

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

PROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE *Trichilia catigua* A. JUSS (CATIGUÁ)

JANICE VALMORBIDA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia – (Horticultura)

BOTUCATU – SP

MAIO – 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

PROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE *Trichilia catigua* A. JUSS (CATIGUÁ)

JANICE VALMORBIDA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carmen Sílvia Fernandes Boaro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia – (Horticultura)

BOTUCATU – SP

MAIO – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Valmorbida, Janice, 1968-
V196p Propagação da espécie *Trichilia catigua* A.Juss (Catigua) / Janice Valmorbida. - Botucatu : [s.n.], 2007.
xviii, 91 f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2007
Orientador: Carmen Sílvia Fernandes Boaro
Inclui bibliografia.

1. Plantas - Propagação in vitro. 2. Plantas lenhosas. 3. Germinação. 4. *Trichilia catigua*. 5. Plantas medicinais.
I. Boaro, Carmen Sílvia Fernandes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE Trichilia catigua A. Juss (catiguá)"

ALUNA: JANICE VALMORBIDA

ORIENTADORA: PROFª DRª CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO

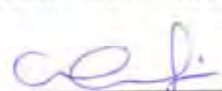
Aprovado pela Comissão Examinadora




PROFª DRª CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO



PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES



PROFª DRª GIUSEPPINA PACE P. LIMA



PROF. DR. MARCOS ROBERTO FURLAN



PROF. DR. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Data da Realização: 21 de maio de 2007.

Dedico

A quem riu, chorou, se emocionou, trabalhou e se dedicou em cada dia do meu doutorado, sempre junto, confiante e incansável. Meu grande e sempre amor, André Thaler Neto.

Agradecimentos

A Deus, pela vida, pelas bênçãos de cada dia e pela certeza de sua presença em cada instante, em cada lugar onde se possa ver o céu azul.

À Prof^ª Dr^ª. Carmen Sílvia Fernandes Boaro, pela orientação, amizade, ajuda, sugestões e críticas na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Horticultura) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Professor Lin Chau Ming pela sua sabedoria com as plantas medicinais e pela atenção que sempre me dispensou. Um muito obrigado extensivo a sua família pela ajuda na localização da planta.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Santa Catarina - Epagri, pelo financiamento da pesquisa, disponibilização dos laboratórios e estruturas necessárias ao desenvolvimento do trabalho. À Estação Experimental de Itajaí – Itajaí (SC), onde iniciei meus trabalhos, em especial ao Dr. Zaffari, ao pesquisador Amaury, pelo convite de desenvolvimento do trabalho. Ao pesquisador, grande amigo e irmão de fé, Airton Salerno, que se empenhou para que meu trabalho se desenvolvesse, por estar sempre disposto a me ajudar e me escutar. À laboratorista Cristiane, pela ajuda e amizade. À Estação Experimental de Lages (SC), onde o trabalho teve continuidade e conclusão, especialmente à gerência e chefia, pela concordância em disponibilizar suas instalações, equipamentos e materiais em benefício do meu trabalho. A todos os funcionários da estação, sempre colaboradores, atenciosos e prestativos.

Um agradecimento especial ao Dr. Antonio Oliveira Lessa, pesquisador da Epagri – Estação Experimental de Lages, Lages (SC), que confiou e me passou muita confiança, conhecimento e atenção.

Aos meus amigos da Epagri José Rech, Maria Aparecida e Aleksander, que com ajuda, palavras de ânimo, ensinamentos e paciência, estiveram a meu lado.

Aos funcionários da FCA, em particular à Elisabete M. de Almeida, do setor de Horticultura e à Jaqueline Gonçalves, Kátia Duarte, Marlene de Freitas e Marilena do C. Santos, da Seção de Pós-Graduação, pela disponibilidade e prontidão na resolução dos problemas.

À Prof^a Dr^a. Renata Fonseca, do Curso de Engenharia Floresta, UNESP – Botucatu (SP) e aos seus colaboradores pela atenção e disponibilidade na coleta e envio de sementes de *Trichilia catigua*.

A todos os funcionários do Centro de Treinamento da Epagri de São Miguel do Oeste pela acolhida e atenção dedicada. Ao Sr. Paulo por disponibilizar seus funcionários e locais para a coleta em São Miguel do Oeste (SC). Ao Sr. Eloy, incansável na procura e coleta da planta na mata.

Ao Sr. Walderes e a sua família, por toda a atenção, dedicação e ajuda na coleta das estacas na Linha Grápia, Paraíso (SC).

Ao Professor Dr. José Marcelo Torezan e a Professora Dra. Alba Lúcia Cavalheiro do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas da Universidade Estadual de Londrina, pela disponibilização de mudas e visitas às áreas de ocorrência na região. Um agradecimento especial ao colaborador Sr. Edi, pela ajuda nas coletas e pelo cuidado na preservação da espécie.

Ao Laboratório Catarinense pelo interesse na propagação da espécie e por financiar as viagens de coleta. Um agradecimento especial ao Sr. Carlos Eduardo de Carvalho, Sra. Ana Carolina Schwarz, Sr. Luc Raes e Sr. Jessé Lagos, que estiveram envolvidos durante a realização do trabalho.

Ao Dr. André Thaler Neto, professor da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), pela ajuda nas análises e interpretações estatísticas.

Aos meus familiares, pai, mãe, meus irmãos Ney e Andréa. Foi muito tempo de ausência, mas o amor e a gratidão são muito maiores pela certeza da confiança.

Ao Sr. André Jacob Thaler e Elisabeth Thaler, meus sogros, pelo carinho, confiança, dedicação, trabalho e ajuda que sempre dedicaram.

Aos meus grandes, maravilhosos e eternos amigos, Andréa Aparecida, Joseane Scavroni, Evelize de Fátima, Leonardo Ferreira, Jamille Casa, Nádia Cristina, Ana

Valéria Souza, Roselaine, Elaine Buch, Alexandre Geisel, Cinei, Lisiane, todas as palavras vindas de vocês fazem um bem enorme na trajetória dessa vida.

Muitas pessoas estiveram presentes, por curtos ou longos períodos, com dicas, experiências, testemunhos e ajuda. A todos, meu Muito Obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xiv
1. RESUMO	xv
2. SUMMARY	xvii
3. INTRODUÇÃO	1
4. REVISÃO DA LITERATURA	4
4.1 Família Meliaceae.....	4
4.2 A espécie <i>Trichilia catigua</i> A. Juss.....	5
4.3 Importância Medicinal, Inseticida e Fitoquímica.....	11
4.4 Atividades farmacológicas	12
4.5 Propagação Vegetativa	14
4.5.1 Enraizamento de estacas.....	14
4.5.1.1 Características da planta mãe	15
4.5.1.2 Características das estacas	16
4.5.1.3 Ambiente de enraizamento	17
4.5.1.4 Efeito das auxinas e outros promotores de crescimento vegetal no enraizamento.....	18
4.5.2 Cultura de tecidos ou micropropagação	20
4.5.2.1 Fonte de explante.....	22
4.5.2.2 Desinfestação.....	22
4.5.2.3 Meio de cultura.....	23
4.5.2.4 Reguladores vegetais	24
5. OBJETIVO	27
5.1 Objetivo geral	27
5.2 Objetivo específico	27

6. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
6.1 Condições gerais dos experimentos.....	28
6.1.1 Material para enraizamento de estacas.....	28
6.1.2 Material para cultura de tecidos.....	29
6.1.3 Sementes.....	30
6.2 Avaliação de enraizamento de estacas.....	30
6.2.1 Ensaio de enraizamento.....	31
6.2.2 Enraizamento nas estações do ano.....	32
6.2.3 Enraizamento primavera 2006.....	34
6.3 Avaliação em cultura de tecidos.....	34
6.3.1 Meio de cultura e frascos de cultivo.....	35
6.3.2 Experimento de assepsia do material vegetativo.....	35
6.3.2.1 Experimento 1 - assepsia com HgCl ₂	36
6.3.2.2 Experimento 2 - assepsia com hipoclorito.....	37
6.3.2.3 Experimento 3 – NaOCl x HgCl ₂	38
6.3.3 Assepsia e germinação de sementes.....	39
6.3.4 Experimento de multiplicação.....	40
6.3.4.1 Experimento BAP + GA ₃	41
6.3.4.2 Experimento BAP com NAA associado a GA ₃	41
6.3.4.3 Experimento com variação de GA ₃	42
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
7.1 Avaliação de enraizamento de estacas.....	44
7.1.1 Ensaio de enraizamento.....	44
7.1.2 Enraizamento nas estações do ano.....	46
7.1.3 Enraizamento Primavera 2006.....	49
7.1.4 Resumo dos dados entre as estações.....	51
7.2 Cultura de tecidos.....	54
7.2.1 Explantes de matrizes.....	54
7.2.1.1 Experimento 1 – Assepsia HgCl ₂	54
7.2.1.2 Experimento 2 – Assepsia com hipoclorito.....	56
7.2.1.3 Experimento 3 – NaOCl x HgCl ₂	58
7.2.1.4 Fase de estabelecimento.....	60
7.2.2 Sementes.....	61
7.2.2.1 Assepsia e germinação de sementes.....	62
7.2.2.2 Multiplicação com explantes provenientes de sementes.....	65
7.2.2.3 Multiplicação com BAP e GA ₃	65
7.2.2.4 Multiplicação com BAP e NAA associado a GA ₃	66
7.2.2.5 Experimento com variação de GA ₃	69
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
9. CONCLUSÕES.....	74
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
10. ANEXOS.....	88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados de coletas e diâmetro de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss realizadas no Local I e Local II.33
- Tabela 2.** Percentagem de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, comprimento e diâmetro de raízes das partes apicais e medianas de *Trichilia catigua* A. Juss tratadas com reguladores vegetais no ensaio primavera 2004.....45
- Tabela 3.** Percentagem de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, comprimento e diâmetro de raízes das partes apicais e medianas de *Trichilia catigua* A. Juss tratadas com reguladores vegetais e mantidas em substrato areia lavada na estação de verão 2004/2005 e primavera 2005.47
- Tabela 4.** Percentagem de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, comprimento e diâmetro de raízes das partes medianas de *Trichilia catigua* A. Juss tratadas com reguladores vegetais e mantidas em substrato areia lavada na estação primavera 2006.50
- Tabela 5.** Percentagem de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss enraizadas nos vários experimentos realizados na primavera 2004, verão 2004/primavera 2005 e primavera 2006, segundo os tratamentos em cada época.....52
- Tabela 6.** Efeito da concentração e do tempo de exposição dos explantes de *Trichilia catigua* A. Juss, ao agente de desinfestação cloreto de mercúrio (HgCl_2) sobre a taxa de sobrevivência (% viáveis).....54
- Tabela 7.** Efeito da concentração e do tempo de exposição, dos explantes de *Trichilia catigua* A. Juss, ao agente de desinfestação Cloreto de mercúrio (HgCl_2) sobre a percentagem de oxidados.....55

- Tabela 8.** Assepsia de explantes de matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss mantidas em casa de vegetação, submetidos aos agentes de desingestação. Percentual de sobreviventes, contaminados com fungos e bactérias.57
- Tabela 9.** Efeito dos agentes desinfestante e do uso do antibiótico Rifampicina na percentagem de contaminados com fungos e bactérias em explantes de matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss.....59
- Tabela 10.** Efeito do agente desinfestante e do uso do antibiótico Rifampicina na percentagem de explantes de *Trichilia catigua* A. Juss oxidados e sobreviventes.....60
- Tabela 11.** Número de sementes de *Trichilia catigua* A. Juss avaliadas, percentagem de contaminadas por fungos e germinadas. Coleta em Botucatu (SP) em dezembro de 2005 e submetidas aos tratamentos de assepsia.63
- Tabela 12.** Influência do benzilaminopurina (BAP) e do ácido giberélico (GA₃) no número de folíolos de explantes de *Trichilia catigua* A. Juss aos 30 e 60 dias após o corte de plântulas germinadas *in vitro*.....65
- Tabela 13.** Influência do benzilaminopurina (BAP) e do ácido giberélico (GA₃) na percentagem de explantes com entrenós e com brotações aos 30 e 60 dias após o corte de plântulas de *Trichilia catigua* A. Juss germinadas *in vitro*.....66
- Tabela 14.** Efeito da benzilaminopurina (BAP) com ácido naftaleno acético (NAA) associado a ácido giberélico (GA₃) na percentagem de explantes com entrenó aos 30 e 60 dias após corte de plântulas de *Trichilia catigua* A. Juss germinadas *in vitro*.67
- Tabela 15.** Efeito do benzilaminopurina (BAP) com ácido naftaleno acético (NAA) mais ácido giberélico (GA₃) na percentagem de explantes com brotação aos 30 e 60 dias após o corte de plântulas de *Trichilia catigua* A. Juss germinadas *in vitro*.68
- Tabela 16.** Efeito das concentrações de GA₃ e NAA sobre a percentagem de explantes de *Trichilia catigua* A. Juss provenientes de plântulas germinadas de sementes *in vitro*, com formação de calo na base.70
- Tabela 17.** Efeito das concentrações de GA₃ e NAA sobre o número de repicagens provenientes explantes de plântulas germinadas de sementes *in vitro* de *Trichilia catigua* A. Juss.....71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Folhas de *Trichilia catigua* A. Juss. Detalhe do folíolo do último par. Seta traço representa comprimento; seta sólida, a largura do folíolo. **Fonte:** Fotos da autora. .6
- Figura 2.** Inflorescências de *Trichilia catigua* A. Juss. Inflorescências reunidas em cachos num curto rebento axilar. **Fonte:** fotos da autora.7
- Figura 3.** Germinação de *Trichilia catigua* A. Juss. Os cotilédones são elevados acima da superfície. **Fonte:** fotos da autora.....8
- Figura 4.** Frutos e sementes de *Trichilia catigua* A. Juss. Sementes medem, em média, 0,8 cm. **Fonte:** fotos da autora.9
- Figura 5.** Plantas matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss doadoras de propágulos para a cultura de tecidos. **Fonte:** fotos da autora.30
- Figura 6.** Gráfico das temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) mínimas e máximas mensais dos anos de 2004, 2005, 2006 e 2007. Fonte: Estação Meteorológica da Epagri, Lages (SC).45
- Figura 7.** Mudas de *Trichilia catigua* A. Juss enraizadas na primavera 2004. Idade de 24 meses em dezembro de 2006. Foto da autora.46
- Figura 8.** Percentagem de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss enraizadas na primavera 2006, em função das concentrações do ácido indolbutírico (IBA) utilizadas.53
- Figura 9.** Aspecto dos explantes provenientes de matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss após longo período em meio de cultura. (A) Queda dos folíolos; (B) Clorose dos folíolos; (C) Folíolos modificadas; (D) Encurtamento dos entrenós.....61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Análise do solo das matas de coleta da espécie <i>Trichilia catigua</i> . Local I.	89
Anexo 2. Análise do solo das matas de coleta da espécie <i>Trichilia catigua</i> . Local II.	90
Anexo 3. Confirmação da identificação da espécie <i>Trichilia catigua</i> A. Juss.....	91

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
μM	Micromolar
μmol m ⁻² s ⁻¹	Micromol(es) por metro quadrado por segundo
IBA	Ácido indolbutírico
AND	Meio de Anderson (1980)
atm	Atmosfera(s) de pressão
BAP	Benzilaminopurina
CaOCl ₂	Hipoclorito de cálcio
cm	centímetros
cv.	cultivar
g L ⁻¹	Gramas por litro
GA ₃	Ácido giberélico (2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8metileno-gib-3-ene-1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona)
HgCl ₂	Cloreto de mercúrio
IAA	Ácido 3-indolacético
MS	Meio de Murashige & Skoog (1962)
MS/2	Meio de Murashige & Skoog (1962) com a concentração de sais reduzida à metade
NAA	Ácido naftalenoacético
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
QL	Meio de cultura de Quorin & Lepoivre (1977)
TDZ	Thidiazuron (N-fenil-N'- 1, 2, 3 – tiadizol – 5-1-ureia)
v/v	Relação volume/volume
WPM	Meio de cultura Woody Plant Medium de Lloyd & McCown (1986)

1. RESUMO

PROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE *Trichilia catigua* A. Juss (CATIGUÁ)

RESUMO: Pertencente à família Meliaceae, a espécie *Trichilia catigua* A. Juss é conhecida popularmente como catigua, cataguá, argelim-rosa e mangalto-catingam. Sua casca apresenta propriedades adstringente, inseticida, purgativa, tônica, bactericida, antiinflamatória e antidepressiva. Com o objetivo de propagar a espécie *T. catigua* foram desenvolvidos experimentos testando o enraizamento de estacas e a micropropagação com explantes de matrizes e sementes. Os experimentos de enraizamento de estacas foram realizados na primavera 2004, verão 2004/2005, outono, inverno e primavera 2005 e primavera 2006. Em todos os experimentos, estacas com aproximadamente 15 cm de comprimento foram coletadas de árvores adultas e preparadas da parte apical e mediana dos ramos. A seguir, foram submetidas aos reguladores vegetais IBA (ácido indolbutírico), NAA (ácido naftalenoacético) e IAA (ácido 3-indolacético), variando as dosagens. Para a avaliação dos experimentos determinou-se a percentagem de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas e quando enraizadas, seu comprimento e diâmetro. No experimento primavera de 2004 foram testadas as concentrações de 1000 e 2000 mg L⁻¹ dos reguladores vegetais IBA, NAA e IAA. As avaliações aos 90 dias após sua instalação revelaram maiores percentagens de enraizamento e iguais a 33,33, 25,00, 22,91 e 23,43 % para estacas submetidas a IBA 1000, 2000 mg L⁻¹ e NAA 1000 e 2000 mg L⁻¹, respectivamente. No verão 2004/2005, outono, inverno e primavera 2005 os experimentos foram conduzidos com as concentrações dos reguladores IBA, NAA e IAA iguais a 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹ e as avaliações foram realizadas após 120 dias. Não houve enraizamento no outono e inverno. A análise conjunta dos resultados obtidos na primavera e no verão mostrou percentagem de enraizamento superior na primavera. A maior percentagem de enraizamento, igual a 19,17%, foi obtida com IBA 3000 mg L⁻¹. Na primavera de 2006 foram testados IBA nas concentrações de 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 mg L⁻¹ e

NAA nas de 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹. A maior percentagem de enraizamento, igual a 41,67% foi obtida com IBA 5000 mg L⁻¹. No cultivo *in vitro*, os explantes coletados nas matrizes foram submetidos a tratamentos de assepsia com HgCl₂, CaOCl₂ e NaOCl e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog) com 25% da concentração dos sais. As melhores percentagens de sobrevivência foram obtidas com a utilização de HgCl₂ 0,05%, durante cinco minutos e NaClO 1,5% , durante 15 minutos. Experimentos de multiplicação *in vitro* utilizaram explantes de plântulas obtidas da germinação de sementes de *T. catigua*. O efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) e do GA₃ (Ácido giberélico) foi avaliado pela percentagem de explantes com brotações e entrenós, aos 30 e 60 dias após o corte do epicótilo da plântula. A concentração de 1,44 µM de GA₃, na ausência de BAP, resultou em maior percentagem de plantas com brotações aos 60 dias. No experimento com BAP e NAA associado a GA₃ observou-se interação entre as concentrações de BAP e NAA associado a GA₃. Em baixas concentrações de BAP houve maior percentagem de explantes com brotações ao empregar-se o NAA associado a GA₃. Porém, no experimento com 0,44 µM de BAP, diferentes concentrações de GA₃ na presença ou ausência de NAA, não afetaram o número de cortes provenientes de brotações dos explantes. Os resultados obtidos permitem concluir que a primavera é a melhor estação para enraizamento de estacas, realizadas tanto da parte apical como da mediana dos ramos, sendo sugerida a dose de 5000 mg L⁻¹ de IBA. A utilização de explantes juvenis, obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* facilita o cultivo asséptico. Os reguladores BAP, NAA e GA₃ adicionados aos meios de cultura MS e MS com 50% da concentração dos sais, não possibilitaram os subcultivos de material juvenil de *T. catigua*.

Palavras-chave: enraizamento, estacas, *in vitro*, lenhosa, sementes

2. SUMMARY

PROPAGATION OF *Trichilia catigua* A. Juss (CATIGUÁ). Botucatu, 2007. 91f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Janice Valmorbida

Adviser: Carmen Sílvia Fernandes Boaro

The *Trichilia catigua* A. Juss from the Meliaceae family is popularly known as catigua, cataguá, argelim-rose and mangalto-catingam. Its bark has astringent, insecticide, purgative, tonic, bactericide, anti-inflammatory and antidepressant properties. With the aim of propagate *T. catigua*, experiments of rooting with stem cuttings and of micropropagation with explants of trees and seeds were carried out. In all the rooting experiments the stem cuttings with approximately 15 cm of length were collected from adult trees and prepared from the apical and intermediate parts. The cuttings were immersed in the vegetable regulators IBA (Indole-3-butyric acid), ANA (Naphthalene acetic acid) and IAA (Indole-3 acetic acid). The rooted stem cutting and not rooted stem cutting percentage and, when rooted, the length and diameter of roots, were evaluated. In the experiment spring 2004 the concentrations of 1000 and 2000 mg L⁻¹ of IBA, ANA and IAA were tested, with evaluations 90 days after installation. The highest rooting percentage were 33,33, 25,00, 22,91 and 23,43% for IBA 1000, 2000 mg L⁻¹ and ANA 1000 and 2000 mg L⁻¹, respectively. In the summer of 2004/2005, autumn, winter and spring of 2005 IBA, ANA and AIA, with concentration of 1000, 2000 and 3000 mg L⁻¹, were tested. The evaluation was carried out at 120 days. No rooting was observed in autumn and winter. The analysis of data from summer and spring showed higher rooting percentage in spring. The highest rooting percentage was obtained with IBA 3000 mg L⁻¹ (19,17%). In the spring 2006 IBA (1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 mg L⁻¹) and ANA (1000, 2000, 3000 mg L⁻¹) were tested. The highest rooting percentage (41,67%) was obtained with IBA 5000 mg L⁻¹. In the *in vitro* cultivation, explantes obtained from trees were submitted to asepsis treatments with HgCl₂, CaOCl₂ and NaOCl and inoculated in Murashige & Skoog culture medium (MS) with

25% of salts concentration. The best survival percentage was obtained with HgCl_2 0,05% during 5 minutes and NaClO 1,5% during 15 minutes. *In vitro* multiplication experiments used explants obtained by seedling of *T. catigua* seeds. The effect of BAP (Benzilaminopurine) and GA_3 (Gibberellic acid) was evaluated by percentage of explants with shoots and internodes 30 and 60 days after the excision of epicotile of the seedling. The concentration of 1,44 μM of GA_3 , in the absence of BAP, resulted in higher percentage of plants with shoots at 60 days. In the experiment with BAP and ANA associated to GA_3 interaction between the concentrations of BAP and the use of ANA associated to GA_3 was observed. In low concentrations of BAP higher percentage of explantes with shoots were obtained using ANA associated to GA_3 . However, in the experiment with 0,44 M of BAP, different concentrations of GA_3 in the presence or absence of ANA, didn't affected the number of shoots obtained by excision of explantes. The results allowed to conclude that the spring is the best season for rooting of cuttings, from the apical as much as intermediate part. IBA 5000 mg L^{-1} provides higher rooting percentage. The use of juvenile explants from seedlings, germinated *in vitro*, allowed aseptic cultivation. The use of BAP, ANA and GA_3 in the MS and half MS culture medium didn't allowed the subculture of juvenile material from *T. catigua*.

