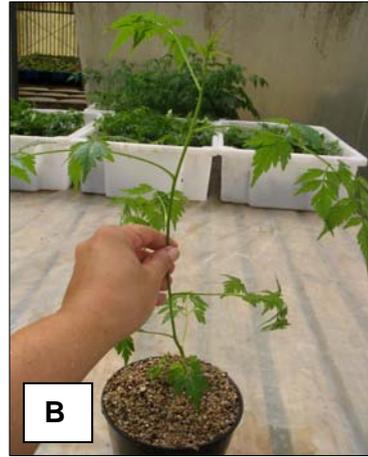
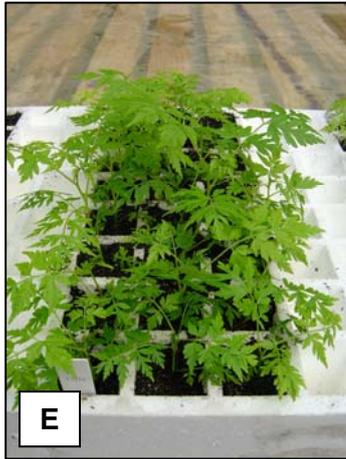
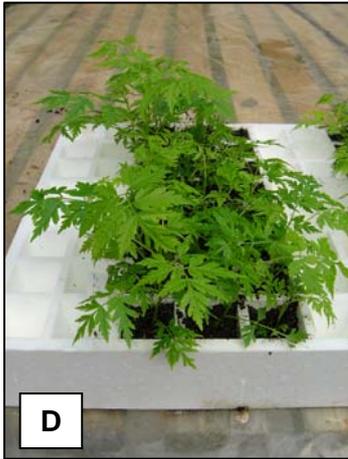
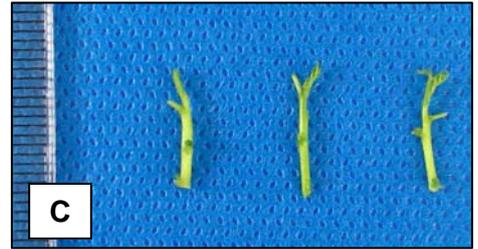
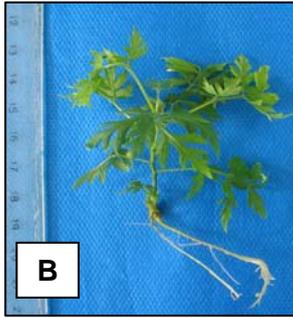
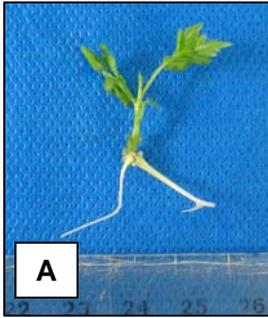


FIGURA 19 – Microestaca enraizada de *Melia azedarach* e mantida em sala de crescimento por 10 dias (**A**) e 21 dias (**B**). Microestacas padronizadas em 15 mm para a etapa de enraizamento *in vitro* (**C**). Mudanças de cinamomo na primeira etapa da aclimatização, em bandejas, submetidas aos tratamentos com 3 substratos: (**D**) Plantmax HT[®]100%; (**E**) Plantmax HT[®]50%+CAC(50%) e (**F**) CAC(100%). Mudanças com torrão formado (**G**) – da esquerda para a direita: Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®] 50%+CAC(50%) e CAC (100%) e em (**E**), as mesmas mudas, porém com raízes nuas para avaliação.



FIGURAS 20 – Muda de cinamomo (*Melia azedarach*): **(A)** transplantada para embalagem de polietileno na segunda etapa da aclimatização; **(B)** em caixas plásticas após o transplantio para embalagens de polietileno na segunda etapa da aclimatização; **(C)** em embalagens de polietileno, submetidas aos tratamentos com 3 substratos, sendo da esquerda para a direita: Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®]50%+CAC(50%) e CAC(100%). **(D)** Muda pertencente ao tratamento com substrato Plantmax HT[®]50% + CAC(50%), com detalhe para as raízes bem desenvolvidas e **(E)** sem a embalagem de polietileno, com torrão formado. da esquerda para a direita: Plantmax HT[®]100%; Plantmax HT[®]50%+CAC(50%) e CAC(100%). Em **(F)**, mudas com raízes nuas para avaliação.