Key words: Rooting, stem, *in vitro*, wood, seeds

3. INTRODUÇÃO

O conhecimento popular é uma ferramenta na descoberta de novos fitoterápicos e medicamentos. Enquanto o conhecimento está com curandeiros, mateiros e comunidades indígenas, a exploração da espécie vegetal com princípios ativos é feita de forma controlada, conforme as necessidades individuais. Quando há divulgação do poder de cura da espécie ocorre uma busca e extração sem limites. Essa corrida extrativista diminui o número de espécies nas matas, estreitando com isso a base genética das populações. Segundo Sato et al. (2001), antes que a espécie torne-se importante economicamente, é necessário que sejam desenvolvidos protocolos de conservação, propagação e extração, diminuindo problemas de erosão da espécie.

O processo de domesticação passa por várias etapas, desde a identificação e caracterização do material botânico até o conhecimento de suas exigências ambientais no habitat natural e respostas fisiológicas às condições de cultivo racional (SANTIAGO, 1999).

O crescente interesse com espécies da família Meliaceae, pelo seu valor econômico, medicinal e ecológico, com destaque para *Swietenia macrophylla* (mogno), *Azadirachta indica* (nim) e *Cedrela fissilis* (cedro-rosa), tem contribuído para os estudos com o gênero *Trichilia*. A literatura, para espécies desse gênero, registra trabalhos de localização, da morfologia e desenvolvimento de frutos, da composição química e das atividades

farmacológicas. Porém, são escassos os estudos sobre propagação sexuada ou assexuada. Dentro deste contexto está a espécie *Trichilia catigua* A. Juss.

Conhecida popularmente como catigua, cataguá, argelim-rosa, mangalto-catingam (Klein, 1984), *Trichilia catigua* A. Juss. é uma planta da família das meliaceas.

Popularmente sua casca é usada como adstringente, inseticida, purgativa, tônica, servindo para combater o reumatismo e a hidropisia (KLEIN, 1984). Foram determinados em laboratório atividades antiinflamatória bem como o efeito vasorelaxante (CALIXTO & CABRINI, 1997; ANTUNES et al., 2001; BARBOSA et al., 2004; MENDES & CARLINI, 2007). Como produto comercial, a espécie é encontrada no composto Catuama®, comercializado como tônico, estimulante e afrodisíaco (MENDES & CARLINI, 2007).

O catigua, nas áreas de ocorrência no oeste de Santa Catarina, tem os efeitos medicinais desconhecidos pela população. Esse desconhecimento, aliado ao fato da espécie ser de crescimento lento, torna sua ocorrência limitada pela derrubada em função da pecuária leiteira e de corte, da atividade agrícola e para uso pouco nobre, como para lenha. Muitos agricultores desconhecem a espécie e, por ser esta de crescimento lento, eliminam de suas áreas.

Os relatos sobre propagação sexuada mostram que para *Trichilia catigua* a produção de sementes é irregular, ou seja, num ano produz e no seguinte é diminuída ou ausente. A germinação é dificultada pela presença do arilo nas sementes, que além de atrativo para pássaros e roedores, também são contaminadas por fungos. A falta de indivíduos jovens nas matas de ocorrência demonstra que a regeneração não está ocorrendo naturalmente, de maneira que possa recompor as florestas.

Em laboratório, as sementes apresentam um percentual de germinação relativamente alto. Porém, a dificuldade é constatada na obtenção das sementes já que as plantas produtoras, na maioria das vezes, devido a altura das árvores e o adensamento no interior da mata, não permitem a observação e a coleta.

Outro fator que dificulta a propagação vegetativa é a planta ser lenhosa, de crescimento lento e madeira compacta. Segundo França (2003), a produção de herbáceas medicinais, com ciclo de vida curto, não oferece maiores dificuldades. Entretanto, a

produção de arbóreas, cujas cascas ou raízes contêm substâncias bioativas, frequentemente se constitui em um desafio com limitações relacionadas, principalmente, ao desenvolvimento lento de propágulos e ao não enraizamento.

Insucessos ocorreram nos diversos estudos já realizados quando se buscou enraizar estacas de plantas medicinais lenhosas pelo método convencional, sendo necessário a utilização de reguladores vegetais (PIVETTA et al., 2002). Além disso, outros fatores devem ser observados como época de coleta, posição dos ramos nas matrizes, presença de folhas, a fitossanidade e condições fisiológicas das plantas doadores das estacas e dos explantes.

As técnicas de micropropagação são ferramentas de grande importância e interesse, pois permitem obter um grande número de plantas em espaço e tempo reduzidos, com controle das contaminações, além de permitir que a produção seja planejada segundo a melhor época de demanda.

São registrados na literatura muitos protocolos de micropropagação de espécies da família meliaceae. Porém, para a espécie *Trichilia catigua*, não foram encontrados registros dessa técnica tampouco da propagação via enraizamento de estacas. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo de propagação para a espécie *Trichilia catigua* A. Juss, utilizando as técnicas de propagação vegetativa através do enraizamento de estacas e da micropropagação, visando a obtenção de mudas aptas a recompor as florestas e para produção comercial.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Família Meliaceae

A família Meliaceae pertence à ordem Sapindales, compreendendo cerca de oito gêneros neotropicais e 120 espécies, distribuídos por toda a Região Neotropical. Dezesseis espécies, agrupadas em quatro gêneros, ocorrem como espécies arbóreas e nativas na Região Sul do Brasil. Os gêneros *Cedrela*, *Trichilia* e *Swietenia*, são responsáveis por grande parte da madeira utilizada no mundo. Muitos gêneros desta família produzem vários compostos com ação medicinal e inseticida (LORENZI, 2002; PASTORE, 2003).

O hábito da família constitui-se de árvores e arvoretas de 3 a 30 metros de altura. São encontradas em florestas estacionais decíduas e semidecíduas, apresentando ampla e expressiva distribuição. Ocorrem também na floresta ombrófila densa da encosta atlântica, mesmo em altitudes elevadas (KLEIN, 1984).

As características da família Meliaceae são as folhas alternas, compostas e sem estípulas. As flores são pequenas, cíclicas, diclamídeas, actinomorfas (JOLY, 1985), bissexuadas ou unissexuadas por aborto (PASTORE, 2003). As plantas podem ser andróginas, dióicas, monóicas ou polígamas e havendo pistilóides e estaminódios, estes são muito desenvolvidos, dificultando a distinção de uma flor hermafrodita das flores unissexuais. O ovário é súpero, com um a oito lóculos e um ou dois óvulos superpostos em cada lóculo nas

plantas da subfamília Melioideae ou, três a muitos óvulos seriados na subfamília Swietenioideae (BARROSO, 1991).

Como exemplos brasileiros de Meliáceas destacam-se os gêneros *Cedrela*, o popular cedro, de excelente madeira avermelhada, *Carapa*, *Trichilia* e a *Guarea*, todos com madeira de boa qualidade. O mogno (*Swietenia macrophylla* King), espécie desta mesma família, tem grande valor comercial (JOLY, 1985). Muitos estudos merecem destaque com espécies que apresentam efeito medicinal como *Azadirachta indica* A. Juss., conhecido como nim (CHATTOPADHYAY et al., 1993; ALIERO, 2003), *Melia azedarach* L., o cinamomo, (HAMMAD et al., 2001) e *Turraea wakefieldii* (NDUNG'U et al., 2003), dentre outras.

Várias espécies da família Meliaceae têm atraído a atenção de pesquisadores que buscam a identificação de diversos compostos químicos, principalmente dos limonóides, geralmente relacionados direta e indiretamente a uma aplicação econômica ou medicinal. Segundo Champagne et al. (1992) e Cortez (1993), os limonóides são metabólicos secundários, triterpenos modificados, característicos da ordem Rutales e a maioria das pesquisas realizadas para identificar sua ação têm sido motivadas pelo interesse de encontrar compostos que possam ser usados para aplicações específicas na agricultura e na medicina. Ndung'U et al. (2003) isolaram cinco novos limonóides de raízes de *Turraea wakefieldii*. Três desses novos compostos químicos apresentaram atividade larvicida, quando em contato com larvas dos mosquitos *Anopheles gambiae*.

4.2 A espécie *Trichilia catigua* A. Juss.

Pertencente a família Meliaceae, a espécie *Trichilia catigua* A. Juss. é popularmente conhecida como catigua, catiguá, cataguá, angelim-rosa, mangalto-catinga (KLEIN, 1984).

O catiguá é uma arvoreta ou árvore de 3 a 5 m de altura encontrada no sul do Brasil e pode atingir até 10 m. Possui ramos jovens curtos e eretamente pubescentes até densamente seríceos, cedo tornando-se glabros até marrons, lenticelados. As folhas (Figura 1)

são compostas, imparipinadas ou pinadas com um folíolo do último par orientado no sentido de simular um folíolo terminal (KLEIN, 1984; PASTORE, 2003). Na Figura 1 observa-se folhas com folíolos medindo, em média, 8,15 cm de comprimento e 2,88 cm de largura. Buscando identificar a distribuição geográfica associada ao desenvolvimento da espécie no estado de Santa Catarina, MING & CORREIA JÚNIOR (2002) observaram que alguns indivíduos de *T. catigua* apresentavam folhas mais espessas, com menor quantidade de pêlos ao longo da nervura principal do que os indivíduos da mesma espécie encontrados no estado do Paraná. Isso evidencia a alta plasticidade encontrada na espécie.



Figura 1. Folhas de *Trichilia catigua* A. Juss. Detalhe do folíolo do último par. Seta traço representa comprimento; seta sólida, a largura do folíolo. **Fonte:** Fotos da autora.

É uma planta dióica com flores unissexuais, com inflorescências axilares ou diversas reunidas em cachos num curto rebento axilar (Figura 2), desde um pequeno fascículo até um delgado tirso piramidal, pubescente ou pubérulo (KLEIN, 1984). Contudo, Radford et al. (1974) citado por Moscheta, (1995) caracterizou a espécie como polígamo-dióica baseado no desenvolvimento de apenas alguns frutos em indivíduos unissexuais, tipicamente masculinos, com ocorrência de algumas flores unissexuais femininas ou então andróginas no mesmo indivíduo.

Distribui-se desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, na maioria das formações florestais, ocorrendo preferencialmente nas matas ciliares e mesófilas do interior. A floração dura aproximadamente de 30 a 45 dias em cada indivíduo, predominando de janeiro a maio e os botões florais permanecem no espécime durante cinco a seis meses antes das primeiras anteses. Foi observada a ocorrência de uma segunda floração em alguns indivíduos, porém, menos intensa que a primeira, com nítida sobreposição de botões jovens surgidos após o crescimento e maturação dos botões da primeira floração. A maturação dos frutos leva de quatro a cinco meses e a deiscência ocorre de outubro a novembro. Há registros de coletas no Estado de São Paulo com flores de junho a dezembro (MOSCHETA, 1995; PASTORE, 2003). A germinação é epígea os cotilédones permanecem em parte envolvidos pelos tegumentos (Figura 3). O início da germinação ocorre entre 8 e 12 dias após a sementeira. Aos 13 meses a planta atinge uma altura de 22 a 24 cm (MOSCHETA, 1995).



Figura 2. Inflorescências de *Trichilia catigua* A. Juss. Inflorescências reunidas em cachos num curto rebento axilar. **Fonte:** fotos da autora.

Aspectos morfológicos e estruturais das flores de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw., Meliaceae, foram descritas por Souza et al. (2001) que observaram que a antese ocorreu de abril a agosto na *Trichilia catigua*. As sépalas e

pétalas apresentaram epiderme papilosa e pilosa e um mesofilo parenquimático. As flores masculinas apresentaram pistilos com óvulos abortivos e um tubo estaminal com anteras tetrasporangiáceas. A parede da antera possui uma epiderme papilosa e um endotécio fibroso.



Figura 3. Germinação de *Trichilia catigua* A. Juss. Os cotilédones são elevados acima da superfície. **Fonte:** fotos da autora.

O fruto da *Trichilia catigua* é uma cápsula oblonga, ligeiramente obovada, vermelho-alaranjada e pilosa, abrindo-se por três valvas e expondo uma a três sementes (Figura 4). A cápsula desta espécie pode ser considerada septífraga, uma vez que todo o eixo do fruto, contendo tecidos condutor e placentário, permanece no centro, separado das valvas pela ruptura dos septos (GLÓRIA & GUERREIRO, 2003).

O arilo das sementes de *T. catigua* contém carotenóides que conferem a cor vermelha (Figura 4), enquanto o material lipídico encontra-se contido em idioblastos maiores e mais arredondados. Em sementes armazenadas até sete dias, Moscheta (1995) verificou percentagem de 85,2% de germinação para *T. catigua*. Para as meliaceas *Cabralea canjerana* e *Guarea kunthiana*, a percentagem de germinação foi de 77,4% e 78%, respectivamente. Segundo os autores, a regeneração de *T. catigua* na mata é baixa, poucos indivíduos jovens nas proximidades e mesmo distante das plantas-mãe são encontrados.



Figura 4. Frutos e sementes de *Trichilia catigua* A. Juss. Sementes medem, em média, 0,8 cm. **Fonte:** fotos da autora.

Moscheta (1995) e Beltrame et al. (2006) definem como plântula o período pós-seminal que se estende até o completo desenvolvimento do primeiro par de eófilos e planta juvenil, do período seguinte até o aparecimento do primeiro metafílo. Segundo Moscheta (1995) e Mourão et al. (2002) as plântulas de *T. catigua* germinadas de sementes apresentam raiz axial com numerosas raízes secundárias, hipocótilo glabro, com 0,5 cm de comprimento, cotilédones carnosos e curto-peciolados, epicótilo verde e piloso e eófilos simples e opostos. Na fase de tirodendro, os primeiros metafílos surgem após treze meses de desenvolvimento.

As plântulas e tirodendros de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw., Meliaceae, foram estudados morfológica e anatomicamente por Mourão et al. (2002). Os autores determinaram que as plântulas de *T. catigua* são

fanerocotiledonares, os cotilédones são espessos, com epiderme glabra e o mesofilo é parenquimático. A raiz, da planta originada de semente, é axial e tetraarca. O primeiro eofilo é simples e varia em espessura entre as espécies. O metafile é composto. O eofilo e o metafile não diferem significativamente e estruturalmente entre si caracterizando-se como dorsiventrais, hipoestomáticos e de venação tipo broquidódroma.

Macroscopicamente as cascas da *Trichilia catigua* têm forma plana a levemente encurvada. A superfície externa é acinzentada, variando de tons claros a escuros, com aspecto grosseiramente granuloso. Ocorre a presença de lenticelas circulares pequenas e fendas longitudinais curtas e superficiais, a superfície externa é avermelhada, com fibras finamente estriadas no sentido longitudinal, a fratura é externamente granulosa e internamente fibrosa, o odor não é característico e o sabor é fortemente amargo (MARQUES, 1998).

Quanto a dispersão de sementes, Gondim (1995) relata que uma guilda composta principalmente por aves “generalistas” ou “oportunistas” realizaram um consumo de arilóides. Quanto ao comportamento de consumo, evidenciou-se uma dicotomia entre as aves “engolidoras” e as “mastigadoras”. As aves “mastigadoras” foram consideradas dispersores menos eficientes em relação às engolidoras, as quais defecam ou regurgitam as sementes em condições viáveis de germinação.

Em estudos sobre a estrutura anatômica da madeira de *Trichilia catigua* procedente de Miranda, Mato Grosso do Sul, Paula (1999) descreve a espécie com boa qualidade para geração de energia e apta para produção de papel. Segundo o autor, uma das características das espécies de crescimento lento é produzir menos volume e mais peso em termos de madeira por unidade de tempo e de área, quando comparadas com as espécies de crescimento rápido, que produzem mais volume e menos peso. O fato de uma espécie apresentar crescimento lento não significa baixa produção de biomassa. Ao contrário, ela acumula energia com mais intensidade representada pela alta produção de celulose e lignina.

A espécie tem seu centro de dispersão nos estados do Paraná e Santa Catarina. A distribuição geográfica de ocorrência da *T. catigua* no estado do Paraná compreende uma região vasta, mas bem definida. Esta faixa localiza-se acima da latitude 25° nas regiões central e leste e acima da latitude 26° no sudoeste do Paraná. A caracterização dos ambientes associados demonstrou que a espécie ocorre em solos férteis, ricos em matéria orgânica e protegida pela floresta (CORREA JÚNIOR & MING, 1998).

No estado de Santa Catarina a *T. catigua* ocorre predominantemente em floresta semidecidual estacional, além da transição das florestas de Araucária e Atlântica. Ocorre em solos férteis e ricos em matéria orgânica. A formação geomorfológica predominante é basáltica e os tipos predominantes de solos variam de latossolo vermelho até latossolo vermelho-amarelado além de cambissolo de origem basáltica e granítica. Ocorre em altitudes entre 300 a 600 m (MING & CORREIA JÚNIOR, 2002).

4.3 Importância Medicinal, Inseticida e Fitoquímica

As espécies da família Meliaceae têm sua importância medicinal principalmente na medicina natural, apresentando como propriedades terapêuticas ação antiviral, antihelmíntica, antireumática, antiinflamatória e anticancerígena (MARZALINA & KRISHNAPILLAY, 1999).

Há mais de 20 anos a família Meliaceae vem sendo bastante estudada como a mais promissora fonte de compostos com propriedades inseticidas (HAMMAD et al., 2001; LORENZI, 2002). A ação inseticida das espécies da família Meliaceae é ampla e os materiais utilizados para os estudos vão desde a utilização de extratos aquosos ou etanólicos de folhas, raízes ou calos até o uso dos óleos essenciais. Dentre as espécies mais estudadas destaca-se a *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida como nim (GONÇALVES & VENDRAMIM, 2004).

Vários pesquisadores tem isolado limonóides de diferentes espécies do gênero *Trichilia* e demonstrado sua atividade sobre insetos (ORTEGO et al., 1999). Estudos de Gonçalves & Vendramim (2004) testaram a ação de extratos aquosos e clorofórmicos de *Trichilia pallida* sobre a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). Cunha et al. (2005) observaram que as folhas tem maior eficiência como fonte de substâncias inseticida do que os ramos em extratos aquosos liofilizados de *Trichilia pallida* sobre a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). As espécies *T. quadrijugata*, *T. marítima*, *T. hirta*, *T. pleeana*, *T. americana*, *T. glabra* estudadas por Wheeler et al. (2001) mostraram efeito bioativo sobre a lagarta *Spodoptera litura*.

O isolamento de três sesquiterpenóides do extrato metanólico dos galhos de *Trichilia clausenii* foram realizados por Pupo et al. (2002).

Uma mistura de duas flavalignananas epiméricas (cinchonainas 1b e 2b) foi isolada da fração extraída com acetato de etila das cascas de *T. catigua*. Estas flavalignananas exibiram atividade bactericida contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (PIZZOLATTI et al., 2002).

Com amostras de cascas de *T. catigua* coletadas em Caitié (BA) e Maringá (PR) foi realizada a caracterização farmacognóstica das cascas, confirmando a presença dos grupos de flavonóides, antracênicos livres, taninos e saponinas, bem como a ausência de alcalóides, mucilagens, cumarinas e óleos essenciais. Por meio da reação de Stiasny foi confirmado que os taninos presentes são do tipo condensados (OLIVEIRA et al., 2003).

Pizzolatti et al. (2004) identificaram gama lactonas de *Trichilia catigua* e seus precursores por CG-EM. Análises das frações clorofórmicas do extrato das cascas desta espécie levaram à identificação de três ômega-fenil-ácidos alcanóides, cinco ômega-fenil-gama lactonas, duas alquil-gama lactona, uma alquenil-gama lactona, além de uma mistura de ácidos graxos de C14 a C26. Também foram identificados o beta-sitosterol, estigmasterol e campesterol como álcoois livres.

Utilizando a técnica de CLAE-ultravioleta (UV)-EM foi desenvolvido um método para a distinção dos extratos das espécies *Trichilia catigua* e *Anemopaega arvensis*, ambas comercializadas no Brasil como catuaba. O método se demonstrou útil para análises de fitoterápicos contendo catuaba, podendo ser empregado no controle da qualidade dos fitoterápicos (BELTRAME et al., 2004).

4.4 Atividades farmacológicas

Vários trabalhos têm demonstrado os efeitos benéficos das cascas de *T. catigua*. Segundo Vaz et al. (1997), o extrato hidroetanólico das cascas de *Trichilia catigua* pode ter efeitos antinociceptivos relacionados ao sistema opióide, diminuindo o número de

contrações abdominais e em consequência, a dor. A ação vasodilatadora do extrato hidroetanólico de *Trichilia catigua* foi investigada e comparada com a ação da acetilcolina. O extrato hidroetanólico de *Trichilia catigua* causou efeito vasorelaxante em aorta de rato (CALIXTO & CABRINI, 1997). Em trabalho de Antunes et al. (2001) o extrato hidroetanólico das cascas de *T. catigua* provocou, de forma dose dependente, efeito relaxante de longa duração em coelhos.

Uma vasta investigação exploratória dos efeitos da *Trichilia catigua* demonstrou que a atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2) foi totalmente inibida pelo extrato hidroetanólico das cascas, sugerindo que esta planta pode produzir substâncias com atividade antiinflamatória (BARBOSA et al., 2004).

Segundo Campos et al. (2005), o extrato hidroetanólico padronizado das cascas de *Trichilia catigua* possui interesse potencial no tratamento de distúrbios depressivos. O estudo demonstrou a evidência de um efeito antidepressivo mediado por monoaminas e pelos princípios ativos deste extrato em ratos e camundongos empregando-se estudos farmacológicos e bioquímicos.

Em estudo comparativo da composição química das folhas e cascas de *T. catigua*, Lagos (2006) identificou a presença dos compostos fenólicos ácido clorogênico, catequina e epi-catequina, além dos esteróides beta sitosterol e estigmasterol.

Comercialmente, o catigua é encontrado no fitoterápico Catuama®, comercializado no Brasil como tônico, estimulante e afrodisíaco. Fazem parte da sua composição, além da *Trichilia catigua*, *Paullinia cupana* (guaraná), *Ptychopetalum olacoides* (muirapuama) e *Zingiber officinale* (gengibre) (FAPESP, 2002; MENDES & CARLINI, 2007).