FIGURA 21 – (A) Árvore adulta de cinamomo (*Melia azedarach*) selecionada para matriz doadora de explantes para estabelecimento *in vitro*. Campus do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Curitiba/PR. (B) Segmentos apicais constituídos de brotações novas, de ramos da estação, com 7 a 10 mm de diâmetro e 150 a 200 mm de comprimento. Segmento apical após a eliminação das folhas (C); a seta indica porção do ramo do ano anterior mantida na desinfestação. O mesmo segmento, (D), em imersão em solução de NaOCl. Brotações fracionadas em segmentos uninodais, com 10 mm de comprimento (E). Desenvolvimento dos primórdios foliares de ápices meristemáticos de *Melia azedarach* L., isolados de planta adulta (F).

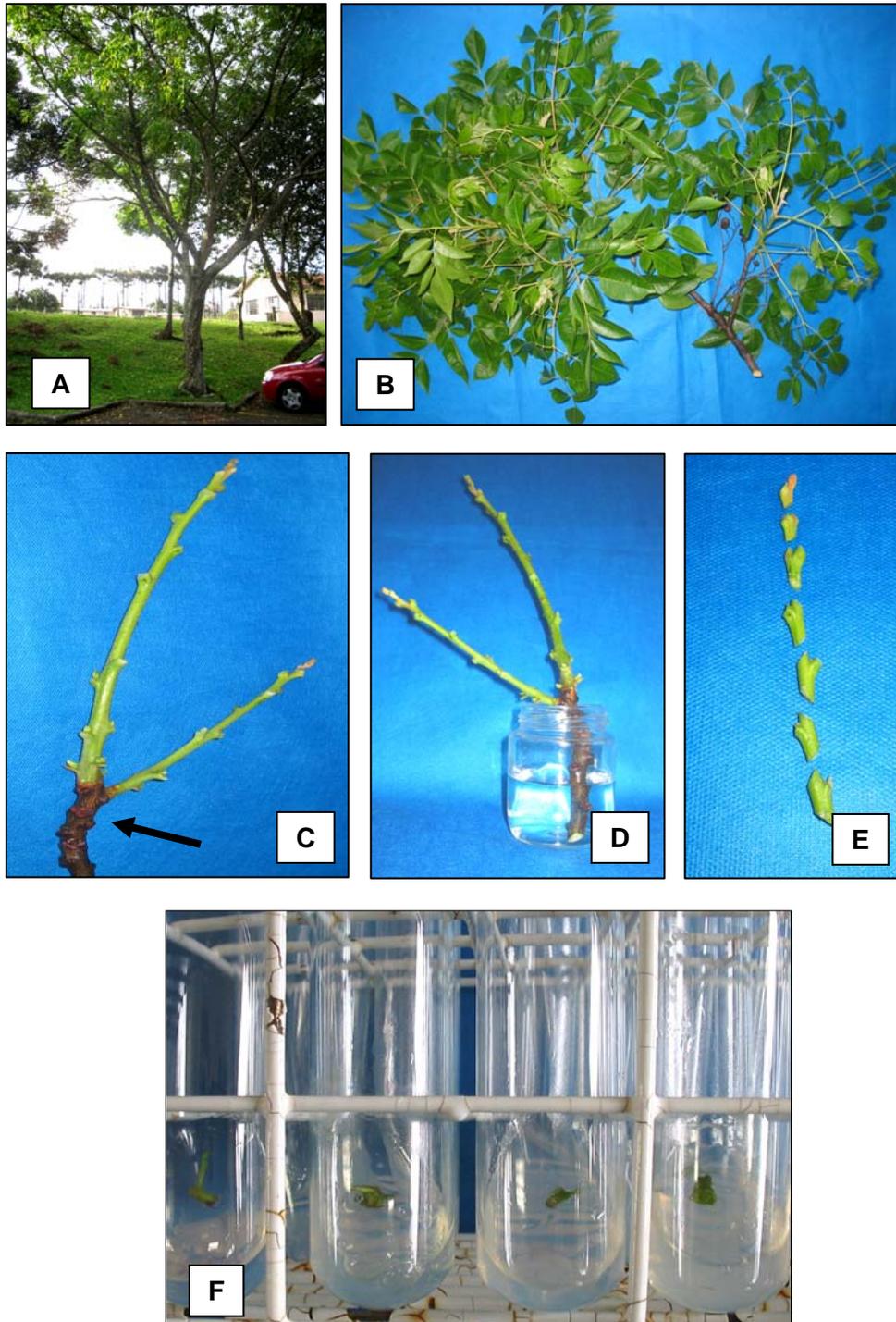
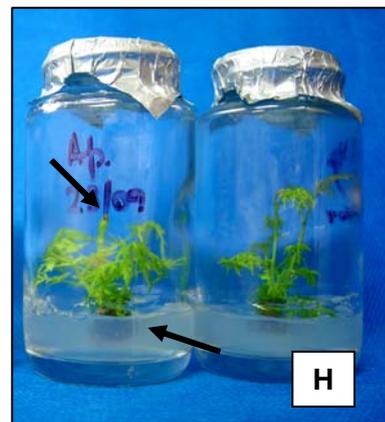
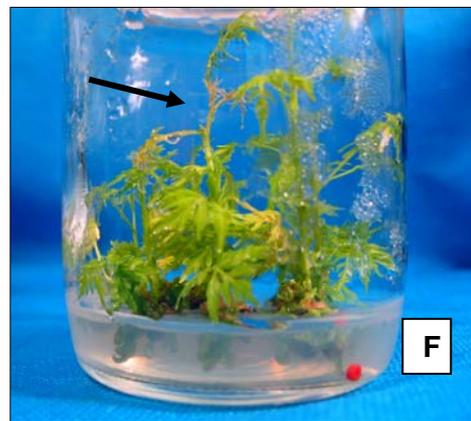
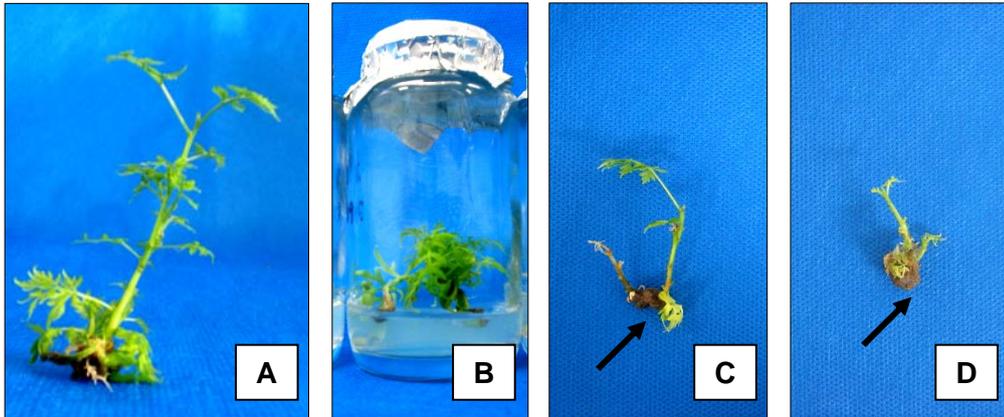