Diversos estudos farmacológicos foram realizados para o esclarecimento das atividades farmacológicas do fitoterápico Catuama®, compreendendo testes com a mistura de seus extratos e também dos extratos de forma individual. Um estudo clínico de fase I investigou a administração crônica de 25 mL de Catuama® duas vezes por dia por 28 dias em voluntários saudáveis de ambos os sexos. O objetivo foi observar qualquer efeito tóxico do fitoterápico. Nenhuma reação adversa tóxica foi relatada ou mudanças hematopoiéticas e bioquímicas foram detectadas (OLIVEIRA et al., 2005).

4.5 Propagação Vegetativa

A propagação vegetativa, pelo processo convencional de estaquia ou pela técnica da micropropagação, facilita a multiplicação de genótipos selecionados, visto que as brotações originárias da planta matriz são geneticamente idênticas à ela.

4.5.1 Enraizamento de estacas

A propagação vegetativa ou assexual, tem sido definida como “a produção de plantas empregando partes vegetativas como caules, raízes, folhas, ao invés de usar sementes” (VILLANOVA, 1959). Este processo só é possível devido à capacidade que certos órgãos vegetais possuem de se recomporem quando cortados e colocados em condições favoráveis, dando origem a um novo indivíduo com características idênticas as de seu progenitor (SILVA, 1985).

De acordo com Assis & Teixeira (1998), a propagação vegetativa constitui um importante método para a multiplicação de plantas lenhosas, sendo comumente utilizada com sucesso e em larga escala o enraizamento de estacas. Entretanto, segundo França (2003), a produção de arbóreas, cujas cascas ou raízes contêm substâncias bioativas, freqüentemente se constitui em um desafio devido às limitações com relação à germinação irregular das sementes, ao desenvolvimento lento de propágulos e ao não enraizamento da estacas.

As estacas podem ser obtidas de porções vegetativas de caules, caules modificados como rizomas, tubérculos e bulbos, folhas ou raízes. Muitas espécies podem ser propagadas por um ou mais tipos de estacas, selecionando-se o tipo de acordo com a disponibilidade de material vegetativo e facilidade de sua obtenção. A estaca proveniente de caules tem a vantagem de sua fácil obtenção e maior disponibilidade de material, apresentando resultados satisfatórios de enraizamento (PEREIRA, 2003).

A propagação vegetativa, por meio de estacas caulinares, é possível pelo fato de algumas células conterem informações genéticas necessárias para induzir a diferenciação e em seguida formar uma planta. Essa propriedade é chamada de totipotência, ou

seja, a capacidade que algumas células tem de sofrer uma diferenciação quase que ilimitada, desde que as condições sejam satisfatórias para expressão gênica (ONO & RODRIGUES, 1996; PEREIRA, 2003).

Segundo Hartmann et al. (2002) as estacas podem ser provenientes de ramos lenhosos arbóreos ou arbustivos e de caules lenhosos e herbáceos. Quanto à posição, os autores indicam que, na maioria dos casos, as estacas retiradas da posição subterminal apresentam melhor enraizamento do que as estacas terminais.

Araújo et al. (1999) enraizaram estacas de limeira ácida coletadas em diferentes posições na árvore e concluíram que as estacas semilenhosas de madeira semidura apresentaram melhor percentual de enraizamento em relação às estacas semilenhosas de madeira dura e lenhosas, demonstrando que a alta lignificação das estacas dificulta a formação das raízes.

No enraizamento de estacas de pessegueiro, utilizaram-se estacas semilenhosas e lenhosas em dois estudos diferentes e observaram-se enraizamento (TOFANELLI et al., 2002a; TOFANELLI et al., 2003).

Para verificar o potencial de enraizamento de estacas de lichieira (*Litchi chinensis* Soon), Bastos et al. (2006) utilizaram estacas lenhosas e semilenhosas da cultivar Bengal e observaram um maior percentual de enraizamento em estacas semilenhosas. Isso ocorreu provavelmente pelo fato das estacas lenhosas serem procedentes de ramos do ano anterior, da porção basal e mais lignificados.

4.5.1.1 Características da planta mãe

Fatores importantes que facilitam o enraizamento são os relativos às plantas doadoras que devem ser sadias e, portanto, não devem estar deficientes em nutrientes, não atacadas por pragas e insetos, não danificadas por geadas ou sob estresse hídrico.

Devem também ser evitadas as plantas que se encontrem em plena floração ou frutificação, fase de elevada concentração de giberelinas, o que resulta em baixa percentagem de enraizamento. Segundo Hartmann et al. (2002) altas concentrações de giberelinas podem inibir o enraizamento, pois tem a função de regular os ácidos nucléicos e a

síntese de proteínas, podendo então, reprimir a iniciação radicular por interferir nesses processos, particularmente na transcrição de RNA.

4.5.1.2 Características das estacas

Quando possível, as estacas caulinares devem possuir 2 folhas e no mínimo duas gemas. De acordo com Van Overbeek et al. (1946), Hartmann et al. (2002) e Fachinello et al. (2005), as folhas e gemas no enraizamento são consideradas fontes de auxinas e nutrientes, necessárias para a formação de raízes nas estacas. A presença de folhas, por sua vez, aumenta a superfície de perda de água. Nesse caso, é necessário manter um sistema de nebulização para reduzir a taxa de transpiração e de respiração das folhas, bem como reduzir a temperatura das mesmas, formando uma película de água sobre elas. Segundo Fachinello et al. (2005), isso assegura a destinação dos fotossintatos e nutrientes para a formação das raízes. Na propagação de louro (*Laurus nobilis*) Fochesato et al. (2006) utilizaram estacas com zero, duas e quatro folhas e observaram que em todos os níveis de IBA utilizados as estacas sem folhas apresentaram 100% de mortalidade. Segundo os autores, um dos fatores desses resultados é atribuído ao esgotamento das reservas encontradas nas estacas. A presença de folhas permitiu alta sobrevivência das estacas, explicado pela presença de carboidratos e reguladores vegetais. O maior enraizamento foi observado nas estacas com quatro folhas em relação a com duas folhas.

As diferentes espécies respondem de diversas maneiras ao processo de enraizamento. O potencial de uma estaca formar raízes varia não só com a espécie, mas também com a cultivar. Para o enraizamento das estacas é importante relacionar a estação do ano com as fases de desenvolvimento das plantas. O estado bioquímico das estacas tem grande influência no enraizamento (HARTMANN et al. (2002) e FACHINELLO et al. (2005)).

Para determinar a melhor época de coleta, Dutra et al. (2002) utilizaram estacas de pessegueiro, *Prunus persica* (L.), submetidas a várias concentrações de IBA, nas quatro estações do ano e os resultados mostraram os maiores percentuais de enraizamento na primavera e verão. Esses resultados concordam com Fachinello et al. (2005), que referem que a época do ano em que as estacas são coletadas está relacionada com a

consistência da estaca. Em coletas realizadas na primavera/verão, o crescimento vegetativo é mais intenso, portanto as estacas são mais herbáceas e tendem a um maior percentual de enraizamento. Já as estacas coletadas no inverno são mais lignificadas e possuem menor capacidade de enraizamento. Também relacionado a época de coleta estão a temperatura e a disponibilidade de água a que se encontram as plantas matrizes doadoras de estacas.

Avaliando estacas semilenhosas de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*), Duarte et al. (1992) obtiveram o maior percentual de enraizamento no outono. Segundo os autores nessa época as plantas concentram as maiores reservas de nutrientes e ocorre variação no conteúdo dos cofatores e na formação e acúmulo de inibidores de enraizamento. Trabalhando com estacas de kiwizeiro (*Actinidia deliciosa* Lang et Ferguson cv. Bruno), Ono et al. (1998) também identificaram a estação do outono como sendo a melhor época para a retirada de ramos utilizadas no enraizamento. Para os autores, esses resultados podem ser decorrentes das condições ambientais e da cultivar utilizada. Utilizando a mesma espécie, Paes et al. (2003) obtiveram maior percentagem de enraizamento no inverno.

Outro fator que afeta a resposta de enraizamento é o tamanho das estacas. Hartmann et al. (2002) estabeleceram o tamanho das estacas de acordo com o tipo de lenho, ou seja, para estacas de ramos lenhosos arbóreos, o comprimento das estacas pode variar de 10 a 76 cm, dependendo da espécie. Nas estacas de ramos lenhosos arbustivos e de caules herbáceos, o comprimento pode variar de 7,5 a 12,5 cm. Os trabalhos encontrados na literatura mostram, para plantas lenhosas, estacas variando de 10 a 15 cm de comprimento e diâmetro entre 2 a 6 mm (ONO et al., 1992; LEONEL & RODRIGUES, 1993; RUFATO et al., 2001; TOFANELLI et al., 2003; FRANZON et al. 2004). Para espécies semilenhosas as estacas variam de 15 a 20 cm de comprimento e de 5 a 7 mm de diâmetro (TOFANELLI et al., 2002a; CARVALHO et al., 2005).

4.5.1.3 Ambiente de enraizamento

Para a regeneração das raízes, as estacas podem ser cultivadas em vários tipos de substratos como a vermiculita, areia, perlite, serragem de madeira, palha de arroz, casca de troncos de árvores, terra e ainda podem ser misturados dois ou mais substratos

em diferentes proporções. As estacas cultivadas devem ser colocadas em locais com elevada umidade, luminosidade mediana e temperaturas não elevadas. Estes locais podem ser estufas com cobertura de polietileno ou ripado. A umidade pode ser mantida através de nebulização. A construção de uma câmara de nebulização totalmente fechada com polietileno, ou com as laterais abertas, onde equipamentos de nebulização aspergem água na forma de névoa, mantendo elevada a umidade do local, seria a melhor instalação (ONO & RODRIGUES, 1996; HARTMANN et al., 2002).

4.5.1.4 Efeito das auxinas e outros promotores de crescimento vegetal no enraizamento

Em 1938, Went observou em estacas de hipocótilo de ervilha (*Pisum sativum* L.), que o tratamento com auxina levou a aumento do número de raízes formadas e a utilização de 10^{-4} M de ácido indol-3-acético (IAA) resultou no máximo de raízes. Concentrações acima são altamente tóxicas, não permitindo a formação de raízes. O autor relata que tratamentos com elevadas concentrações de auxinas induzem baixo número de raízes, em relação a tratamentos com baixas concentrações, que se desenvolvem apenas quando o excesso de auxina desaparece.

Dois tipos básicos de aplicação são o uso de baixas concentrações entre 0 e 500 mg L⁻¹, durante tempo de imersão prolongado de aproximadamente 24 horas, que constituem os tratamentos mais baratos, e o uso de elevadas concentrações, entre 500 e 10.000 mg L⁻¹, num tempo de imersão curto, de 5 a 10 segundos, resultando em tratamentos mais caros (HARTMANN et al., 2002).

Hartmann et al. (2002), referem como auxinas sintéticas mais utilizadas o ácido-indol-3-butírico (IBA), uma auxina débil, com boa estabilidade à luz, não destruída pelo sistema IAA-oxidase, sendo pouco translocável, o ácido-naftaleno acético (NAA), uma auxina sintética, mais tóxica que o IBA, totalmente estável à luz, não sendo destruída pelo sistema IAA-oxidase e o 2,4-D, uma auxina potente, de fácil translocação, estável à luz e não destruída pelo sistema IAA-oxidase, porém, bastante tóxica.

A maioria dos trabalhos de enraizamento de estacas referem-se à arbóreas frutíferas e espécies ornamentais. O ácido indolbutírico é o regulador vegetal mais

utilizado no processo de enraizamento nas concentrações que variam de zero a 7000 mg L⁻¹, como nos trabalhos de Tofanelli et al. (2002b) com ameixeira, Gontijo et al. (2003) com aceroleira, na propagação vegetativa de abacateiro (SILVEIRA et al., 2004), de goiabeira-serrana (FRANZON et al., 2004), de oliveira (PIO et al., 2005) e de lichieira (BASTOS et al., 2006).

As espécies de difícil enraizamento provavelmente também apresentam baixo teor de auxinas (Norberto et al., 2001). A concentração do regulador vegetal varia de acordo com a espécie, cultivar e tipo de estaca. As estacas possuem certa quantidade endógena de hormônios promotores ou inibidores de enraizamento, mas é necessário que haja um balanceamento adequado entre auxinas, giberelinas e citocininas e co-fatores de enraizamento para que haja enraizamento. Desse modo, o fornecimento de auxina exógena pode promover alteração hormonal, favorecendo ou não o enraizamento (Ramos et al., 2003).

Segundo Fachinello et al. (2005), o uso de reguladores vegetais tem por finalidade aumentar a percentagem de estacas que formam raízes, acelerar sua iniciação, aumentar o número e a qualidade das raízes formadas com maior uniformidade de enraizamento. Os autores registram que a potencialidade de uma estaca formar raízes é variável com a espécie e a cultivar. Essa informação foi comprovada por Bastos et al. (2005) no enraizamento de estacas de caquizeiro, em diferentes concentrações de IBA, onde a resposta para cada cultivar foi diferente.

Mesmo utilizando-se fitoreguladores, muitas plantas não enraizam, como foi observado por Cardoso et al. (2002), quando testaram a influência de diferentes substratos e das auxinas ácido indol-acético (IAA), ácido indol-butírico (IBA) e ácido naftaleno-acético (NAA), nas concentrações iguais a 25, 50, 100 e 150 mg L⁻¹ no enraizamento de estacas caulinares da planta medicinal conhecida popularmente como bolsa-de-pastor (*Zeyheria montana* Mart.).

A aplicação de auxina na base das estacas promove o enraizamento dependendo da concentração, o que difere para cada espécie e que pode apresentar efeito inibitório ou fitotóxico (HARTMANN et al., 2002; FACHINELLO et al., 2005). Segundo Nachtigal et al. (1994), elevadas concentrações da auxina IBA causaram fitotoxidez nas estacas de *Psidium cattleianum* (araçazeiro). Os autores relacionam o fato à formação de uma camada de abscisão foliar que provoca a queda das folhas e posterior morte das estacas.

4.5.2 Cultura de tecidos ou micropropagação

Técnicas de propagação vegetativa *in vitro* tem possibilitado a reprodução de espécies lenhosas recalcitrantes ao enraizamento, com muitas vantagens em relação às técnicas *ex vitro*. Um dos maiores benefícios da micropropagação e das outras técnicas de propagação assexuada é a possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não-aditivos da variância genética por meio da propagação clonal, tornando-se uma ferramenta poderosa associada aos programas de melhoramento florestal para a propagação massal de genótipos superiores (GEORGE & SHERRINGTON, 1984; ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Nos últimos 40 anos, as técnicas de cultura de tecidos *in vitro* constituíram num importante conjunto de tecnologias em todas as áreas da biologia vegetal, auxiliando na compreensão de seus processos de desenvolvimento e para a utilização e conservação dos recursos genéticos vegetais (WITHERS & WILLIAMS, 1998). A aplicação das técnicas de cultura de tecidos associadas à micropropagação relaciona-se principalmente com a obtenção de mudas uniformes, de elevada qualidade e livres de doenças, permitindo a multiplicação rápida e geneticamente confiável e a preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção.

Muitos trabalhos de micropropagação vêm sendo desenvolvidos com plantas medicinais nativas e/ou exóticas, herbáceas e lenhosas, visando o estabelecimento de protocolos simples e diretos para propagação das espécies medicinais e até mesmo com técnicas mais demoradas e cuidadosas, regenerando plantas a partir de diferentes tecidos via embriogênese ou organogênese direta ou indireta. Os estudos podem ser realizados com sementes, embriões, meristemas apicais, gemas axilares, entre outros órgãos e tecidos da planta. Pesquisa-se também os tipos e meios de cultura, as concentrações e tipos de reguladores vegetais, que devem ser usados nas diferentes fases do processo de micropropagação (SOUZA, 2003).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o processo de micropropagação pode ser conduzido de três formas, conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação. Multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares,

multiplicação mediante a indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta, passando pela fase de calo ou multiplicação via embriogênese somática, que também pode ser direta ou indireta.

A introdução de variabilidade genética indesejável que pode ocorrer quando da passagem pela fase de calo, assim como a perda da capacidade embriogênica das células, o que impossibilita a multiplicação contínua das plantas, já que as células perdem o potencial da capacidade de regeneração após algumas subculturas, faz com que a multiplicação via organogênese direta seja preferida, por conservar a integridade genética da planta não ocorrendo a formação de calo durante o processo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo Teixeira (2006), as espécies lenhosas de interesse agrícola são basicamente constituídas pelas espécies frutícolas, como maçã, pêra, pêssego, manga e citrus, espécies florestais, como eucalipto, coníferas, teca, mogno e cedro e espécies bioativas como espinheira-santa, jaborandi e nim. Também como lenhosas se enquadram café, cacau, chá mate, erva-mate, romã, além das espécies produtoras de amêndoas como a castanha-do-pará, o caju e a noz macadâmia. Do ponto de vista econômico e social, essas espécies lenhosas constituem um grupo de plantas extremamente importante.

Várias espécies lenhosas têm sido estudadas quanto à multiplicação e enraizamento. Para as espécies pouco estudadas o primeiro problema encontrado tem sido a descontaminação dos explantes e eliminação ou amenização da oxidação fenólica. Segundo Assis & Teixeira (1998), alguns pontos devem ser seguidos para se conseguir um protocolo de micropropagação *in vitro* completo. É necessário focar alguns aspectos relacionadas à planta matriz, como o estágio de desenvolvimento, o genótipo, as condições de estresse a que a planta está submetida, seu crescimento em relação à luminosidade, a presença de substâncias nitrogenadas, compostos fenólicos, substâncias de reserva como carboidratos e a nutrição mineral entre outros.

4.5.2.1 Fonte de explante

Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta. Procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecidos meristemáticos ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Para a organogênese, direta ou indireta, pode-se utilizar a cultura de meristemas, de ápices caulinares, de segmentos nodais e cultura de embriões. A cultura de meristemas consiste no estabelecimento do domo meristemático, onde a brotação cresce originando um único broto. Na cultura de ápices caulinares, utilizam-se brotações apicais maiores com primórdios foliares. Essas brotações podem produzir outras. Em segmentos nodais, os explantes são constituídos de gemas laterais isoladas, onde cada gema forma uma única brotação (GUERRA & NODARI, 2006).

No estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) Erig & Fortes (2002) utilizaram meristemas e gemas da espécie. Os resultados mostraram que a contaminação fúngica e bacteriana foram maiores nas gemas do que nos meristemas, devido ao fato de que quanto menor o explante menores são as chances de contaminação. Os autores também determinaram que a maior percentagem de estabelecimento para os meristemas se dá aos 56 dias após o início da brotação das plantas matrizes.

Plantas de difícil propagação como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) respondem bem a micropropagação a partir de segmentos nodais de mudas de até 2 anos. Esses dados foram comprovados por Zaniolo & Zanette (2002) que desenvolveram um protocolo de estabelecimento, multiplicação e enraizamento para a espécie.

4.5.2.2 Desinfestação

Segundo George (1993), a contaminação, tanto bacteriana quanto fúngica, varia de acordo com a época do ano e, freqüentemente, fica pior na primavera e

verão, devido as elevadas temperaturas e umidade relativa. Ainda segundo o autor, a fonte de explante, a concentração dos desinfestantes e o tempo de exposição dependem do material vegetal e das diferentes partes da planta, que apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos.

Trabalhando com teca (*Tectona grandis* L.f), Abdelnour & Muñoz (2005) trataram semanalmente as plantas matrizes em casa de vegetação, com uma mistura de Agrimicina® e benlate®. Na manipulação foi realizada uma assepsia em câmara de fluxo laminar com hipoclorito de cálcio (CaOCl_2) e hipoclorito de sódio (NaOCl). O conjunto de processos resultou em mais de 60% de explantes assépticos.

Nos processos de desinfestação os produtos mais utilizados são o etanol 70%, NaOCl , 0,5 a 3,0% em concentrações variando de 1 a 50%, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e o cloreto de mercúrio (HgCl_2) variando de 0,01% a 0,15%. Após a assepsia, os explantes devem ser lavados em água destilada e autoclavada, antes da inoculação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Na micropropagação de erva-mate, Zaniolo & Zanette (2002) obtiveram baixa contaminação fúngica e bacteriana expondo por 15 minutos os explantes à concentração de 0,75% de NaOCl .

4.5.2.3 Meio de cultura

Os meios nutritivos utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos vegetais fornecem as substâncias essenciais para seu crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Alguns dos meios tem sido utilizados para regenerar diferentes espécies. Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no início do cultivo, como o de Murashige & Skoog, (1962), MS, sendo utilizado com modificações e diluições. Para Grattapaglia & Machado (1998), elevadas concentrações do meio MS tem inibido o enraizamento de explantes e sua utilização em $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ e até $\frac{1}{4}$ da dose dos sais tem possibilitado melhores resultados para muitas espécies vegetais. Alguns meios menos concentrados como Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD & MCCOWN, 1981) e White (Singh & Krikorian (1991)), Knop (Knop (1865)), SH (Schenck & Hildebrandt (1972)), B5

(Gamborg et al. (1968)), tem sido usados na propagação de plantas lenhosas (MANTOVANI et al., 1999; LANDA et al., 2000; VENGADESAN et al., 2002; NOLETO & SILVEIRA, 2004).

Para induzir gemas axilares em segmentos nodais de louro-pardo (*Cordia trichotoma*), Mantovani et al. (2001) compararam o meio MS e WPM e obtiveram maior percentagem de gemas axilares induzidas e maior comprimento médio das brotações no meio WPM. Para multiplicar amoreira-preta (*Rubis* sp) cv. Brazos, Augusto & Biasi (2002) testaram os meios MS, MS/2, AND (Anderson (1980)), QL (Quoirin & Lepoivre (1977)) e WPM, em três subcultivos. Os resultados mostraram uma tendência de maior taxa de multiplicação para o meio MS.

4.5.2.4 Reguladores vegetais

A composição e concentração de reguladores vegetais no meio de cultura, segundo Caldas et al. (1998), são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, sendo as auxinas e citocininas as classes de reguladores vegetais mais utilizados. O ácido giberélico (GA₃), apesar de apresentar resultados em poucas culturas, também é utilizado.

Na multiplicação de brotos de *Azadirachta excelsa*, Liew & Teo (1998) testaram o efeito de várias concentrações de BAP e observaram que elevadas concentrações da citocinina causam efeito inibitório na formação de brotos, com ocorrência de calos. Os autores recomendam, para a espécie, baixas concentrações de BAP, que resulta em melhor formação de brotos. Os níveis de reguladores vegetais adequados para proporcionar a maior quantidade de brotos emitidos variam de acordo com o genótipo estudado, e devem ser determinados em cada caso específico (SABÁ et al., 2002).

Sabá et al. (2002) compararam os efeitos da cinetina e da zeatina na regeneração de brotos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e não encontraram diferenças entre as citocininas. O uso da citocinina BAP, em várias concentrações, não aumentou a emissão de brotos. Os autores consideram a necessidade de se usar dois ou mais reguladores de crescimento para aumentar a proliferação de brotos. Vários trabalhos de multiplicação de

plantas lenhosas testaram as várias citocininas misturadas entre si ou com auxinas. Na organogênese do caquizeiro (*Diospyros kaki*), Carvalho e Biasi (2004) testaram BAP, 2-iP, TDZ (Thidiazuron) e zeatina combinados com IAA e observaram os melhores resultados com a utilização de 1 μM de zeatina misturado com 0,01 μM de IAA.

Em *Azadirachta indica* (nim), a resposta à multiplicação de brotos foi melhor com o uso apenas da citocinina. Salvi et al. (2001), neste trabalho, mostraram que os melhores resultados de brotação foram obtidos com o uso de BAP nas concentrações de 1,25 e 2,5 μM .

O maior comprimento de brotos da espécie *Schizolobium amazonicum* (paricá) foi observado por Cordeiro et al. (2004) nos explantes sem aplicação de regulador vegetal, apesar do BAP, na concentração de 13,2 μM , ter proporcionado maior proliferação de brotos. Elevadas concentrações de BAP induzem a diminuição no comprimento dos brotos e a ausência dessa citocinina, em muitos casos, melhora o desenvolvimento das raízes, sem a formação de calos (VILLA et al., 2005).

Como reguladores vegetais, as auxinas atuam diretamente no processo de enraizamento, sendo as mais usadas o IBA, o NAA, o IAA, o 2,4-D e o picloram (ácido picolínico), isoladas ou combinadas. Algumas plantas podem formar raízes mesmo na ausência de auxinas exógenas, devido à sua concentração endógena (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Na maioria dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, a auxina mais testada tem sido o IBA. No entanto, Lopes et al., (2001) compararam as duas auxinas, IBA e NAA, no enraizamento de mogno (*Swietenia macrophylla* King) e concluíram que NAA nas concentrações de 10,74 e 26,85 μM foi mais eficiente no enraizamento dessa espécie. Lameira et al. (2005) comprovaram a melhor eficiência do NAA em mogno.

É importante destacar que, em cada espécie, a resposta da auxina e sua concentração são diferentes. Assim, em louro-pardo (*Cordia trichotomai*), Mantovani et al. (2001) observaram que a auxina NAA provocou excesso de calosidade, inibindo a multiplicação e o desenvolvimento dos brotos, tendo o IBA induzido melhores resultados de enraizamento.

Ao estudar marmeleiro, Erig & Schuch (2004) utilizaram as auxinas IBA, NAA e IAA e não encontraram diferenças no percentual de enraizamento quando a concentração de 10 μM de cada auxina foi adicionada ao meio de cultura. Os mesmos autores observaram que níveis acima de 10 μM de auxinas comprometeram a rizogênese inibindo a formação de raízes.

Segundo George & Sherrington (1984), para evitar a inibição do enraizamento pela presença constante da auxina no meio, tem sido adotada a estratégia de manter os explantes por um período curto na presença desta substância. Em seguida, faz-se a inoculação em um novo meio sem regulador de crescimento.

As giberelinas são reguladores vegetais com efeito no alongamento de caules e quebra de dormência, entre outros. Dependendo da espécie vegetal e das condições experimentais, o uso de giberelinas exógenas tem mostrado efeito positivo, negativo ou nenhum efeito sobre o enraizamento (MATSUMOTO, 2000). Fráguas et al. (2004) constataram redução na formação e multiplicação de brotos, estiolamento, hiperidricidade, clorose e necrose apical das plântulas de figo (*Ficus carica*) tratadas com ácido giberélico no meio de cultura WPM.

Algumas plantas respondem positivamente ao uso do ácido giberélico. O louro-pardo, após três subcultivos combinando GA_3 com o BAP, apresentou maior taxa de multiplicação e maior comprimento das brotações (MANTOVANI et al., 2001). Os autores também citam melhor desenvolvimento dos eixos caulinares e das folhas na presença de GA_3 .

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo geral

Obter propagação da espécie *Trichilia catigua* A. Juss.

5.2 Objetivo específico

- Determinar a melhor estação do ano para enraizamento de estacas via propagação vegetativa;
- determinar o regulador vegetal e sua concentração mais adequada para maior e melhor enraizamento de estacas;
- determinar a posição do caule que melhor enraiza, entre as partes apical e mediana;
- obter, via organogênese direta, um protocolo de micropropagação, utilizando cultura de tecidos, para a espécie.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Condições gerais dos experimentos

O trabalho foi realizado na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri, localizada no município de Lages, no estado de Santa Catarina. A cidade de Lages localiza-se a uma altitude de 916 m, a 27^o48´S de latitude e 50^o20´W de longitude. Apresenta clima subtropical Cfb com temperatura média anual de 14,3°C.

6.1.1 Material para enraizamento de estacas

As estacas utilizadas nos experimentos de enraizamento foram coletadas de plantas localizadas na Microregião do Extremo-oeste do estado de Santa Catarina. Devido à necessidade de grande número de estacas, foram selecionados dois locais de coleta, de fácil acesso e autorizados pelos proprietários. Identificou-se como Local I o Centro de Treinamento da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI de São Miguel do Oeste (SC) e como Local II, a propriedade do Sr. Sérgio de Marco, localizada na Linha Grápia, município de Paraíso (SC). O município de

Paraíso é uma cidade de fronteira com a Argentina. As coordenadas do Local I situam-se entre 26°46'S a 26°47'S de latitude e 53°30'W a 53°30'W de longitude, com altitude variando de 589 a 665 metros. No Local II, a latitude varia de 26°38'S a 26°40'S, a longitude de 53°37'W a 53°41'W e a altitude entre 516 e 535 metros.

Nos Locais I e II foram realizadas coletas de amostras de solo e suas posteriores análises (Anexo 1 e 2). Do material vegetal coletado fez-se exsiccatas, as quais foram enviadas para identificação e confirmação da espécie pelo Professor Dr. João Aurélio Pastore do Herbário D. Bento Pickel (SPSF) – Instituto Florestal de São Paulo (Anexo 3).

6.1.2 Material para cultura de tecidos

As matrizes de *Trichilia catigua*, doadoras de propágulos para a cultura de tecidos, foram doadas pelo Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR).

Na Epagri, as plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação (Figura 5), com controle manual de irrigação e de tratos culturais. Dessas matrizes foram coletados explantes para a cultura de tecidos, realizada no Laboratório de Biotecnologia da Epagri. Os explantes provenientes das matrizes eram segmentos nodais de aproximadamente 2 cm, com uma gema. As folhas foram cortadas e deixadas no local da coleta. Desprezou-se os segmentos apicais por apresentarem muita oxidação *in vitro*, conforme revelado por testes preliminares.



Figura 5. Plantas matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss doadoras de propágulos para a cultura de tecidos. **Fonte:** fotos da autora.

6.1.3 Sementes

As sementes utilizadas no experimento foram coletadas na Fazenda Edgardia, pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, do Campus de Botucatu (SP), no mês de dezembro de 2005 e na propriedade do Sr. Sérgio De Marco, Linha Grápia, Paraíso (SC), em outubro de 2006.

6.2 Avaliação de enraizamento de estacas

A coleta do material utilizado no enraizamento realizou-se no Local I e II, nas primeiras horas da manhã, em dias ensolarados. Para tanto, fez-se a escolha de árvores adultas, com altura superior a dois metros, boa sanidade e que apresentassem ramos do ano anterior. Foram retirados os ramos laterais e da copa. As plantas em florescimento ou frutificação foram desprezadas. Devido ao crescimento lento da espécie, os ramos foram coletados em várias plantas ao longo da mata.

Ainda no local da coleta, os ramos lenhosos foram cortados em segmentos de aproximadamente 25 cm e separados em parte mediana e apical, mantendo-se as folhas. A parte basal dos ramos não foi aproveitada por ser mais lignificada e, de maneira geral, não apresentar folhas. Separadas em maços de dez estacas, as bases foram envolvidas em papel toalha umedecidas e acondicionadas em saco plástico, que após serem fechados foram colocados em caixa de isopor com gelo para manutenção de sua umidade. Essas estacas foram manipuladas 24 horas após a coleta.

Na instalação do experimento, realizada no galpão de trabalho da Epagri, procedeu-se a toalete das estacas. Com tesoura de poda retirou-se o excesso de folhas deixando-se apenas duas por estacas. Essas estacas foram cortadas com um comprimento aproximado de 15 cm e com auxílio de estilete foram realizadas duas lesões, de aproximadamente 2 cm, em sua base, expondo-se o câmbio. Segundo Fachinello et al. (2005) estas lesões favorecem a absorção de água e reguladores vegetais e permitem que haja rompimento da barreira física formada pelos anéis de esclerênquima, aumentando a eficiência do enraizamento. As bases das estacas foram mergulhadas por 10 segundos em soluções aquosas contendo os tratamentos. As estacas que não receberam reguladores vegetais foram mergulhadas em água destilada pelo mesmo tempo. Após o tratamento as estacas foram mantidas em túnel de aclimatização, sem controle de temperatura, com nebulização intermitente de 1 minuto a cada hora, durante todo o experimento. Estes procedimentos foram realizados em todos os experimentos de enraizamento.

6.2.1 Ensaio de enraizamento

Esse ensaio prévio foi instalado em virtude de não terem sido identificadas bibliografias a respeito da propagação da espécie. Desse modo, no dia 16 de setembro de 2004, coletou-se material vegetativo no Local I.

Os tratamentos, com exceção da testemunha, utilizaram reguladores vegetais, produtos P.A., que depois de pesados foram dissolvidos em gotas de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e, a seguir, diluídos em água destilada. Os tratamentos foram designados Testemunha (água destilada), IBA 1000 mg L⁻¹, IBA 2000 mg L⁻¹, NAA 1000 mg L⁻¹, NAA

2000 mg L⁻¹, IAA 1000 mg L⁻¹, IAA 2000 mg L⁻¹. As estacas, depois de terem suas bases submetidas aos diferentes tratamentos, foram colocadas para enraizar em bandejas pretas contendo areia grossa lavada como substrato.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 7 x 2, ou seja, 7 tratamentos e 2 posições da estaca (mediana e apical) com 4 blocos. Cada parcela da posição apical foi constituída por seis estacas e da posição mediana por oito. Após 90 dias da instalação do experimento foram avaliados número de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, o comprimento e o diâmetro das raízes. O diâmetro das raízes foi medido com paquímetro.

Os dados de comprimento e diâmetro das raízes foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998), sendo previamente testados para normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (SANTANA & RANAL, 2004). Devido à ausência de normalidade dos resíduos, os dados de comprimento de raiz sofreram transformação logarítmica.

Os dados referentes ao número de plantas enraizadas, não enraizadas e mortas foram analisados por regressão logística, técnica estatística amplamente utilizada na análise de variáveis dependentes binárias. Essa técnica trata-se de um modelo linear generalizado com uma função denominada “logit” ou “log odds”, na qual o modelo que explica mudanças na probabilidade de acontecimento de um evento binário, como por exemplo, taxa de enraizamento no presente experimento, pode ser resumidamente definido por $\text{logit} = \ln \left[\frac{\pi}{1-\pi} \right]$, sendo π = probabilidade do evento (STEEL et al., 1997; KAPS & LAMBERSON, 2004). Foram analisados os efeitos dos tratamentos, da parte da estaca e das interações entre estas variáveis.

6.2.2 Enraizamento nas estações do ano

Os experimentos de enraizamento de estacas foram instalados no verão 2004/2005, outono 2005, inverno 2005 e primavera 2005. As informações sobre cada coleta encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Dados de coletas e diâmetro de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss realizadas no Local I e Local II.

Coleta	Data	Diâmetro médio estaca (mm)		Local coleta
		Apical	Mediano	
Verão 2004/2005	05/01/2005	3,47	4,77	Local I
Outono 2005	13/05/2005	3,63	5,29	Local I
Inverno 2005	16/07/2006	4,08	5,55	Local II
Primavera 2005	04/11/2005	4,28	5,31	Local I

Os tratamentos foram designados Testemunha (água destilada), IBA 1000 mg L⁻¹, IBA 2000 mg L⁻¹, IBA 3000 mg L⁻¹, NAA 1000 mg L⁻¹, NAA 2000 mg L⁻¹, NAA 3000 mg L⁻¹, IAA 1000 mg L⁻¹, IAA 2000 mg L⁻¹ e IAA 3000 mg L⁻¹. As estacas, depois de terem suas bases submetidas aos diferentes tratamentos, foram colocadas para enraizar em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 72 células, formato piramidal invertido, com orifício para escoamento da água, contendo areia lavada.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 10 x 2 x 4, sendo 10 tratamentos, 2 posições da estaca (mediana e apical) e 4 estações de coleta, com 5 blocos. Cada parcela foi constituída de 6 estacas. As avaliações foram realizadas 120 dias após a instalação do experimento. Avaliaram-se as percentagens de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, o comprimento e o diâmetro das raízes.

O comprimento e o diâmetro das raízes foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote estatístico SAS (1998), sendo previamente testados para normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (SANTANA & RANAL, 2004) e para homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene (KAPS & LAMBERSON, 2004). Devido à ausência de normalidade dos resíduos, os dados de comprimento de raiz sofreram transformação logarítmica. Os dados referentes ao número de plantas enraizadas, não enraizadas e mortas foram analisadas por regressão logística (KAPS & LAMBERSON, 2004). Em todas as análises foram analisados os efeitos dos tratamentos, da parte da estaca, da estação do ano e das interações entre estas variáveis.

6.2.3 Enraizamento primavera 2006

Os resultados dos experimentos de enraizamento, anteriormente descritos, evidenciaram a necessidade de avaliar concentrações mais elevadas de reguladores vegetais, especialmente o IBA, na primavera.

Para tanto, no dia 10 de outubro de 2006, foi realizada coleta na Linha Grápia, município de Paraíso – SC e procedeu-se a instalação do experimento com estacas da parte mediana dos ramos, com, em média, 5,45 cm de diâmetro. Os reguladores vegetais usados foram IBA (1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 mg L⁻¹) e NAA (1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹), além da testemunha (água destilada).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 9 tratamentos e 4 blocos. Cada parcela foi constituída de 6 estacas. As avaliações foram realizadas após 120 dias da instalação do experimento, sendo avaliadas as percentagens de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, o comprimento e o diâmetro das raízes.

O comprimento e o diâmetro das raízes foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote estatístico SAS (1998), sendo as variáveis previamente testadas para normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (SANTANA & RANAL, 2004). Foram analisados os efeitos dos tratamentos e dos blocos. O efeito dos tratamentos sobre o número de plantas enraizadas, não enraizadas e mortas foi analisado por regressão logística (KAPS & LAMBERSON, 2004).

6.3 Avaliação em cultura de tecidos

Para determinar o tipo de explante utilizado foram realizados ensaios testando segmentos nodais, gemas, folhas e flores de *T. catigua*. Porém, o desenvolvimento lento desses propágulos determinou baixo crescimento e morte, e, após longo período de exposição ao meio não apresentavam crescimento. Sendo assim, escolheu-se o segmento

nodal, das matrizes e das plântulas germinadas de sementes, para os experimentos de assepsia e multiplicação *in vitro* de *Trichilia catigua*.

6.3.1 Meio de cultura e frascos de cultivo

Os meios de cultura utilizados nos experimentos foram preparados com água destilada e de acordo com a formulação salina e vitamínica do meio MS, acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8±2 antes da autoclavagem, pela adição de NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 N. A adição de reguladores vegetais foi feita antes da esterilização dos meios. A autoclavagem foi realizada por 15 minutos a 1.1 Kgf/cm², em temperatura de 121°C.

Os recipientes utilizados foram de dois tipos. Os chamados frascos, com 39 mm de diâmetro e 74 mm de altura que receberam 20 mL de meio de cultura e os tubos de ensaio de 20 x 150 mm e de 25 x 150 mm, que receberam 8 mL/tubo de meio de cultura sólido ou 7 cm de vermiculita autoclavada. Os recipientes foram fechados com tampas de papel alumínio e esterelizados em autoclave por 15 minutos a 1.1 Kgf cm⁻², em temperatura de 121°C.

Nos experimentos envolvendo a germinação de sementes, para maior eficiência de esterilização, a vermiculita foi autoclavada duas vezes, na primeira vez por 30 minutos, em sacos plásticos de 500 gramas e na segunda vez, por 15 minutos, nos tubos de ensaio, com 7 cm de vermiculita, umedecida com meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) líquido, com 50% da concentração dos sais, vitaminas e ferro e acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol.

6.3.2 Experimento de assepsia do material vegetativo

Duas semanas antes da coleta dos explantes para o cultivo *in vitro*, as matrizes da casa de vegetação foram pulverizadas com Benomil (0,5 g L⁻¹) mais Captam 50 PM (0,5 g L⁻¹), intercalando pulverizações com o antibiótico Rifampicina - Rifaldim® (150

mg L⁻¹). A coleta dos explantes foi realizada nas primeiras horas do dia. Coletou-se segmentos nodais com uma gema, que tiveram suas folhas retiradas, levados para o laboratório e foram acondicionados em um recipiente escuro contendo água destilada com duas gotas de Tween[®]20 por 100 mL. A pré-asepsia foi realizada retirando-se os explantes desse recipiente escuro e lavando-os com água destilada.

Seguiu-se a assepsia em câmara de fluxo laminar com agentes químicos de desinfestação, com o objetivo de determinar a melhor combinação dos tempos de exposição dos explantes aos agentes. Os explantes foram submetidos aos tratamentos de assepsia, abaixo referidos, e enxaguados por 5 vezes em água destilada autoclavada, deixando-se 5 minutos mergulhados em cada enxágüe. Na seqüência, uma parte dos explantes era mantida em água autoclavada, enquanto a outra era drenada em um becker de 50 mL, para ser inoculada. Antes da inoculação do explante no tubo com o meio de cultura, suas ponteiros foram cortadas, com bisturi, para a retirada de partes oxidadas. Os explantes inoculados tinham, em média, 1,5 a 2,0 cm de comprimento.

A seguir são apresentados os vários experimentos de assepsia, nos quais os procedimentos acima referidos foram utilizados.

6.3.2.1 Experimento 1 - assepsia com HgCl₂

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3, ou seja, três concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl₂) (0,05, 0,10 e 0,15%) e três tempos de exposição ao produto (5, 10 e 15 minutos). Avaliou-se os efeitos da concentração de HgCl₂ e do tempo, além da interação entre esses fatores. O número de explantes sobreviventes e oxidados foram analisados por regressão logística.

O experimento foi realizado em duas épocas diferentes. Desse modo, o primeiro experimento foi montado em setembro, época que antecede as novas brotações e, em dezembro, marcado por elevada atividade de brotação da espécie. Foram utilizados 20 explantes por tratamento no experimento realizado no mês de setembro e 24 em dezembro.

Utilizou-se o meio MS com 25% da concentração dos sais, 0,5% de sacarose, geleificado com 6 g L⁻¹ de ágar e acrescentando-se Rifampicina (150 mg L⁻¹) antes

de autoclavar. Seguiu-se o modo de preparo descrito no item 6.3.1. Os explantes foram mantidos por 4 dias no escuro sendo em seguida transferidos para bancadas com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 1$. Avaliou-se aos 15 dias após a inoculação o número de explantes viáveis, com fungos e oxidados.

Após a avaliação, os explantes foram trocados de meio de cultura para ensaios de multiplicação. A partir de então, a troca de meio foi realizada a cada 30 dias.

6.3.2.2 Experimento 2 - assepsia com hipoclorito

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e 24 explantes por tratamento. Foi usado o produto comercial Q-Boa[®] como fonte de cloro. Os tratamentos foram constituídos por hipoclorito de cálcio (CaOCl_2) 0,5% por 10 minutos, CaOCl_2 0,5% por 15 minutos, CaOCl_2 1,0% por 10 minutos, hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% por 10 minutos, NaOCl 2,5% por 15 minutos e NaOCl 1,5% por 15 minutos.

Utilizou-se o meio MS com 25% da concentração dos sais, 0,5% de sacarose, geleificado com 6 g L^{-1} de ágar e acrescentando-se Rifampicina (150 mg L^{-1}) antes de autoclavar. Seguiu-se o modo de preparo descrito no item 6.3.1.

Os explantes foram mantidos por quatro dias no escuro e, a seguir, transferidos para bancadas com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 1$. Avaliou-se aos 15 dias após a inoculação o número de explantes viáveis, com fungos e oxidados. Os dados foram analisados por meio de regressão logística, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

Após a avaliação os explantes foram trocados de meio de cultura para ensaios de multiplicação. A partir de então, a troca de meio foi realizada a cada 30 dias.

6.3.2.3 Experimento 3 – NaOCl x HgCl₂

O presente ensaio foi realizado com base nos melhores resultados observados nos tratamentos do experimento 1 e 2, descritos nos itens 6.3.2.1 e 6.3.2.2. O objetivo desse ensaio foi comprovar a efetividade do antibiótico nos melhores tratamentos de assepsia.

O meio de cultura foi preparado conforme procedimento descrito no item 6.3.1. O preparo dos explantes está descrito no item 6.3.2.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram submetidos aos tratamentos de assepsia com HgCl₂ 0,05% por 10 minutos e NaOCl 1,5% por 15 minutos com e sem a adição do antibiótico Rifampicina – Rifaldim®. Após a assepsia os explantes foram inoculados no meio MS com 25% da concentração dos sais, 0,5% de sacarose e geleificado com 6 g L⁻¹ de ágar acrescido ou não do antibiótico Rifampicina (150 mg L⁻¹), antes de autoclavar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2, ou seja, dois agentes de assepsia, HgCl₂ 0,05% e NaOCl 1,5% com e sem Rifampicina. Avaliou-se o número de explantes com fungos, bactérias, oxidados e sobreviventes.

Os explantes foram mantidos por quatro dias no escuro e, a seguir, transferidos para bancadas com intensidade luminosa de 25 μmol s⁻¹ m², fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 23⁰C±1. Avaliou-se aos 15 dias após a inoculação o número de explantes viáveis, com fungos e oxidados. Os dados foram analisados por regressão logística, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

Após a avaliação, os explantes foram trocados de meio de cultura para a realização dos ensaios de multiplicação. A partir de então, a troca de meio foi realizada a cada 30 dias.

6.3.3 Assepsia e germinação de sementes

Esse experimento foi realizado para obtenção de protocolo de desinfestação de sementes de *Trichilia catigua*. As sementes foram coletadas na Fazenda Edgardia, pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, do Campus de Botucatu (SP). No Laboratório de Biotecnologia da Epagri, foram retiradas as cápsulas e separadas as sementes. Na seleção exluíram-se as atrofiadas e atacadas por insetos. Retirou-se o arilo. As sementes foram separadas em lotes de 100 unidades, pesadas, lavadas em água corrente e secas em papel toalha. A seguir foram submetidas aos tratamentos:

No tratamento 1, as sementes foram submetidas a captam 50 PM por 48 horas, seguido por lavagem em água corrente. Na câmara de fluxo laminar as sementes foram imersas em hipoclorito de cálcio 5% por 10 minutos e cinco enxágües com água destilada e autoclavada.