FIGURA 22 –	<p>Avaliações preliminares de multiplicação de segmentos uninodais de cinamomo (<i>Melia azedarach</i>) com BAP, Kin e 2-iP: (A) brotação obtida após 30 dias em meio de multiplicação (MS+1,11 μM BAP), ilustrando a dominância apical e a possibilidade de repicagem por meio de seccionamentos no eixo vertical; (B) Brotação com crescimento desordenado, após 30 dias em meio de multiplicação contendo Kin; (C e D) brotações cloróticas, pouco desenvolvidas, submetidos ao tratamento com a citocinina 2iP. No detalhe, a formação de calo compacto. Avaliações preliminares de multiplicação de segmentos uninodais de cinamomo (<i>Melia azedarach</i> L) com meios básicos de sais de MS, QL e WPM: brotações obtidas com meio MS+1,11 μM BAP (E), com brotações verdes e vigorosas; (F), brotações obtidas com meio QL+1,11 μM BAP, com aspecto frágil e coloração amarelada. Ainda, em F, a seta indica ocorrência de necrose apical. Avaliações preliminares de multiplicação de segmentos uninodais na presença e ausência de carvão ativado em meio MS+1,11 μM BAP): (G) brotação em meio com 0,2% (m/v) de carvão ativado e (H), o mesmo meio, porém sem o carvão ativado, onde as setas inferiores indicam a formação de calo na base das brotações e as setas superiores indicam ocorrência de necrose apical dos brotos</p>
-------------	---



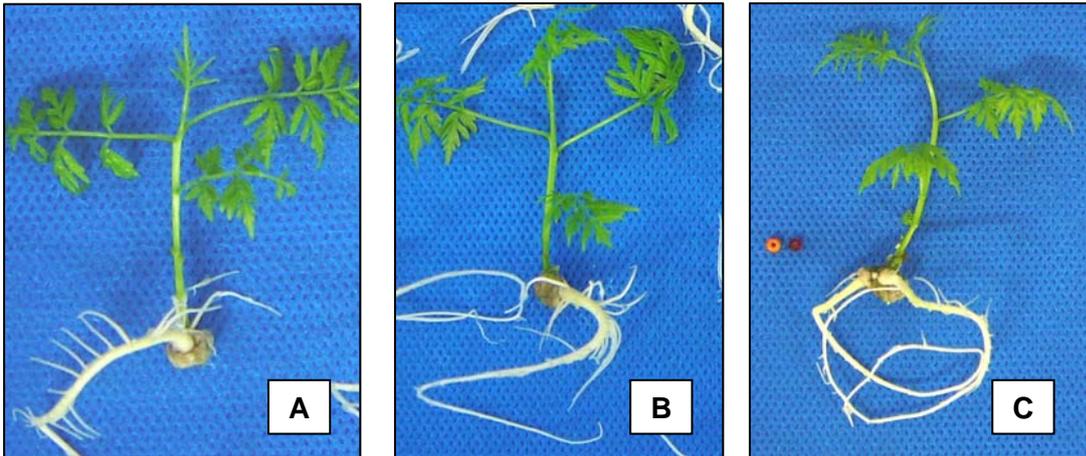


FIGURA 23 – Microestacas de *Melia azedarach* L. enraizadas em meio (A) MS/2+2,46 μM de AIB (incremento na altura do caule); (B) MS/2+4,92 μM de AIB (número de raízes e porcentagem de enraizamento); (C) MS+9,84 μM de AIB (número de raízes).

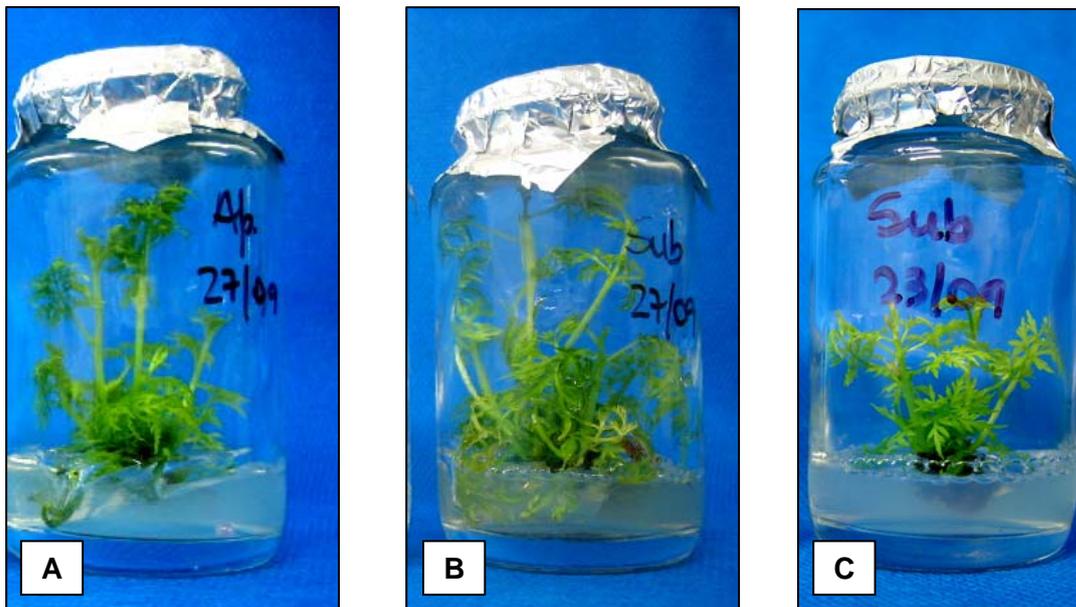


FIGURA 24 – Microestacas de *Melia azedarach* L. multiplicadas em meio (A) MS+1,66 de BAP (apical); (B) MS+1,66 μM de BAP (subapical) – número de brotos e de gemas por explante; (C) MS+3,33 μM de BAP (subapical) – número de brotos e formação de calo na base da brotação.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)