No tratamento 2, em câmara de fluxo laminar as sementes foram imersas em hipoclorito de cálcio, 5% do princípio ativo, por 10 minutos e cinco enxágües com água destilada e autoclavada.

Tratamento 3, as sementes foram imersas por 15 minutos em 0,5 g L⁻¹ de captam 50 PM dissolvido em água destilada. A seguir, as sementes foram lavadas em água destilada. Na câmara de fluxo laminar as sementes foram imersas em hipoclorito de cálcio 5% por 10 minutos e enxaguadas cinco vezes com água destilada e autoclavada.

Foi colocada uma semente por tubo de ensaio, o qual continha 7 cm de vermiculita umedecida com meio básico MS líquido com 50% da concentração dos sais. Os tubos foram deixados no escuro até a emergência das plântulas.

Observações diárias foram realizadas a partir dos trinta dias da implantação do experimento com a contagem das sementes germinadas e contaminadas. As plântulas emergidas foram transferidas para bancadas com intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$ e fotoperíodo de 16 horas. A contagem das sementes germinadas durou 90 dias desde a primeira avaliação. Após esse período, foram contadas as não germinadas, que foram a seguir,

descartadas. Considerou-se a semente como germinada após a emissão do hipocótilo e as contaminadas pela observação visual.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O número de sementes diferiu entre tratamentos em função da disponibilidade. Os dados do número de sementes contaminadas e germinadas foram analisados por regressão logística utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

6.3.4 Experimento de multiplicação

As sementes germinadas no experimento do item 6.3.3 foram utilizadas como fonte de explantes. Os experimentos de multiplicação utilizaram segmentos e brotações cotiledonares das plântulas de *Trichilia catigua* germinadas *in vitro*.

Em câmara de fluxo laminar os tubos com as plântulas germinadas de sementes foram abertos. Cortou-se os explantes, com no mínimo, dois folíolos, medindo em média 2 cm. Os materiais cortados foram deixados em um becker de 300 mL. O tubo com a plântula após ter sido lacrado retornou à sala de crescimento. Os explantes passaram por um processo de assepsia, devido à germinação em vermiculita, o substrato pode camuflar a contaminação, que não sendo visível por ocasião do corte, pode aparecer quando em contato com o meio de cultura. Na assepsia dos explantes foi usado hipoclorito de sódio 1% por cinco minutos e cinco enxágües com água destilada e autoclavada. Esses segmentos excisados e desinfestados foram utilizados nos experimentos de teste com os reguladores vegetais BAP, NAA e GA₃, descritos a seguir.

Após os procedimentos de inoculação, o material foi colocado em sala de crescimento com intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 23⁰C \pm 1.

6.3.4.1 Experimento BAP + GA₃

O experimento objetivou avaliar o efeito do BAP na multiplicação através da indução das brotações das gemas e, do GA₃ no alongamento dos entrenós. Os explantes utilizados nesse experimento foram obtidos seguindo os procedimentos do item 6.3.4. Esses explantes foram inoculados em frascos contendo o meio MS acrescido dos reguladores vegetais BAP e GA₃. As concentrações de BAP utilizadas foram 0,0 e 2,22 µM e de GA₃ 0,0, 1,44 e 2,88 µM.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 explantes por repetição. Foram feitas avaliações, aos 30 e 60 dias, do número de folhas, número de explantes com entrenós e brotações. O número de folhas e a variação no número de folhas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O número de plantas com entrenós e com brotações foi analisado por regressão logística. Utilizou-se o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

6.3.4.2 Experimento BAP com NAA associado a GA₃

Os explantes utilizados nesse experimento foram obtidos seguindo os procedimentos do item 6.3.4. Estes foram inoculados em frascos contendo o meio MS acrescido dos reguladores vegetais BAP, NAA e GA₃.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2, sendo 3 níveis de BAP (0,44, 2,22 e 4,44 µM) e ausência ou presença de NAA (0,05 µM) associado a GA₃ (0,29 µM). Os dados de número de plantas com entrenós e brotações aos 30 e 60 dias foram analisados por regressão logística. Também foram feitas análises por contraste ortogonal comparando-se o tratamento testemunha com os demais. Nos tratamentos em que o número de plantas era igual a zero, atribuiu-se um valor 0,5 plantas positivas, conforme proposto por Shafii & Price (2007).

6.3.4.3 Experimento com variação de GA₃

A partir dos resultados dos experimentos 6.3.4.1 e 6.3.4.2, conduzidos no período de janeiro a agosto de 2005, foi delineado um experimento de multiplicação de explantes, provenientes de plântulas germinadas de sementes coletadas em outubro de 2006, fixando-se a concentração de BAP em 0,44 μM e avaliando-se concentrações de GA₃ na ausência ou presença de NAA.

Os explantes utilizados nesse experimento foram obtidos seguindo os procedimentos do item 6.3.4. Antes da inoculação, os explantes tiveram seus ápices cortados com bisturi, com o objetivo de quebrar a dominância apical e permitir brotação das gemas axilares. Nesse experimento não foram considerados os entrenós, pois, com o corte do ápice, todos os explantes foram inoculados na mesma condição, ou seja, sem alongamento. A seguir, foram inoculados em frascos contendo o meio MS com 50% da concentração dos sais, acrescido dos reguladores vegetais BAP, NAA e GA₃.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2, ou seja, três doses de GA₃ (0,0, 0,29 e 1,45 μM) e duas doses de NAA (0,0 e 0,05 μM). Avaliou-se o número de explantes com brotações, com raízes e calos e o número de repicagens aos 60 dias. Os dados referentes ao número de repicagens por explante foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998), sendo previamente testados para normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (SANTANA & RANAL, 2004). Os dados de um tratamento controle (ausência dos reguladores vegetais) foram comparados aos demais tratamentos através de contraste ortogonal. Foram analisados os efeitos das concentrações dos reguladores vegetais e das interações entre elas. Os dados referentes ao número de plantas com calos foram analisados por regressão logística

Aos 60 dias após a inoculação, as brotações com comprimento igual ou superior a 1,5 cm foram cortadas e inoculadas em meio MS com 50% da concentração dos sais, cuja composição era idêntica a inicial. Os explantes originais tiveram suas bases cortadas para retirar a massa de calo existente. Procedeu-se o corte das raízes nos explantes originais.

Ambos foram inoculados no meio MS com 50% da concentração dos sais novo, com os mesmos tratamentos. O material foi mantido na sala de crescimento para avaliações.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Avaliação de enraizamento de estacas

7.1.1 Ensaio de enraizamento

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que o IBA 1000, 2000 mg L⁻¹ e NAA 1000 e 2000 mg L⁻¹ apresentaram efeitos superiores às doses de IAA e a da testemunha, demonstrando ser adequada a aplicação de reguladores vegetais para o enraizamento das estacas dessa espécie. O enraizamento de estacas originadas da parte mediana não diferiu daquela da parte apical. Também não foi observada interação entre o efeito dos reguladores vegetais utilizados e da parte da estaca.

A elevada percentagem de estacas não enraizadas e baixa de estacas mortas sugere a necessidade de um tempo maior do que 90 dias para avaliação. Muitas espécies de difícil enraizamento necessitam, além do uso de reguladores vegetais, de um tempo maior para formar as raízes. Isso foi observado por Duarte et al. (1992), em goiabeira serrana, que aos 67 dias após a instalação do experimento obtiveram 31,66% de estacas enraizadas e elevadas percentagens de não enraizadas.

No ano de 2004, segundo dados meteorológicos da Epagri, Lages (SC), as temperaturas foram condizentes com as estações do ano. As temperaturas registradas no período de setembro a dezembro de 2004 (Figura 6) podem ter colaborado para a sobrevivência das estacas que mantiveram suas folhas até a época da avaliação.

Tabela 2. Percentagem de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, comprimento e diâmetro de raízes das partes apicais e medianas de *Trichilia catigua* A. Juss tratadas com reguladores vegetais no ensaio primavera 2004.

Tratamento mg L ⁻¹	Estacas ¹			Raízes ³	
	Enraizadas (%)	Não enraiz. (%)	Mortas ² (%)	Comprim. (cm)	Diâmetro (cm)
IAA 1000	7,29 b	92,71 a	0,00	0,65 a	0,19 a
IAA 2000	10,41 b	89,58 a	0,01	0,96 a	0,19 a
NAA 1000	22,91 ab	75,00 b	2,09	1,17 a	0,22 a
NAA 2000	23,43 a	74,48 b	2,09	1,55 a	0,23 a
IBA 1000	33,33 a	66,67 b	0,0	0,99 a	0,20 a
IBA 2000	25,00 a	72,92 b	2,08	1,40 a	0,25 a
Testemunha	7,81 b	89,06 a	3,13	0,85 a	0,23 a

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%

²Estacas mortas não foram analisadas estatisticamente, devido a valores zeros.

³Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de F ao nível de 5%.

O comprimento e o diâmetro das raízes não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2). Na avaliação, aos 90 dias, observaram-se muitas raízes em formação, menores do que 0,5 cm.

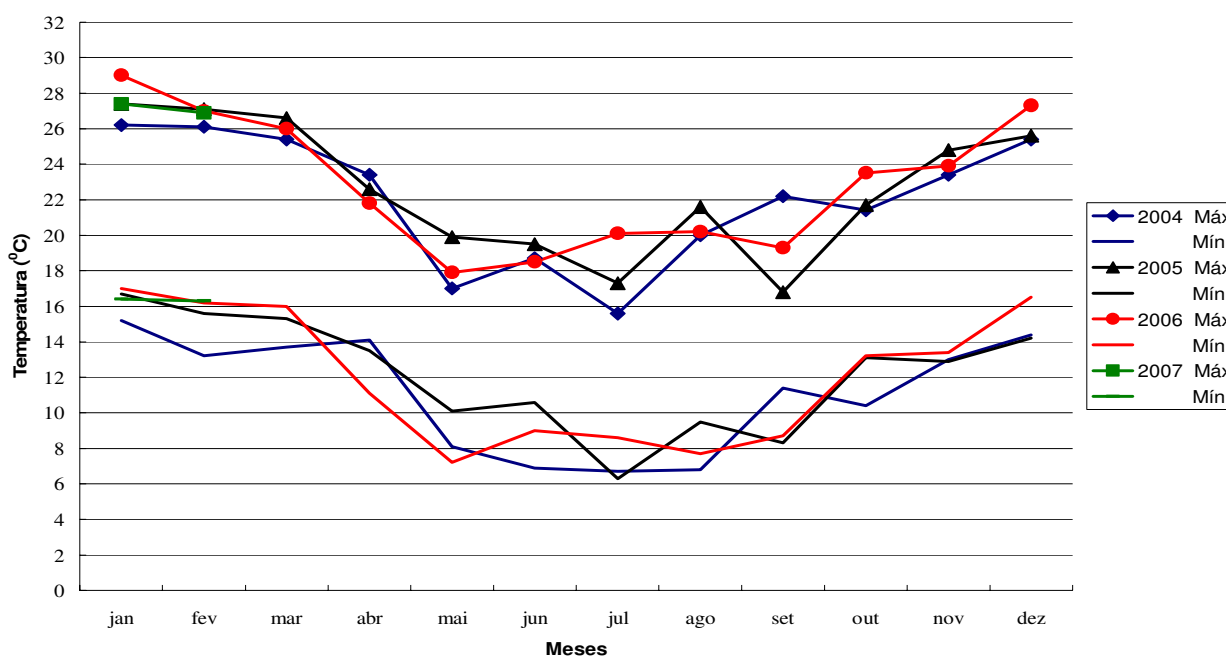


Figura 6. Gráfico das temperaturas (°C) mínimas e máximas mensais dos anos de 2004, 2005, 2006 e 2007. Fonte: Estação Meteorológica da Epagri, Lages (SC).

Os resultados do ensaio foram importantes para conhecimento da espécie quanto aos aspectos de enraizamento. As estacas que enraizaram nesse ensaio formaram mudas que estão com mais de 24 meses e apresentam altura média de 45 cm, boa sanidade, algumas em florescimento e aptas a recompor as matas ou para plantios comerciais (Figura 7).



Figura 7. Mudanças de *Trichilia catigua* A. Juss enraizadas na primavera 2004. Idade de 24 meses em dezembro de 2006. Foto da autora.

7.1.2 Enraizamento nas estações do ano

Nos experimentos das quatro estações do ano, não houve enraizamento na estação outono e inverno do ano de 2005. Apesar das estacas não terem enraizado, na avaliação, estavam vivas e com as folhas verdes. A espécie *T. catigua* não perde as folhas no outono-inverno, mas têm seu desenvolvimento reduzido, não apresentando emissão de brotações novas. Pode-se considerar esse período como a fase fenológica de repouso vegetativo da planta. As baixas temperaturas registradas na região, tanto de coleta quanto do local do enraizamento (Figura 6), também podem ter contribuído para o não enraizamento.

Os resultados concordam com as afirmações de Ono e Rodrigues (1996) e Hartmann et al. (2002) que no outono as estacas possuem reservas de carboidratos, mas também possuem inibidores do enraizamento, o que dificulta a formação de raízes. Os mesmos autores referem que coletas realizadas no outono e inverno, devido aos dias curtos dessa estação e as temperaturas baixas, exercem influência negativa no processo fotossintético das árvores matrizes, reduzindo os metabólitos, os quais tornam-se insuficientes para iniciação e desenvolvimento das raízes.

As análises conjuntas dos dados de enraizamento da estação verão 2004/2005 e primavera 2005 são apresentadas na Tabela 3. A estação influenciou significativamente a percentagem de estacas enraizadas, sendo a primavera superior ao verão. Não houve diferença significativa de enraizamento entre estacas oriundas das partes apical e mediana. Não houve interação entre as variáveis analisadas.

Tabela 3. Percentagem de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, comprimento e diâmetro de raízes das partes apicais e medianas de *Trichilia catigua* A. Juss tratadas com reguladores vegetais e mantidas em substrato areia lavada na estação de verão 2004/2005 e primavera 2005.

Tratamento mg L ⁻¹	Estacas ¹			Raízes ²	
	Enraizadas (%)	Não enraizadas (%)	Mortas (%)	Comprim. (cm)	Diâmetro (cm)
IAA 1000	3,33 c	64,17 a	32,50 ab	3,21 a	0,10 a
IAA 2000	5,83 bc	70,00 a	24,17 b	2,77 a	0,11 a
IAA 3000	10,00 b	52,50 b	37,50 ab	1,93 a	0,09 a
NAA 1000	5,83 bc	60,00 ab	34,17 ab	2,43 a	0,11 a
NAA 2000	14,17 ab	50,00 b	35,83 ab	2,23 a	0,10 a
NAA 3000	14,17 ab	45,83 b	40,00 a	2,04 a	0,09 a
IBA 1000	11,67 b	50,00 b	38,33 a	2,59 a	0,11 a
IBA 2000	15,83 ab	47,50 b	36,67 ab	2,58 a	0,10 a
IBA 3000	19,17 a	44,17 b	36,67 ab	1,54 a	0,10 a
Testemunha	4,17 bc	69,17 a	26,66 b	1,50 a	0,10 a
	Entre estações				
Primavera 2005	14,67 a	37,33 b	48,00 a	2,47 a	0,09 b
Verão 2004/2005	6,17 b	73,33 a	20,50 b	1,58 a	0,11 a
	Entre partes				
Apical	10,50 a	54,33 a	35,17 a	2,21 a	0,10 a
Mediana	10,33 a	56,33 a	33,34 a	2,19 a	0,09 a

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%

²Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de F ao nível de 5%.

Observa-se pela Figura 6 que o ano de 2005 foi muito atípico entre estações. A coleta de primavera, que em 2004 foi realizada em meados de setembro, somente foi realizada em 2005 no mês de novembro. Isso ocorreu devido a oscilação da temperatura, muita baixa para os meses de setembro e outubro, inclusive com ocorrência de geadas nesse mês, seguida de estiagem nesse período, o que também atrasou a coleta.

Não houve interação entre estação de coleta, reguladores e dose. A percentagem de estacas não enraizadas foi maior no verão (73,33%) do que na primavera (37,33%) e estacas mortas mostrou-se maior na primavera (48,00%) do que no verão (20,50%). Esses resultados, provavelmente, tem relação com elevadas temperaturas registradas no verão 2004-2005 e primavera 2005 e ao clima extremamente seco nestes anos, fator que influenciou as condições das plantas matrizes no campo.

Outro fator que pode ter contribuído para a alta mortalidade nas estacas foi a avaliação aos 120 dias, em comparação aos 90 dias no ensaio primavera 2004 (Tabela 2). Segundo Mindêllo Neto et al. (2004) quando o período de enraizamento é muito longo o excesso de umidade do ambiente e do substrato pode aumentar a mortalidade das estacas.

Nas estações, verão 2004-2005 e primavera 2005, verificou-se intensa queda de folhas nas estacas. Leonel & Rodrigues (1993), em estacas de licheira (*Litchi chinensis*), atribuem às elevadas temperaturas a ocorrência de queda de folhas e posterior morte das estacas. Segundo os autores isso se deve à perda de água por transpiração.

O tratamento IBA 3000 mg L⁻¹ resultou em maior percentagem de enraizamento do que a testemunha, os três níveis de IAA, de NAA 1000 e 2000 mg L⁻¹ e IBA 1000 mg L⁻¹, não diferindo estatisticamente dos níveis de IBA 2000 mg L⁻¹, NAA 2000 e 3000 mg L⁻¹. As maiores taxas de estacas não enraizadas foram verificadas para IAA 1000 mg L⁻¹, IAA 2000 mg L⁻¹ e testemunha não diferindo de NAA 1000 mg L⁻¹ (Tabela 3).

Na Tabela 3, observa-se maior percentagem de estacas mortas nos tratamentos NAA 3000 mg L⁻¹ e IBA 1000 mg L⁻¹ diferindo de IAA 2000 mg L⁻¹ e testemunha, não diferindo dos demais tratamentos.

O comprimento e o diâmetro das raízes não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. O aumento nas concentrações dos reguladores vegetais tendeu a um menor crescimento no comprimento das raízes (Tabela 3). O diâmetro das raízes foi mais grosso no verão 2004/2005 em relação à primavera 2005.

Mesmo nos tratamentos com melhores percentuais de enraizamento, estes não resultaram em raízes mais longas e nem mais grossas. Segundo Castro et al. (2005), as aplicações exógenas de auxinas podem promover iniciação e desenvolvimento radicular, entretanto, a mesma concentração que estimula o surgimento dos primórdios radiculares pode inibir o posterior crescimento das raízes.

7.1.3 Enraizamento Primavera 2006

A escolha dos reguladores e suas concentrações no experimento de enraizamento da primavera 2006 levaram em consideração os resultados avaliados no item 7.1.2, os quais confirmaram que as auxinas sintéticas IBA e NAA foram mais efetivas do que o IAA, obtendo melhores percentagens de estacas enraizadas (Tabela 3). Assim sendo, no enraizamento primavera 2006 os tratamentos com IAA foram suprimidos.

Os dados analisados nas Tabela 2 e 3 mostram que o uso de NAA manteve as percentagens de enraizamento constantes entre as concentrações usadas. Por isso, as mesmas concentrações foram mantidas. A percentagem de estacas enraizadas aumentou conforme aumentaram as doses do regulador vegetal IBA. Esses resultados determinaram o estudo na primavera 2006 com doses mais elevadas desse regulador.

Pelos dados analisados no enraizamento entre estações, pode-se constatar que não houve diferença entre a parte mediana e apical da estaca. Portanto, no experimento primavera 2006 foi utilizada somente a parte mediana.

A Tabela 4 mostra os resultados do enraizamento na primavera 2006. O IBA na concentração de 5000 mg L⁻¹ resultou nas maiores percentagens de estacas enraizadas, não diferindo de IBA 4000 mg L⁻¹ e NAA 2000 mg L⁻¹. Houve um crescente aumento das percentagens de estacas enraizadas com o aumento das doses de IBA. Isso pode

significar que mesmo a dose mais elevada, igual a 5000 mg L⁻¹, de IBA, não foi suficiente para permitir maiores percentagens de enraizamento.

Muitos trabalhos testam o uso de várias concentrações de reguladores vegetais para encontrar o melhor enraizamento, assim como Paes et al. (2003) usaram IBA e NAA em estacas de kiwizeiro (*Actinidia deliciosa*) nas concentrações de 0, 2500 e 5000 mg L⁻¹, em solução e talco e encontraram 70% de estacas enraizadas com 5000 mg L⁻¹ de NAA talco na estação inverno. Mindêllo Neto et al. (2004) testaram concentrações de IBA (0, 100, 500, 1000 e 5000 mg L⁻¹) em estacas lenhosas de pessegueiro cultivar Marfim. Os resultados mostraram 81,92% de estacas enraizadas na concentração de 2966 mg L⁻¹ de IBA. Houve redução de enraizamento em doses superiores.

Tabela 4. Percentagem de estacas enraizadas, não enraizadas e mortas, comprimento e diâmetro de raízes das partes medianas de *Trichilia catigua* A. Juss tratadas com reguladores vegetais e mantidas em substrato areia lavada na estação primavera 2006.

Tratamento mg L ⁻¹	Estacas ¹			Raízes ²	
	Enraizadas (%)	Não enraizadas (%)	Mortas (%)	Comprim. (cm)	Diâmetro (cm)
NAA 1000	8,33 b	66,67 ab	25,00 a	0,50 a	0,07 a
NAA 2000	29,17 ab	62,50 ab	8,33 a	1,13 a	0,11 a
NAA 3000	16,67 b	62,50 ab	20,83 a	1,70 a	0,09 a
IBA 1000	12,50 b	79,17 a	8,33 a	0,90 a	0,07 a
IBA 2000	12,50 b	79,17 a	8,33 a	1,10 a	0,07 a
IBA 3000	16,67 b	58,33 ab	25,00 a	2,33 a	0,08 a
IBA 4000	25,00 ab	70,83 ab	4,17 a	1,63 a	0,11 a
IBA 5000	41,67 a	50,00 b	8,33 a	1,65 a	0,10 a
Testemunha	12,50 b	75,00 ab	12,50 a	1,27 a	0,08 a

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%

²Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de F ao nível de 5%.

No presente estudo, houve intensa queda das folhas e a ocorrência de brotações nas estacas, e nestas não se observou enraizamento. Os dados observados na Tabela 4 mostram que não houve relação entre reguladores e concentrações com a morte das estacas. Os reguladores vegetais não afetaram o comprimento e o diâmetro das raízes as quais mostraram-se curtas e finas para todos os tratamentos.

Diferente dos anos de 2004 e 2005, no ano de 2006, apesar das elevadas temperaturas, houve o registro de ocorrência normal de chuvas. As observações visuais das matrizes na mata indicaram novas brotações, folhas mais verdes e ocorrência de frutificação, fato que não tinha sido registrado nos anos de 2004 e 2005.

7.1.4 Resumo dos dados entre as estações

A Tabela 5 mostra os resultados referentes à percentagem de estacas enraizadas no ensaio 2004, verão 2004-2005 e primavera 2005 e primavera 2006, segundo os tratamentos utilizados em cada experimento, e elucida a realização do experimento primavera 2006 quanto aos reguladores vegetais e doses utilizadas.

O maior valor de enraizamento, 41,67%, encontrado para IBA 5000 mg L⁻¹, na primavera 2006, compara-se aos valores encontrados para espécies como goiabeira (49,63%) por Tavares et al. (1995) e aceroleira (50%) por Gontijo et al. (2003). Portanto, o fato da *Trichilia catigua* ser de crescimento lento e com produção irregular de sementes torna essa percentagem de plantas enraizadas um resultado significativo para propagação.

Observa-se na Tabela 5, quanto à testemunha, baixas percentagens de enraizamento, confirmando a necessidade da utilização de reguladores vegetais para enraizamento de estacas de *T. catigua*. O fato de ter havido algum nível de enraizamento no tratamento testemunha, em todos os experimentos, pode ser devido ao nível endógeno de auxina nas estacas. Muitas espécies enraizam sem a necessidade de reguladores vegetais. Outras necessitam de baixas concentrações, no entanto, submetidas a maiores tempos de tratamento, como no trabalho de Ono et al. (1992) em estacas semilenhosas de cafeeiro (*Coffea arabica*), com melhores taxas de enraizamento com NAA 100 e 200 mg L⁻¹ mais boro.

No entanto, mesmo utilizando reguladores vegetais, muitas plantas não enraizam, como foi observado por Cardoso et al. (2002), quando testaram a influência de diferentes substratos e das auxinas IAA, IBA e NAA, nas concentrações iguais a 25, 50, 100 e 150 mg L⁻¹ no enraizamento de estacas caulinares da planta medicinal conhecida popularmente como bolsa-de-pastor (*Zeyheria montana* Mart.).

Tabela 5. Percentagem de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss enraizadas nos vários experimentos realizados na primavera 2004, verão 2004/primavera 2005 e primavera 2006, segundo os tratamentos em cada época.

Tratamento mg L ⁻¹	Estacas Enraizadas (%)		
	Primavera 2004	Verão 2004/ primav. 2005	Primavera 2006
IAA 1000	7,29 b	3,33 c	-
IAA 2000	10,41 b	5,83 bc	-
IAA 3000	-	10,00 b	-
NAA 1000	22,91 ab	5,83 bc	8,33 b
NAA 2000	23,43 a	14,17 ab	29,17 ab
NAA 3000	-	14,17 ab	16,67 b
IBA 1000	33,33 a	11,67 b	12,50 b
IBA 2000	25,00 a	15,83 ab	12,50 b
IBA 3000	-	19,17 a	16,67 b
IBA 4000	-	-	25,00 ab
IBA 5000	-	-	41,67 a
Testemunha	7,81 b	4,17 bc	12,50 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

As concentrações de cada regulador vegetal variam entre espécies e mesmo na mesma espécie, como em estacas de *Olea europaea* (oliveira), onde no estudo de Rahman et al. (2002) testaram 0, 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹ de IBA e obtiveram 80% de enraizamento na maior concentração. Porém, na mesma espécie, Pio et al. (2005) encontraram 56,86% de enraizamento em estacas sem folhas tratadas com 2000 mg L⁻¹ de IBA.

No enraizamento de estacas lenhosas de *Ginkgo biloba*, Valmorbid & Lessa (2005) utilizaram IBA nas concentrações de 0, 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹ na ausência e presença de boro e, a maior percentagem de estacas enraizadas foi 80,55%, quando tratadas com 2000 mg L⁻¹ de IBA, independente da utilização de boro. Bastos et al. (2006) obtiveram 50,17% de estacas lenhosas de lichieira enraizadas com 6000 mg L⁻¹ de IBA comparadas com o tratamento testemunha de 13,57%, evidenciando-se a necessidade do uso de reguladores vegetais no enraizamento de estacas lenhosas.

Outras espécies, dependendo das cultivares, não enraízam, apesar da utilização de elevadas concentrações de reguladores, como nos estudo de Bastos et al. (2005) avaliando as cultivares Pomelo, Rama, Forte, Taubaté, Giombo e Fuyu, de caquizeiro, com a

auxina IBA nas concentrações de 0, 3000 e 6000 mg L⁻¹. Os autores constaram que não houve formação de raízes em nenhuma cultivar estudada.

Em jaboticabeira, percentuais de estacas enraizadas maiores de 30% não foram relacionados com as doses de IBA utilizadas, que foram de 0, 1000, 2000, 4000 e 6000 mg L⁻¹, mas sim com outros fatores relacionados ao substrato e seu pH (PEREIRA et al., 2005).

Para *Trichilia catigua*, as elevadas concentrações utilizadas objetivaram conhecer o comportamento da espécie. Baseado nos resultados observados na Tabela 5 recomenda-se a coleta das estacas na estação primavera, utilizando-se a porção mediana dos ramos tratados com IBA 5000 mg L⁻¹. Observa-se na Figura 8 que a percentagem de enraizamento segue uma função logística, com maior probabilidade de enraizamento para concentrações mais elevadas de IBA. Portanto, o estudo com concentrações acima de 5000 mg L⁻¹ do regulador vegetal IBA e avaliações mais tardias talvez resultem em melhores percentagens de estacas enraizadas.

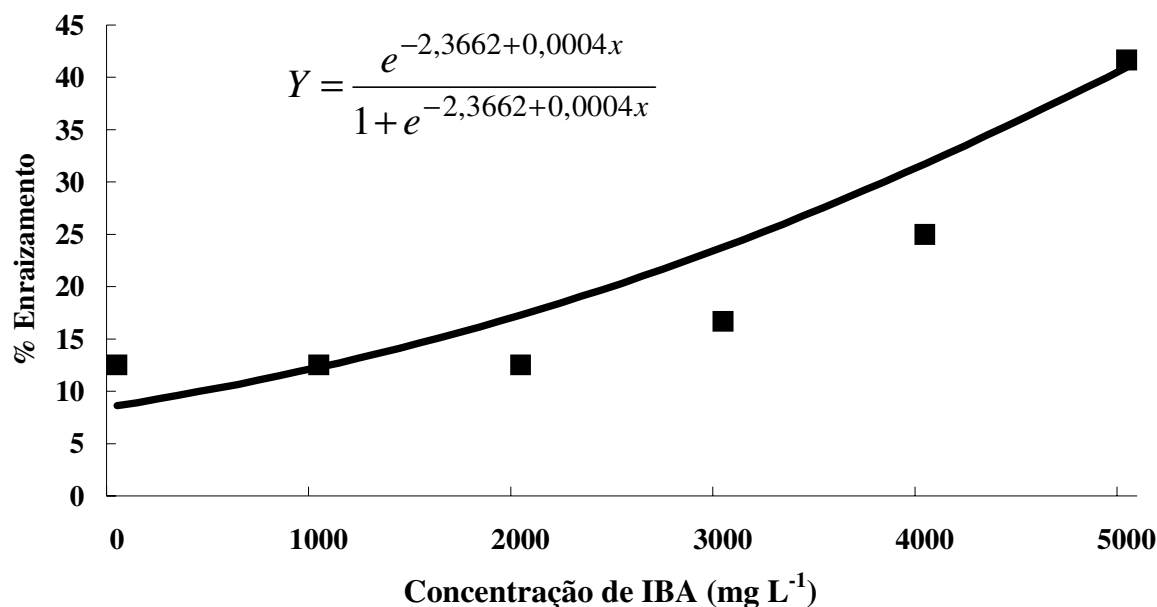


Figura 8. Percentagem de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss enraizadas na primavera 2006, em função das concentrações do ácido indolbutírico (IBA) utilizadas.

7.2 Cultura de tecidos

7.2.1 Explantes de matrizes

7.2.1.1 Experimento 1 – Assepsia HgCl₂

Os dados da Tabela 6 e Tabela 7 mostram o efeito das concentrações e do tempo de exposição ao cloreto de mercúrio sobre a taxa de sobrevivência e de oxidação dos explantes, respectivamente.

As médias da Tabela 6 demonstram que a maior taxa de sobrevivência foi verificada nos tempos 5 e 10 minutos, sendo 5 minutos mais efetivo em relação ao tempo de 15 minutos de exposição, independente da concentração de HgCl₂ utilizada. Conforme a Tabela 7, os tratamentos que menos oxidaram os explantes foram 0,05 e 0,10% de HgCl₂, diferindo significativamente da concentração 0,15%. Não foi observada interação entre tempo de exposição e a concentração de HgCl₂. Os maiores tempos de exposição e as maiores concentrações de HgCl₂ provocaram as maiores oxidações nos explantes, resultando na sua morte (Tabela 7).

Tabela 6. Efeito da concentração e do tempo de exposição dos explantes de *Trichilia catigua* A. Juss, ao agente de desinfestação cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a taxa de sobrevivência (% viáveis).

Concentração HgCl ₂ (%)	Tempo imersão (minutos)			Média
	5	10	15	
0,05	70,00	50,00	50,00	56,67 a
0,10	65,00	65,00	45,00	58,33 a
0,15	40,00	40,00	25,00	35,00 b
Média	58,33 A	51,67 AB	40,00 B	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

Nesse experimento não foram registradas ocorrências de bactérias e os poucos explantes com fungos foram observados nos tratamentos HgCl₂ 0,05% (10 e 15

minutos), HgCl₂ 0,10% (5 minutos) e HgCl₂ 0,15% (5 minutos). A ocorrência de muitos valores zeros impediu a análise estatística da porcentagem de bactérias e fungos.

Tabela 7. Efeito da concentração e do tempo de exposição, dos explantes de *Trichilia catigua* A. Juss, ao agente de desinfestação Cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a porcentagem de oxidados.

Concentração HgCl ₂	Tempo imersão (minutos)			Média
	5	10	15	
0,05	30,00	35,00	45,00	36,67 b
0,10	25,00	35,00	55,00	38,33 b
0,15	55,00	60,00	75,00	63,33 a
Média	36,67 B	43,33 AB	58,33 A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

Nas várias repetições dos tratamentos, observou-se que em explantes de *Trichilia catigua*, coletados no mês de setembro, foi possível a descontaminação, o que não ocorreu em coletas realizadas nos meses de novembro e dezembro dos anos de 2005 e 2006, submetidos aos mesmos tratamentos. Estes apresentaram fungos e bactérias com 100% de perdas dos mesmos. Nessa época, as plantas matrizes, mantidas em casa de vegetação, e submetidas a elevadas temperaturas e umidade relativa, permitiram a proliferação de patógenos. Com base nas observações, recomenda-se quando o objetivo é o estudo de assepsia, a coleta dos explantes nos meses de agosto, setembro e outubro, visando a obtenção de explantes viáveis para a multiplicação da espécie.

Na assepsia de segmentos nodais de nim (*Azadirachta indica*) Chaturvedi et al. (2004) usaram HgCl₂ 0,15% por 13 minutos e observaram maior problema de contaminação ou morte relacionado com as estações do ano. Os mesmos autores, na estação chuvosa de junho a outubro observaram 100% de contaminação. De novembro a fevereiro a planta tem seu crescimento reduzido e não apresenta brotação. Sendo assim, os melhores resultados foram observados de março a maio, época de florescimento na Índia, quando 80% dos explantes brotaram com 20% de contaminação.

Brotos apicais de carandeira (*Carissa carandas*), utilizados por Raí & Misra (2005), na assepsia, apresentaram, após 3 semanas, o número máximo de explantes

sobreviventes, igual a 74,3%, no tratamento sequencial, etanol 70%, 0,5% de HgCl₂ e 1% de NaOCl em imersão durante 3 minutos de exposição. Os autores também encontraram maior contaminação nos explantes maiores de 1,5 cm, comparados com os de 0,5 cm.

Ribas et al. (2003) estudando peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*), testaram o efeito de NaOCl (0,125 e 0,25%) e HgCl₂ (0,025, 0,05 e 0,1%) ambos durante 5 e 10 minutos nas quatro épocas do ano (outono, inverno, primavera e verão). Para contaminação bacteriana o NaOCl a 0,125% foi menos efetivo e o verão foi a época de maior contaminação. A maior taxa de sobrevivência foi garantida pelo uso de 0,25% de NaOCl por 10 minutos. A concentração HgCl₂ 0,05% durante 10 minutos foi a mais eficiente no percentual de sobrevivência, contaminação bacteriana e contaminação fúngica, sendo a primavera e o verão as melhores épocas para desinfestação de brotações apicais. Segundo os autores, os níveis de contaminação são mais baixos quando as plantas estão na fase de crescimento ativo, por possuírem tecidos mais juvenis com contaminação endofítica mais baixa do que em tecidos maduros. No presente trabalho com *Trichilia catigua* isso não ocorreu, e as épocas de maior crescimento vegetativo foram as que resultaram em menores sobrevivência de explantes.

7.2.1.2 Experimento 2 – Assepsia com hipoclorito

Na busca por produtos menos tóxicos do que HgCl₂ testou-se outras soluções desinfestantes (Tabela 8). Comparando-se as percentagens de explantes sobreviventes, contaminados por fungos e oxidados, observa-se que NaClO 1,5% por 15 minutos foi o melhor tratamento, com a maior taxa de sobrevivência, baixa taxa de contaminados por fungos e oxidados, comparados aos demais. A eficiência do NaClO também foi observada por Erig et al. (2003) que testaram hipoclorito de sódio e de cálcio em explantes de mirtilo e obtiveram melhores resultados de desinfestação e estabelecimento de segmento nodal com hipoclorito de sódio. Em todos os tratamentos, com exposição ao agente desinfestante por 10 minutos, houve elevada contaminação por fungos.

Tabela 8. Assepsia de explantes de matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss mantidas em casa de vegetação, submetidos aos agentes de desingestação. Percentual de sobreviventes, contaminados com fungos e bactérias.

Tratamentos	Explantes		
	Sobreviventes (%)	Contaminado p/fungos (%)	Oxidados (%)
CaOCl ₂ 0,5% (10 min.)	37,50 ab	62,50 a	0,00 c
CaOCl ₂ 0,5% (15 min.)	29,17 b	12,50 b	58,33 a
CaOCl ₂ 1,0% (10 min.)	0,00 c	50,00 ab	50,00 ab
NaClO 2,5% (10 min.)	33,33 b	66,67 a	0,00 c
NaClO 2,5% (15 min.)	50,00 ab	20,83 b	29,17 b
NaClO 1,5% (15 min.)	62,50 a	33,33 b	4,17 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

O hipoclorito na forma comercial Q-Boa[®], sem diluição, tem pH em torno de 13. Como o cloro livre só é liberado em pH menores ou iguais a 8,0, tem-se, na concentração usada, pequena quantidade de ácido hipocloroso. Segundo Macedo (2006), para que ocorra a desinfestação é necessário que o pH esteja abaixo de 8,0, onde existe, aproximadamente, 35% de ácido hipocloroso disponível. Em pH 8,5, 9,0 e 9,5, encontra-se, aproximadamente, 12%, 5% e 2%, respectivamente, de ácido hipocloroso disponível, quantidades insuficientes para o processo de desinfestação. Este fato associado ao menor tempo de exposição pode ter contribuído para a elevada contaminação no uso de NaClO 2,5% por 10 minutos, resultando em 66,67% de contaminação por fungos (Tabela 8).

A desinfestação de segmentos nodais de *Didymopanax morototoni* (caixeta) com hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo e com pH ajustado para 6,5 por 10 minutos proporcionou a sobrevivência e o estabelecimento dos explantes mesmo na presença de contaminação e de necrose (MANTOVANI et al., 1999). Os mesmos autores não recomendam, na mesma concentração, tempos maiores de 10 minutos por danificar os tecidos, provocando escurecimento e necrose. Esses dados estão de acordo com os encontrados para *T. catigua* (Tabela 8), onde tempos maiores de exposição à solução desinfestante provocou maior oxidação dos explantes.

Baixas concentrações de desinfestantes podem não ter efeito na assepsia dos explantes. Isso foi observado na imersão de segmentos nodais de ameixeira-preta

em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% (v/v), em vários tempos, resultando em elevadas percentagens de contaminação (AUGUSTO & BIASI, 2002).

No presente estudo, apesar de não ter havido contaminação e nem oxidação, a maioria dos explantes não se desenvolveu até a formação de plântula. Isso pode ser devido ao crescimento lento e a madeira compacta da espécie. O longo tempo entre o corte e o início da brotação das gemas pode ter reduzido as reservas do próprio explante. Não conseguindo crescer reverteu os metabólitos primários em secundários e passou a produzir fenóis que levaram, gradualmente, à morte dos explantes. Resultado semelhante foi encontrado por Noletto & Silveira (2004) em segmentos nodais de plantas adultas de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), onde obtiveram 92% de assepsia, porém, nenhum dos explantes inoculados *in vitro* sobreviveu aos tratamentos, apresentando necrose dos tecidos e, nesse caso, com liberação de substâncias que escureciam o meio de cultura.

A utilização do meio MS com os sais reduzidos à metade e sem reguladores vegetais, está de acordo com as afirmações de Grattapaglia & Machado (1998), que afirmam que realizar um pré-condicionamento dos explantes sem a aplicação de fitorreguladores ajuda a evitar a formação de calos e, eventualmente, a intoxicação dos tecidos.

Dessa forma, com base nos dados obtidos nos experimentos 1 e 2, recomenda-se para assepsia de explantes de *Trichilia catigua*, provenientes de coleta de matrizes mantidas em condições controladas, o uso de HgCl₂ 0,05% por 5 minutos ou NaClO 1,5% por 15 minutos.

7.2.1.3 Experimento 3 – NaOCl x HgCl₂

Os dados da Tabela 9 mostram que a contaminação com fungos foi controlada em ambos os tratamentos. A percentagem de explantes com bactérias foi maior no tratamento sem antibiótico no meio, independente da assepsia utilizada. Neste estudo, não foi verificada morte dos explantes com sinais de crescimento bacteriano, sugerindo que as bactérias são endógenas e não fitopatogênicas. Não houve interação entre as variáveis analisadas.

Segundo Torres et al. (1998), a rifampicina é um antibiótico com capacidade de controlar bactérias endógenas. Nesse estudo, o uso de antibiótico não mostrou ser tóxico para os explantes e, comparando os testes com e sem uso de antibiótico a percentagem de explantes com bactérias, até a data de avaliação, foi menor com antibiótico.

Tabela 9. Efeito dos agentes desinfestante e do uso do antibiótico Rifampicina na percentagem de contaminados com fungos e bactérias em explantes de matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss.

Tratamento	% Fungos			% Bactérias		
	Com ¹ antib	Sem ² antib	Média	Com ¹ antib	Sem ² antib	Média
NaOCl 1,5% 15 min	3,23	12,90	8,06 a	6,45	35,48	20,97 a
HgCl ₂ 0,05% 10min	0,00	0,00	0,00 a	0,00	21,87	10,94 a
Média	1,61A	6,45 A		3,23 B	28,68 A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

¹Com uso de antibiótico; ²Sem uso de antibiótico.

Lima & Moraes (2006) usaram rifampicina no controle bacteriano e obtiveram um controle eficiente da contaminação bacteriana (66,6%), não observando anormalidades e nem ocorrência de variantes somaclonais em bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira) nos explantes e nem nas plântulas, em vários subcultivos utilizados. No entanto, segundo os autores, o antibiótico no meio de cultura interferiu na multiplicação, diminuindo o número de brotos por explante.

Na Tabela 10 os resultados mostram maior percentagem de oxidados no tratamento com HgCl₂ 0,05% para os tratamentos com e sem antibiótico. A percentagem de explantes sobreviventes não diferiu entre os tratamentos de assepsia, contudo, foi maior com o uso de antibiótico no meio de cultura. Não houve interação entre as variáveis analisadas.

A média de sobrevivência de ambos os tratamentos de assepsia é considerada boa para uma espécie lenhosa. Os resultados desse estudo podem ser comparados com os de Ribas et al. (2005) com segmentos nodais de peroba-rosa. Os autores testaram NaOCl 0,25% e HgCl₂ 0,05% por 10 minutos e obtiveram, respectivamente, 70 e 84,10% de sobrevivência dos explantes, confirmando a eficiência de ambos os tratamentos.

Tabela 10. Efeito do agente desinfestante e do uso do antibiótico Rifampicina na percentagem de explantes de *Trichilia catigua* A. Juss oxidados e sobreviventes.

Tratamento	% Oxidados			% Sobreviventes		
	Com ¹ antib	Sem ² antib	Média	Com ¹ antib	Sem ² antib	Média
NaOCl 1,5% 15 min	3,23	6,45	4,84 b	87,10	45,16	66,13 a
HgCl ₂ 0,05% 10min	18,75	12,50	15,63 a	81,25	65,62	73,47 a
Média	10,98 A	9,48 A		84,17 A	55,39 B	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

¹Com uso de antibiótico; ²Sem uso de antibiótico.

Com base nos dados obtidos no experimento 3, recomenda-se para assepsia de explantes de *Trichilia catigua*, provenientes de coleta de matrizes mantidas em condições controladas, o uso HgCl₂ 0,05% por 10 minutos e NaClO 1,5% por 15 minutos adicionado do antibiótico Rifampicina. Contudo, segundo George (1993), apesar do cloreto de mercúrio ser mais eficiente do que o hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes, ele é um produto tóxico e deve ser usado com muita cautela, tanto para evitar a fitotoxidez quanto para o contato humano.

7.2.1.4 Fase de estabelecimento

Embora tenha sido possível obter um protocolo de assepsia de explantes provenientes de matrizes mantidas em casa de vegetação, não ocorreu o estabelecimento da cultura. A maioria dos explantes não completou seu desenvolvimento até a fase de plântula. Foram testados os meios de cultura Anderson, WPM e MS completo e com redução de sais, adicionado de BAP, cinetina, caseína hidrolisada como também nitrato de prata e cobalto.

Aos 30 dias após a implantação, observou-se emissão de brotos, folíolos e folhas. Os brotos emitidos não alongaram, os folíolos apresentaram clorose seguido de queda. Houve formação de tufos em forma de rosetas que também não apresentavam alongamento. Em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla*) Lameira et al. (2005) descrevem brotações de segmento apical, na sua maioria, em forma de rosetas. A explicação

dos autores foi que a plântula ao emergir, apresenta poucas gemas foliares, muito próximas umas das outras e com epicótilo fino na zona apical. Essa descrição do mogno assemelha-se a da *T. catigua*.

Após longo período de exposição dos explantes, principalmente aos reguladores vegetais, foram observados sinais de encurtamento dos entrenós, engrossamento da base dos explantes, bem como modificações das folhas, algumas apresentando encarquilhamento (Figura 9). Essas observações não foram melhor avaliadas em virtude de não se ter material suficiente para experimentação.



Figura 9. Aspecto dos explantes provenientes de matrizes de *Trichilia catigua* A. Juss após longo período em meio de cultura. (A) Queda dos folíolos; (B) Clorose dos folíolos; (C) Folíolos modificadas; (D) Encurtamento dos entrenós.

7.2.2 Sementes

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), quando são propagados embriões e tecidos de sementes, ou ainda ápices e gemas laterais isolados de plântulas

germinadas em condições assépticas, um genótipo desconhecido está sendo propagado, de interesse ou não. No entanto, no presente estudo, muitas foram as dificuldades encontradas na propagação de *Trichilia catigua* por cultura de tecidos utilizando-se explantes nodais de matrizes mantidas em casa de vegetação. O lento crescimento das brotações e a grande ocorrência de bactérias endógenas, determinava a morte dos explantes, levando a resultados não satisfatórios.

De acordo com George (1993), as sementes, resultado de reprodução sexual, onde apesar dos tecidos apresentarem variação genética, são normalmente mais fáceis de desinfestação e acabam constituindo um ponto de partida para o trabalho experimental de cultura de tecidos. Dessa forma, sementes foram utilizadas na tentativa de obtenção de material mais jovem e com menores problemas de contaminação, o que poderia levar a obtenção de plântulas aptas à fase de multiplicação.

7.2.2.1 Assepsia e germinação de sementes

A assepsia das sementes, deixadas por 48 horas no captam 50 pó seguida do tratamento com hipoclorito de cálcio (CaOCl_2) 5% por 10 minutos, resultou em menor contaminação quando comparada com a assepsia apenas com CaOCl_2 e não diferiu de captam com água mais CaOCl_2 5% (Tabela 11). O tratamento com CaOCl_2 não foi efetivo na desinfestação de sementes. Resultados semelhantes foram verificados para sementes de *Physalis peruviana* em que a desinfestação utilizando-se CaOCl_2 3% durante 3 minutos resultou em 55,22% de contaminação fúngica e 34,54% de contaminação bacteriana (CHAVES et al., 2005).

Diversos trabalhos na literatura registram o uso de agentes desinfestantes na assepsia das sementes. Para Grattapaglia & Machado (1998), o uso de hipoclorito de cálcio pode ser menos tóxico aos tecidos do que o hipoclorito de sódio. No entanto, pela facilidade de obtenção e segurança no uso, muitos protocolos de assepsia de sementes relacionam o uso de hipoclorito de sódio, como de Sabá et al. (2002) que testaram o NaOCl a 2 e 3% durante 20 minutos, obtendo-se baixa contaminação com fungos, igual a

6,70%, ao realizar a desinfestação a 3%, no tratamento de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*).

Tabela 11. Número de sementes de *Trichilia catigua* A. Juss avaliadas, percentagem de contaminadas por fungos e germinadas. Coleta em Botucatu (SP) em dezembro de 2005 e submetidas aos tratamentos de assepsia.

Tratamento	Número Sementes	Sementes Contamin.			Sementes Germinadas		
		Número	%		Número	%	
¹ Captam 50 _{P6} + CaOCl ₂	195	52	26,67	b	95	48,72	a
² CaOCl ₂	192	81	42,19	a	78	40,63	a
³ Captam 50 _{H2O} + CaOCl ₂	192	66	34,38	ab	94	48,96	a
Total	579	199	34,37		267	46,11	

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

¹Captam 500_{P6} + CaOCl₂ = Captam 500 pó(48 horas)+CaOCl₂ 5% (10 min.); ²CaOCl₂=CaOCl₂5% (10 min.); ³Captam 500_{H2O} + CaOCl₂=Captam500 c/água (15 min.) + CaOCl₂ 5% (10 min.).

As contaminações observadas na germinação de sementes de *T. catigua* foram com fungos, não tendo sido registradas contaminações bacterianas, as quais, não foram visualizadas, em virtude das sementes germinarem em substrato vermiculita. Mesmo em sementes germinadas observou-se ocorrência de fungos nas plântulas.

Uma das causas da elevada contaminação das sementes pode ter sido o modo de armazenamento e o tempo transcorrido entre a coleta e sua utilização. Outra fonte de contaminação pode ser a permanência, em muitas sementes, do arilo que, quando não retirado na coleta, seca e adere à semente, aumentando a possibilidade de ataque de fungos, diminuindo a germinação. Segundo NG (1980) citado por Moscheta (1995), o armazenamento das sementes sem a retirada do arilo, possibilita que os tecidos, em fermentação e decomposição, produzam ácidos e álcoois que nelas penetrando ocasionam a morte do embrião. Rocha (2005) observou que menores taxas de contaminação na germinação de sementes são verificadas quando elas são retiradas diretamente de dentro do fruto, o que diminui seu contato com agentes contaminantes.

Trabalhos com espécies da família Meliaceae descrevem protocolos de assepsia de sementes. Resultados satisfatórios foram encontrados por Rocha (2005) com sementes de canjarana (*Cabralea canjerana*) imersas em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) acrescido de Tween[®] 20 por 30 minutos, obtendo-se 75% de desinfestação com 90% de germinação após 14 dias de implantação. Couto et al. (2004) estudaram sementes de mogno

(*Swietenia macrophylla*) e testaram tratamentos com hipoclorito de sódio 0,0, 2,5% e 5% durante 10, 20 e 30 minutos, seguidos por uma imersão rápida das sementes em benlate (1 g L⁻¹) e os resultados não mostraram diferenças entre os tratamentos com média de 18% de sementes contaminadas, desinfestadas ou não.

Para outras espécies lenhosas como aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), na desinfestação de frutos-semente, Andrade et al. (2000) usaram imersão em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos e não verificaram contaminação.

A germinação das sementes *in vitro* de *T. catigua* iniciou 30 dias após a inoculação, em todos os tratamentos. As percentagens de sementes germinadas não diferiram entre os tratamentos (Tabela 11). Além do fato da permanência do arilo nas sementes, a baixa percentagem de germinação pode ser devido à espécie ser recalcitrante, diminuindo o poder germinativo das sementes após sete dias da coleta (MOSCHETA, 1995). Outra causa pode ser a fitotoxidez causada pelos agentes desinfestantes. A assepsia tem por objetivo a descontaminação superficial da semente. Porém, em sementes com fissuras ou perfurações o agente desinfestante pode penetrar através do tegumento matando o embrião, impedindo com isso a germinação.

Em espécies da família Meliaceae como *Cedrela fissilis* (cedro-rosa), as sementes foram desinfestadas com cloro ativo a 2,5% do princípio mais Tween[®]20 por 75 minutos, obtendo-se, em 12 dias, 95% de germinação (NUNES et al., 2002). Com sementes de mogno, Couto et al., (2004) obtiveram 48% de germinação aos 30 dias da inoculação com o uso de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0, 2,5 e 5%. Segundo os autores esses resultados são baixos se comparados com os citados na literatura para a mesma espécie.

A média de germinação nas condições desse experimento foi de 46,11%. Contudo, sementes coletadas em outubro de 2006, processadas em até 48 horas, retirando o arilo e desinfestadas com captam 50 pó mais CaOCl₂, apresentaram 82,20% de germinação *in vitro* e 11,8% de contaminação por fungos.

Para sementes de *Trichilia catigua* recomenda-se na sua coleta a retirada das cápsulas dos frutos e dos arilos que encobrem as sementes, seguindo-se a lavagem em água corrente e o processamento em até 48 horas. Realizando-se a assepsia das sementes com captam 50 PM, pó ou líquido, mais hipoclorito de cálcio 5%, pode-se obter menores percentuais de contaminação.

7.2.2.2 Multiplicação com explantes provenientes de sementes

A germinação das sementes disponibilizou material vegetativo juvenil, menos lignificado e com menores ocorrências de contaminações.

Considerou-se entrenó o alongamento com comprimento maior ou igual a um centímetro acima do primeiro nó, e que pudesse ser excisado originando um novo explante.

7.2.2.3 Multiplicação com BAP e GA₃

Os tratamentos com BAP e GA₃ não influenciaram o número de folíolos aos 30 e 60 dias (Tabela 12). Houve queda de folhas entre 30 e 60 dias no tratamento sem BAP com 2,88 µM GA₃. No entanto, o aumento de folíolos de zero a 60 dias não foi afetado pelos tratamentos. O baixo incremento pode ter sido devido ao estresse pelo corte do explante da plântula, por ocasião da inoculação e ao hábito de crescimento lento da espécie.

Tabela 12. Influência do benzilaminopurina (BAP) e do ácido giberélico (GA₃) no número de folíolos de explantes de *Trichilia catigua* A. Juss aos 30 e 60 dias após o corte de plântulas germinadas *in vitro*.

Tratamento µM		Folíolos		Aumento folíolos até		
BAP	GA ₃	30 dias	60 dias	30 dias	30 aos 60 dias	0 a 60 dias
0,00	0,00	2,93 a	3,20 a	0,67 a	0,27 ab	0,94 a
0,00	1,44	2,67 a	3,23 a	0,48 a	0,56 a	1,04 a
0,00	2,88	2,38 a	2,02 a	0,23 a	-0,36 b	-0,11 a
2,22	0,00	2,26 a	2,52 a	0,28 a	0,26 ab	0,54 a
2,22	1,44	2,52 a	2,83 a	0,24 a	0,31 ab	0,55 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% .

Não houve efeito do BAP e do GA₃ sobre a percentagem de explantes com entrenós aos 30 e 60 dias e percentagem de explantes com brotações aos 30 dias (Tabela

13). A avaliação aos 60 dias mostrou que o tratamento com zero de BAP combinado com 1,44 μM GA_3 foi superior a testemunha e zero de BAP combinado com 2,88 μM GA_3 .

Observou-se rizogênese somente nos tratamentos com ausência de BAP.

Apesar da elevada percentagem de explantes com brotações, observadas na Tabela 13, aos 60 dias da avaliação, eles não puderam ser subcultivados devido ao comprimento dos entrenós e das brotações serem inferiores a 1,5 cm. As brotações apresentaram crescimento inicial lento. Após seis meses no mesmo meio de cultura com reguladores vegetais obteve-se uma taxa de multiplicação média de 1,30 brotos por explante. No entanto, não sendo possível passar para a fase de enraizamento.

O longo tempo de exposição dos explantes ao meio de cultura e aos reguladores vegetais, no caso desse experimento, maior do que seis meses, gerou efeitos residuais os quais são difíceis de separar e relacionar aos tratamentos. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) o efeito residual é positivo quando está relacionado ao rejuvenescimento *in vitro* das espécies, porém é problemático quando afeta o alongamento e o posterior enraizamento.

Tabela 13. Influência do benzilaminopurina (BAP) e do ácido giberélico (GA_3) na percentagem de explantes com entrenós e com brotações aos 30 e 60 dias após o corte de plântulas de *Trichilia catigua* A. Juss germinadas *in vitro*.

Tratamentos		% Explantes			
μM		c/ entrenó aos	c/ entrenós aos	c/ brotações aos	c/ brotações aos
BAP	GA_3	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
0,00	0,00	35,00 a	35,00 a	40,00 a	50,00 b
0,00	1,44	45,00 a	50,00 a	50,00 a	90,00 a
0,00	2,88	47,62 a	61,90 a	28,57 a	57,14 b
2,22	0,00	31,58 a	31,58 a	36,84 a	73,68 ab
2,22	1,44	42,86 a	50,00 a	42,86 a	85,71 ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

7.2.2.4 Multiplicação com BAP e NAA associado a GA_3

Para o percentual de explantes com entrenós aos 30 e 60 dias não houve interação entre as concentrações de BAP e a utilização ou não de NAA associado a GA_3

(Tabela 14). Observa-se tendência de diminuição no percentual de plantas com entrenós aos 30 e 60 dias, à medida que aumenta a concentração de BAP, com ou sem NAA associado a GA₃. Entretanto a concentração de BAP somente exerceu efeito para percentual de plantas com entrenós aos 30 dias. De forma semelhante, a utilização de NAA associado a GA₃ também diminuiu o percentual de plantas com entrenós aos 30 dias, não afetando este percentual aos 60 dias.

No tratamento testemunha houve menor formação de entrenós aos 30 e 60 dias, evidenciando a necessidade de utilização de reguladores vegetais para alongar os entrenós.

Tabela 14. Efeito da benzilaminopurina (BAP) com ácido naftaleno acético (NAA) associado a ácido giberélico (GA₃) na percentagem de explantes com entrenó aos 30 e 60 dias após corte de plântulas de *Trichilia catigua* A. Juss germinadas *in vitro*.

BAP μM	% Explantes com entrenó					
	Aos 30 dias			Aos 60 dias		
	NAA+GA ₃ (μM)		Média	NAA+GA ₃ (μM)		Média
	(0+0)	(0,05+0,29)		(0+0)	(0,05+0,29)	
0,44	81,25	63,64	72,44 a	93,75	100,00	96,87 a
2,22	80,00	53,33	66,66 ab	93,33	73,33	83,33 a
4,44	53,33	33,33	43,33 b	86,67	58,33	72,50 a
Média	71,53 A	50,10 B		91,25 A	77,22 A	
Testem.	26,67*			53,33*		

Letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

*Testemunha difere dos demais tratamentos por regressão logística ao nível de 5%.

Aos 30 dias de avaliação não houve efeito das doses de BAP com ou sem NAA associado a GA₃ sobre a percentagem de explantes com brotações. Aos 60 dias houve interação entre as variáveis analisadas, sendo que o aumento das doses de BAP, na ausência de NAA associado a GA₃, aumentou a percentagem de explantes com brotação. Na presença de NAA associado a GA₃ observou-se tendência de efeito contrário, porém, não significativo. Na menor concentração de BAP (0.44 μM) a utilização de NAA associado a GA₃ aumentou a percentagem de explantes com brotações (Tabela 15).

Tabela 15. Efeito do benzilaminopurina (BAP) com ácido naftaleno acético (NAA) mais ácido giberélico (GA₃) na percentagem de explantes com brotação aos 30 e 60 dias após o corte de plântulas de *Trichilia catigua* A. Juss germinadas *in vitro*.

BAP μM	% Explantes com brotações					
	Aos 30 dias			Aos 60 dias		
	NAA+GA ₃ (μM)		Média	NAA+GA ₃ (μM)		Média
	(0+0)	(0,05+0,29)		(0+0)	(0,05+0,29)	
0,44	0,00	18,18	10,65 a	18,75 b B	63,64 a A	41,19
2,22	0,00	13,33	8,33 a	46,67 ab A	33,33 a A	40,00
4,44	13,33	16,77	15,00 a	53,33 a A	25,00 a A	39,16
Média	6,60 A	16,00 A		39,58 A	40,65 A	
Testem.	zero			26,67 ns		

Letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%.

ns = testemunha não diferiu da média dos demais tratamentos.

Teixeira et al. (2004) em explantes de *Prunus* spp (ameixeira) relataram que concentrações de BAP maiores que 4,44 μM inibiram o alongamento das brotações e promoveram hiperidricidade. Quando usaram 2,22 μM de citocinina, houve regeneração de um maior número de brotos/explante, com condições adequadas para o enraizamento. No presente trabalho, o uso combinado de NAA com GA₃ possibilitou utilizar menores concentrações de BAP no meio de multiplicação, resultando em percentuais de explantes com brotações maiores de 60%, aos 60 dias de avaliação.

Souza et al. (2003) verificaram menor ocorrência de brotos, que encontravam-se malformados, no meio de cultura contendo 4,44 μM de BAP utilizado na multiplicação de arnica (*Lychnophora pinaster*). Quando Nunes et al. (2002) testaram várias concentrações de BAP e NAA em *Cedrela fissilis* encontraram 2,7 brotos por explante como melhores médias de multiplicação em nodos cotiledonares, com 1,25 μM de BAP combinado com zero de NAA. Segundo os autores, o BAP quebrou a dominância apical das gemas axilares, promovendo incremento de brotações com maior comprimento.

Em explantes de maracujazeiro (*Passiflora edulis*), Trevisan & Mendes (2005) utilizaram as citocininas BAP e TDZ com e sem nitrato de prata e concluíram que a organogênese não ocorre na ausência de reguladores vegetais para promover o desenvolvimento de gemas adventícias. De maneira semelhante, no presente trabalho, o

tratamento controle, sem a utilização de reguladores vegetais, apresentou baixa formação de brotos e entrenós.

Observou-se rizogênese somente nos tratamentos com ausência de BAP.

Após 90 dias, os explantes foram transferidos para a mesma formulação do meio MS sem os reguladores vegetais. Avaliados aos 30 dias após a troca de meio observou-se queda das folhas, gemas dormentes, ocorrência de tufos com rosetas, sem desenvolvimento e muitos brotos secando da base para o ápice. Ocorreu encurtamento dos entrenós em todos os tratamentos. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) concentrações crescentes de citocininas tendem a inibir o alongamento das brotações, formando entrenós mais curtos tornando-se um fator limitante no enraizamento. Chaves et al. (2005) verificaram que elevadas concentrações de BAP resultaram em encurtamento dos entrenós de *Physalis peruviana*.

7.2.2.5 Experimento com variação de GA₃

Os dados da Tabela 16 mostram que houve formação de calo na base dos explantes em todos os tratamentos com exceção da testemunha, embora o BAP tenha sido usado em baixa concentração, igual a 0,44 µM, não havendo efeito das concentrações de GA₃ e NAA, nem interação desses fatores. No tratamento testemunha houve formação de raízes. A ocorrência de calos na base dos explantes ocorre em muitas espécies, como no trabalho de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), em que Andrade et al. (2000) em segmento internodal e cotiledonar verificaram a ocorrência de 71 e 85% de calos com o uso das concentrações iguais a 11 e 22 µM de BAP, respectivamente.

O número de repicagens, observados na Tabela 17, refere-se aos explantes provenientes de plântulas de *T. catigua* que foram excisados e subcultivados por 60 dias. Não houve diferença entre as concentrações de GA₃ e NAA e nem interação entre essas variáveis. As concentrações de GA₃ não promoveram alongamento das brotações. Segundo George (1996) o efeito do GA₃ na proliferação de brotações varia conforme a interação

existente com outros reguladores de crescimento, dependendo da espécie que está sendo micropropagada.

Tabela 16. Efeito das concentrações de GA₃ e NAA sobre a percentagem de explantes de *Trichilia catigua* A. Juss provenientes de plântulas germinadas de sementes *in vitro*, com formação de calo na base.

GA ₃ μM	NAA μM		Média
	0,00	0,05	
0,00	90,83	87,50	89,17 a
0,29	91,67	75,83	83,75 a
1,45	85,00	100,00	92,50 a
Média	89,17 A	87,78 A	
Testemunha	zero		

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si por regressão logística ao nível de 5%

Mesmo na ausência de GA₃ os tratamentos com BAP e NAA não aumentaram os explantes subcultivados. Estes resultados assemelham-se aos de Dutra et al. (2004) com explantes de oliveira. Os autores não verificaram efeito dos reguladores NAA e BAP no aumento de brotações, salientando a dificuldade de induzir brotações nessa espécie. Essa dificuldade foi constatada em *Trichilia catigua*.

O número de explantes, provenientes das brotações pode ser considerado baixo quando comparado com espécies como canjarana, amoreira-preta e aroeira. Porém, considerando que no presente estudo foram originados, em média, 2,46 explantes por semente e esses quando submetidos, por exemplo, a 0,44 μM BAP, resultaram em 1,75 explantes, a taxa de multiplicação foi de 4,30 explantes por semente germinada, valor que pode viabilizar a multiplicação de *T. catigua*.

No presente estudo, 87,50% dos explantes no tratamento testemunha formaram raízes. A concentração endógena de auxina pode ter estimulado o enraizamento. Nos tratamentos com o uso de BAP, em baixa concentração, igual a 0,22 μM, não houve enraizamento, sugerindo que a auxina endógena estava presente em baixa concentração.

Tabela 17. Efeito das concentrações de GA₃ e NAA sobre o número de repicagens provenientes explantes de plântulas germinadas de sementes *in vitro* de *Trichilia catigua* A. Juss

GA ₃ μM	NAA μM		Média
	0,00	0,05	
0,00	1,75	1,24	1,50 a
0,29	1,40	1,36	1,38 a
1,45	1,24	1,44	1,34 a
Média	1,46 A	1,35 A	
Testemunha	1,29 ns		

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de F ao nível de 5%.

ns = testemunha não diferiu da média dos demais tratamentos.

Em *Mandevilla illustris*, Souza (2006) obteve enraizamento em algumas brotações em meio sem auxina, atribuindo esses resultados ao nível endógeno de auxina das brotações e argumenta que esses resultados não descartam a necessidade de usar auxina exógena para induzir uma melhor formação de raiz. Fráguas et al. (2004) também registraram rizogênese na multiplicação de figo na ausência de cinetina, independente da presença de GA₃.

A espécie *Trichilia catigua* tem potencial para propagação *in vitro*, contudo, outros estudos devem ser realizados para a obtenção de uma maior produção de propágulos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A melhor estação do ano para o enraizamento é a primavera;
- O ácido indolbutírico (IBA) foi o melhor regulador vegetal para o enraizamento das estacas quando utilizado na dose de 5000 mg L⁻¹;
- Pode-se utilizar estacas medianas ou apicais para o enraizamento;
- O uso de hipoclorito de sódio 1,5% de cloro ativo ou cloreto de mercúrio 0,05% permitem a desinfestação de explantes de *T. catigua* provenientes de matrizes mantidas em casa de vegetação;
- Não foi possível o estabelecimento da espécie via explantes provenientes de matrizes mantidas em casa de vegetação;
- A assepsia de sementes com captam 50 PM e hipoclorito de cálcio 5% resultaram em elevada percentagem de germinação e baixa de contaminadas;
- O material de plântulas de *T. catigua* germinadas *in vitro* permite obter explantes mais juvenis e menos contaminados;
- O uso de ácido naftaleno acético (NAA) associado a ácido giberélico (GA₃) só é necessário em baixas concentrações de benzilaminopurina (BAP) para formar brotações em explantes de *Trichilia catigua*;
- Explantes excisados de plântulas germinadas de sementes de *Trichilia catigua* formaram raízes na ausência de reguladores vegetais;

- O uso dos reguladores benzilaminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (NAA) e ácido giberélico (GA₃) nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog) e MS com metade dos sais, não possibilitaram os subcultivos de material juvenil de *T. catigua*.

9. CONCLUSÕES

Os dados avaliados permitem concluir sobre a espécie *Trichilia catigua* A. Juss:

- A espécie pode ser propagada por enraizamento de estacas;
- A estação do ano influencia o enraizamento;
- O uso de reguladores vegetais é necessário para o enraizamento;
- A concentração dos reguladores vegetais afeta o enraizamento;
- A posição da estaca no ramo não interfere no enraizamento;
- Não foi possível obter protocolo de propagação *in vitro*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR, A.; MUÑOZ, A. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). **Revista Florestal**, Kurú (Costa Rica), v.2, n.5, p.1-11, 2005.

ALIERO, B. L. Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. **African Journal of Biotechnology**, Kampala (Uganda), v.2, n.9, p.325-327, 2003.

ANDERSON, W. C. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. **Wageningen**, v.112, p.13-20, 1980.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; DE OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama® and its constituents. **Phytotherapy Research**, West Sussex, v.15, p.416-442, 2001.

ARAÚJO, P. S. R.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; SILVA, J. A. F.; BARBANO, M. T. Enraizamento de estacas de limeira ácida `Tahiti` coletadas em diferentes posições na árvore. **Scientia Agricola**, Piracicaba (SP), v.56, n.2, p.357-361, 1999.

ASSIS, T. F. D.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v.1, p.261-296, 1998.

AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A. Micropropagação da amoreira-preta CV. Brazos. **Sciencia Agraria**, Curitiba (PR), v.3, n.1-2, p.112-132, 2002.

BARBOSA, N. R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. **Phytotherapeutic Research**, West Sussex, Nov, v.18, n.11, p.942-944, 2004.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.2, 1991. 377p.

BASTOS, D. C.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; ALMEIDA, L. F. P.; ENTELMANN, F. A.; ALVES, A. S. R. Tipo de estaca e concentração de ácido indolbutírico na propagação de lichieira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.30, n.1, p.97-102, 2006.

BASTOS, D. C.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; LIBARDI, M. N.; ALMEIDA, L. F. P.; ENTELMANN, F. A. Enraizamento de estacas lenhosas e herbáceas de cultivares de caquizeiro com diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Lavras (MG), v.27, n.1, p.182-184, 2005.

BELTRAME, F. L.; CASS, Q. B.; FILHO, E. R.; BARROS, F.; CORTEZ, D. A. G. Análisis de productos fitoterapéuticos comerciales de “catuaba” por LC-UV-MS. **Noticias Técnicas del Laboratorio**, Mannheim, v.3, p.14-16, 2004.

BELTRAME, F. L.; FILHO, E. R.; BARROS, F. A.; CORTEZ, D. A.; CASS, Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. **Journal of Chromatography**, Holanda, Jun 30, v.1119, n.1-2, p.257-263, 2006.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.87-145, 1998.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine catuaba induces endothelium-dependent and independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy Research**, West Sussex, v.11, p.32-38, 1997.

CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. **Psychopharmacology**, Berlim, Oct, v.182, n.1, p.45-53, 2005.

CARDOSO, J. C.; MING, L. C.; PEREIRA, A. M. S. Influência de fitorreguladores em diferentes concentrações e substratos no enraizamento de estacas caulinares de bolsa-de-pastor. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 42: Congresso Latino Americano de Horticultura, 11, 2002, Uberlândia (MG). **Suplemento 1** Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia, 2002.

CARVALHO, C. M.; CUNHA, R. J. P.; RODRIGUES, J. D. Enraizamento de estacas semilenhosas de lichieira utilizando ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal (SP), v.27, n.1, p.95-97, 2005.

CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, Santa Maria (RS), v.34, n.5, p.1401-1406, 2004.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal (Teoria e prática)**. São Paulo: Cedres, 2005. 640p.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. R.; TOWERS, G. H. N. Biological activity of limonoids from the rutales. **Phytochemistry**, v.31, n.2, p.377-394, 1992.

CHATTOPADHYAY, R. R.; CHATTOPADHYAY, R. N.; MAITRA, S. K. Possible mechanism of antiinflammatory activity of *Azadirachta indica* leaf extract. **Indian Journal of Pharmacology**, v.25, p.99-100, 1993.

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

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.29, n.6, p.1281-1287, 2005.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**, Lavras (MG), v.10, n.1, p.118-124, 2004.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C. Geographical distribution and associated environment characterisation of catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae) in Paraná State – Brazil. **Acta Horticulturae**, Canadá, p.25-28, 1998.

CORTEZ, D. A. G. **Estudo fitoquímico de *Trichilia stipulada* e *Trichilia hirta* (Meliaceae)**. São Carlos (SP), 1993. 254f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia) - Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) **Revista Árvore**, Viçosa (MG), v.28, n.5, p.633-642, 2004.

CUNHA, U. S. D.; VENDRAMIM, J. D.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C. Potencial de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) como fonte de substâncias com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina (PR), v.34, n.4, p.667-673, 2005.

- DUARTE, O. R.; FACHINELLO, J. C.; SANTOS FILHO, B. G. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p.513-516, 1992.
- DUTRA, L. F.; KERSTEN, E.; FACHINELLO, J. C. Época de coleta, ácido indolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba (SP), v.59, n.2, p.327-333, 2002.
- DUTRA, L. F.; OLIVEIRA, A. F.; FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.28, n.1, p.220-223, 2004.
- ERIG, A. C.; FORTES, G. R. D. L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, Santa Maria (RS), v.32, n.4, p.577-582, 2002.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, Santa Maria (RS), v.34, n.5, p.1443-1449, 2004.
- ERIG, A. C.; VICENZI, M.; CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Desinfestação de explantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé (RS), v.8, n.1, p.142-148, 2003.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN A.; NACHTIGAL J. C. (Ed.). **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.69-109, 2005.
- FAPESP, P. Na batida natural. **Revista Pesquisa Fapesp**, n.78, 2002. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/index.php?art=1884&bd=1&pg=1&lg=>> Acessado em: nov. 2006.
- FOCHESATO, M. L.; MARTINS, F. T.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F.; BARROS, I. B. I. Propagação de louro (*Laurus nobilis* L.) por estacas semilenhosas com diferentes quantidades de folhas e tratadas com ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu (SP), v.8, n.3, p.72-77, 2006.
- FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.28, n.1, p.49-55, 2004.
- FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN G.; MELLO J. C. D.; MENTZ L. A.; PETROVICK P. R. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**: Porto Alegre:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, v.1, p.101-121, 2003.

FRANZON, R.; ANTUNES, L. E. C.; C.B., R. M. D. Efeito do IBA e de diferentes tipos de estaca na propagação vegetativa da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas (RS), v.10, n.4, p.515-518, 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Edington: Exegetics Limited, v.1, 1993. 574p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology**. Edington: Exergetics, 1996. 574p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Eastern Press, 1984. 709p.

GLÓRIA, B. A. D.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa, 2003. 438p.

GONÇALVES, R. D. C. R.; VENDRAMIM, J. D. Modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepdoptera:Gelechidae). **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo (SP), v.17, n.2, p.215-220, 2004.

GONDIM, M. J. D. C. **Dispersão de sementes de *Trichilia* sp (meliaceae) por aves, em uma mata mesófila semidecídua, no município de Rio Claro, SP**. Rio Claro, 1995. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Zoologia) - Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista.

GONTIJO, T. C. A.; RAMOS, J. D.; MENDONÇA, V.; PIO, R.; ARAÚJO NETO, S. E.; CORRÊA, F. L. D. O. Enraizamento de diferentes tipos de estacas fde aceroleira utilizando ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal (SP), v.25, n.2, p.290-292, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de Biotecnologia. 2006. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>> Acessado em: Dez. 2006.

HAMMAD, E. M. A.; ZOURNAJIAN, H.; TALHOUK, S. Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia*

tabaci (Hom., Aleyrodidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlim, v.125, p.483-488, 2001.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation - principles and practices**. 7ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 7ed. São Paulo: Editora Nacional, 1985. 776 p.

KAPS, M.; LAMBERSON, W. R. **Biostatistics for Animal Science**. London: CABI Publishing, 2004. 445p.

KLEIN, R. M. **Meliáceas**. Itajaí: Flora Ilustrada Catarinense, 1984. 138p.

KNOP, W. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungsprozess der Pflanzen. **Landwirtsch Vers. St. Poland**, v.7, n.5, p.93-107, 1865.

LAGOS, J. B. **Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae**. Curitiba (PR), 2006. 102f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas/Ciências da Saúde) - Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

LAMEIRA, O. A.; LOPES, S. D. C.; NOGUEIRA, R. C.; CORDEIRO, I. M. C. C.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, L. R. S. Efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento sobre a micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla* King) por meio de explantes juvenis. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras (MG), v.1, n.2, p.53-58, 2005.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.24, p.56-63, 2000.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J. D. Efeitos da aplicação de reguladores vegetais e do ácido bórico, em estacas de lichieira (*Litchi chinensis* SONN.). **Scientia Agrária**, Curitiba (PR), v.50, n.1, p.33-39, 1993.

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

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. CAUPIRA). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia (GO), v.36, n.3, p.181-186, 2006.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v.30, p.421-427, 1981.

LOPES, S. D. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento in vitro de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras (MG), v.7, n.1, p.124-128, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4aed. Nova Odessa, SP, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002

MACEDO, J. A. B. A contaminação bacteriana versus água potável versus portaria 14609/2000 e 518/2004. 2006. Disponível em: <<http://www.aguasseaguas.ufjf.br>> Acessado em: Agosto 2006.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; GUERRA, M. P.; HOPPE, J. M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria (RS), v.9, n.1, p.47-61, 1999.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração in vitro de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria (RS), v.11, n.2, p.93-101, 2001.

MARQUES, L. C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal catuaba. **Revista Racine**, São Paulo (SP), v.3, n.43, 1998.

MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B. Recalcitrant seed Biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.). **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1999.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.93-120, 2000.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda, v.109, p.493-500, 2007.

MINDÊLLO NETO, U. R.; TORRES, A. N. L.; HIRANO, E. Enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro cv. Marfim em diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Scientia Agraria**, Curitiba (PR), v.5., n.1-2, p.55-59, 2004.

MING, L. C.; CORREIA JÚNIOR, C. Geographic distribution and associated environments characterization of *Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae in Santa Catarina State – Brazil. **Acta Horticulturae**, Bélgica, v.569, p.91-94, 2002.

MOSCHETA, I. S. **Morfologia e desenvolvimento dos frutos, sementes e plântulas de *Cabralea canjerana* (VELL.) MART., *Guarea kunthiana* A. Juss. e *Trichilia catigua* A. Juss. (meliaceae – melioideae)**. Rio Claro (SP), 1995. 160f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

MOURÃO, K. S. M.; PINTO, D. D.; SOUZA, L. A. D.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia da plântula e do tirodendro de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Acta Scientiarum**, Maringá (PR), v.24, n.2, p.601-610, 2002.

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

NACHTIGAL, J. C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R. A.; FACHINELLO, J. C.; MAZZINI, A. R. A. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas (MG), v.16, n.1, p.229-235, 1994.

NDUNG'U, M.; HASSANALI, A.; HOOPER, A. M.; CHHABRA, S.; MILLER, T. A.; PAUL, R. L.; TORTO, B. Ring A-seco mosquito larvicidal limonoids from *Turraea wakefieldii*. **Phytochemistry**, v.64, p.817-823, 2003.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia & Desenvolvimento**, v.33, 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>> Acessado em: janeiro de 2007.

NORBERTO, P.M.; CHALFUN, N.N.J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R.D.; PEREIRA, G.E.; MOTA, J.H. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.25, p.533-541, 2001.

NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.70, p.259-268, 2002.

OLIVEIRA, C. H.; MORAES, M. E.; MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**, v.19, p.54-57, 2005.

OLIVEIRA, K. P.; SILVA, A. B.; SOFIAT, F. T.; FERNANDES, M. A.; MARQUES, L. C. Estudo farmacológico das cascas da catuaba vermelha (*Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae). In: VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 2003b, São Pedro. **Estudo farmacológico das cascas da catuaba vermelha (*Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae)** São Pedro: 2003.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: Funesp, 1996. 83p.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. Interações entre auxinas e ácido bórico, no enraizamento de estacas caulinares de *Coffea arabica* L. CV. Mundo Novo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba (SP), v.49, n.1, p.23-27, 1992.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. Efeito de auxinas e boro no enraizamento de estacas caulinares de kiwi retiradas em diferentes épocas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.2, p.213-219, 1998.

ORTEGO, F.; LOPEZ-OLGUIN, J.; RUIZ, M.; CASTANERA, P. Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato beetle larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.63, p.76-84, 1999.

PAES, E. D. G. B.; RIBAS, K. C. Z.; BIASI, L. A.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de estacas de kiwizeiro (*Actinidia deliciosa* Lang et Ferguson cv. Bruno) nas quatro estações do ano. **Scientia Agraria**, Curitiba (PR), v.4, n.1-2, p.69-76, 2003.

PASTORE, J. A. Meliaceae. In: WANDERLEY, M. D. G. L.; SHEPHERD G. J.; GIULIETTI A. M.; MELHEM T. S. (Ed.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Rima, v.3, 2003.

PAULA, J. E. D. Estudo da estrutura anatômica da madeira de espécies nativas, visando seu aproveitamento na produção de energia e papel. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.41, n.4, 1999.

PEREIRA, M. **Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de jaboticabeiras (*Myrciaria spp*)**. Piracicaba (SP), 2003. 101f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais/Silvicultura e Manejo Florestal) - Engenharia Florestal, Universidade de São Paulo.

PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A. L.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Efeitos de substratos, valores de pH, concentrações de IBA no enraizamento de estacas apicais de jaboticabeira [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg], **Scientia Forestalis**, Piracicaba (SP), v.69, p.84-92, 2005.

PIO, R.; BASTOS, D. C.; BERTI, A. J.; SCARPARE FILHO, J. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; ENTELMANN, F. A.; ALVES, A. S. R.; BETTIOL NETO, J. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.29, n.3, p.562-567, 2005.

PIVETTA, K. F. L.; CORREA, C. D. S.; PEDRINHO, D. R. Efeito de concentrações do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de duas variedades de azaléia. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 42.; Congresso Latino Americano de Horticultura, 11, 2002. **Anais...** Uberlândia, MG. Efeito de concentrações do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de duas variedades de azaléia. Uberlândia, MG: 2002.

PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; SMANIA, A., JR.; SMANIA EDE, F.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Zeitschrift für Naturforsch [C]**, May-Jun, v.57, n.5-6, p.483-488, 2002.

PIZZOLATTI, M. G.; VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M.; MADUREIRA, L. A.; BRAZ FILHO, R. Minor gamma-lactones from *Trichilia catigua* (Meliaceae) and its precursors by GC-MS. **Natural Product Research**, Roma, v.18, n.5, p.433-438, 2004.

PUPO, M. T.; ADORNO, M. A. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; PIRANI, J. R. Terpenoids and steroids from *Trichilia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo (SP), v.13, n.3, p.382-388, 2002.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de prunus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.78, p.437-442, 1977.

RAHMAN, N.; AWAN, A. A.; NABI, G.; ALI, Z. Root initiation in hard wood cuttings of olive cultivar Coratina using different concentration of IBA. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.1, n.5, p.563-564, 2002.

RAI, R.; MISRA, K. K. Micropropagation of karonda (*Carissa carandas*) through shoot multiplication. **Scientia Horticulturae**, v.103, p.227-232, 2005.

RAMOS, J.D.; MATOS, L.E.S.; GONTIJO, T.C.A.; PIO, R.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C. Enraizamento de estacas herbáceas de 'Mirabolano' (*Prunus cerasifera* Ehrn) em diferentes substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal (SP), v.25, p.189-191, 2003.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHESTSKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa (MG), v.29, n.4, p.517-524, 2005.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSKI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Ciência Florestal**, Santa Maria (RS), v.13, n.1, p.115-122, 2003.

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. Curitiba, 2005. 74f. Mestrado (Mestrado em Botânica) - Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RUFATO, L.; MEYER, G. A.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Enraizamento de estacas lenhosas de cultivares de marmeleiro (*Cydonia oblonga*) tratadas com floroglucinol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.742-744, 2001.

SABÁ, R. T.; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P. R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília (DF), v.20, n.1, p.106-109, 2002.

SALVI, N. D.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S.; EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, São Paulo (SP), v.65, p.159-162, 2001.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise estatística. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI F. (Ed.). **Germinação - do básico ao aplicado**. Porto Alegre: ArtMed, p.197-208, 2004.

SANTIAGO, E. J. **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em condições “in vitro” e “in vivo”**. 1999. 118f. Dissertação (Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em condições “in vitro” e “in vivo”.) - Universidade Federal de Lavras.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT, user's guide version 6.12**. Cary: 842 p, 1998.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. D. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras (MG), v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SCHENK, R. U.; HILDERBRANDT, A. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.50, p.199-204, 1972.

SHAFII, B.; PRICE, W. J. SAS Workshops - Proc Genmod: College of Agriculture, 2007.

SILVA, I. C. Propagação vegetativa: aspectos morfo-fisiológicos. **Boletim Técnico CEPLAC**, Ilhéus (BA), v.4, p.1-26, 1985.

SILVEIRA, S. V.; SOUZA, P. V. D.; KOLLER, O. C. Propagação vegetativa de abacateiro por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal (SP), v.26, n.1, p.191-192, 2004.

SINGH, M.; KRIKORIAN, A. D. White's standard nutrient solution. **Annals of Botany**, Oxford, v.47, p.133-139, 1991.

SOUZA, A. V. **Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart.** Lavras, 2003. 127f. Mestrado em Agronomia/Fitotecnia (Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart.) - Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras.

SOUZA, A. V. **Biotecnologia para conservação "ex situ" de plantas medicinais do cerrado**. Botucatu (SP), 2006. 219f. Tese (Biotecnologia para conservação "ex situ" de plantas medicinais do cerrado) - Agronomia (Horticultura), Universidade Estadual Paulista.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. Germinação de embriões e multiplicação in vitro de *Lychnophora pinaster* Mart. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.28, n.1, p.49-55, 2003.

SOUZA, L. A. D.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; SILVÉRIO, A. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw.

(Meliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba (PR), v.44, n.4, p.383-394, 2001.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H.; DICKEY, D. A. **Principles and procedures of statistics: biometrical approach**. Boston: McGraw-Hill, 1997. 666p.

TAVARES, M.S.W.; KERSTEN, E.; SIEWERDT, F. Efeitos do ácido indolbutírico e da época de coleta no enraizamento de estacas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) **Scientia Agricola**, Piracicaba (SP). v.52, n.2, p. 310-317. 1995.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. 2006. Disponível em: Disponível em: [http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao Batista Teixeira/Palestra - João Batista Teixeira.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%C3%A3o%20Batista%20Teixeira.pdf). Acesso em 16/02/2006.

TOFANELLI, M. B. D.; CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A.; CHALFUN JÚNIOR, A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de ramos semilenhosos de pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília (DF), v.37, n.7, p.939-944, 2002a.

TOFANELLI, M. B. D.; CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A.; CHALFUN JÚNIOR, A. Enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares de ameixeira com várias concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal (SP), v.24, n.2, p.509-513, 2002b.

TOFANELLI, M. B. D.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro cv. Okinawa em diferentes diâmetros de ramos, substratos e recipientes. **Ciência Rural**, Santa Maria (RS), v.33, n.3, p.437-442, 2003.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.11-43, 1998.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of in vitro organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa). **Scientia Agricola**, Piracicaba (SP), v.62, n.4, p.346-350, 2005.

VALMORBIDA, J.; LESSA, A. O. Enraizamento de estacas de *Ginkgo biloba* tratadas com ácido 3-indolbutírico e ácido bórico. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 45; Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 15; Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2, 2005, Fortaleza (CE). **Anais ...** Fortaleza (CE): EMBRAPA, Universidade Federal do Ceará, 2005.

VAN OVERBEEK, J.; GORDON, S. A.; GREGORY, L. E. An analysis of the function of the leaf in the process of root formation in cuttings. **American Journal of Botany**, St . Louis, v.33, p.100-107, 1946.

VAZ, Z. R.; MATA, L. V.; CALIXTO, J. B. Analgesic effect of the herbal medicine catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. **Phytotherapy Research**, v.11, p.101-106, 1997.

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

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (MG), v.29, n.3, p.582-589, 2005.

VILLANOVA, M. T. Propagación vegetativa del café. **Café Salvador**, v.29, p.669-681, 1959.

WENT, F. W. Specific factors other than auxin affecting growth and root formation. **Plant Physiology**, Horsham, v.13, p.55-80, 1938.

WHEELER, D. A.; ISMAN, M. B.; VINDAS, P. E. S.; ARNASON, J. T. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, n.29, p.347-358, 2001.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v.1, p.297-330, 1998.

ZANIOLO, S. R.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodas. **Scientia Agraria**, Curitiba (PR), v.2, n.1-2, p.31-36, 2002.

11. ANEXOS

Anexo 1. Análise do solo das matas de coleta da espécie *Trichilia catigua*. Local I.

Anexo 2. Análise do solo das matas de coleta da espécie *Trichilia catigua*. Local II.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE SOLOS - LAGES / SC
LABORATÓRIO CREDENCIADO PELA ROLAS (Rede Oficial de Laboratórios de Análises de Solos dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul)
WWW.CAV.UDESC.BR labsois@cav.udesc.br (xx49) 221 - 2245

Nome do Cliente: **ANDRE THALER** Código: **001240**
Endereço: **-PARAISO**
Cidade: **PARAISO.**
Local da Coleta: **01=01**

Outros Dados

RESULTADOS DE ANÁLISES DE SOLO(S) Nº **001240**

Nº Lab	Nº Amostra	Argila (%)	pH Água	SMP	P	K mg / dm ³	Na	M. O. (%)	H + Al	Al cmol _c / dm ³	Ca _s	Mg
18-2848	01	40	6,1	6,0	30,0	281,0	16,0	10,4	8,9	0,0	17,0	6,0

OBS: Sr. Agricultor, de posse desta análise, consulte um Engenheiro Agrônomo.
Somente ele pode orientar com segurança, as reais necessidades da sua futura lavoura.

Lages, SC 01/09/2005

Olivia Aparecida Rodolfo Figueiredo
Coordenadora do Laboratório de Solos
CRQ 13100221 - 13ª. Região

Anexo 3. Confirmação da identificação da espécie *Trichilia catigua* A. Juss.**SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE**

COORDENADORIA DE INFORMAÇÕES TÉCNICAS, DOCUMENTAÇÃO E PESQUISA AMBIENTAL

INSTITUTO FLORESTAL

Caixa Postal 13,22 - 01059-970 - São Paulo, Brasil - Fone: (011) 6231-8555 - Fax (011) 6232-5767 - iflorest@ea.usp.br

São Paulo, 27 de novembro de 2006.

Ilma. Sra.
JANICE VALMORBIDA
Rua Roraima, 09
Bairro São Cristóvão
88509 - 175 - Lages - SC

Vimos por meio desta, confirmar, conforme já comunicamos por e-mail, as identificações dos materiais pertencentes à família Meliaceae, coletados por V. Sa., os quais ora devolvemos.

Todos pertencem à espécie *Trichilia catigua* A. Juss.

Colocando-nos à disposição para o que se fizer necessário, subscrevemo-nos.

Atenciosamente

João Aurélio Pastore
Herbário D. Bento Pickel (SPSF)
Instituto Florestal de São Paulo