



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

ANA CAROLLINA SIQUEIRA DAVIS

**INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILO DE
JACARANDÁ-DA-BAHIA**

Prof^ª. Dra. EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
JUNHO – 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

ANA CAROLLINA SIQUEIRA DAVIS

**INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILO DE
JACARANDÁ-DA-BAHIA**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof^ª. Dra. EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
JUNHO – 2017

**INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILO DE
JACARANDÁ-DA-BAHIA**

ANA CAROLLINA SIQUEIRA DAVIS

Monografia aprovada em 26 de Junho de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.^aDra. Evânia Galvão Mendonça –UFSJ
Orientadora

Prof. Dr. Rogério Luiz da Silva– UFRRJ
Membro

Prof. Dr. José Carlos Arthur Junior – UFRRJ
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,
força da minha inspiração e motivação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por me proporcionar os melhores anos da minha vida na universidade mais bonita da América Latina. O que a rural constrói nada destrói!

À Engenharia Florestal e a todos os “floresteiros”, sejam esses professores ou alunos, que cruzaram meu caminho durante a graduação e de alguma forma me ajudaram a crescer.

À minha Orientadora Evânia Galvão Mendonça, que além de orientadora e professora, foi uma amiga e mãe durante os últimos anos. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, compreensão e carinho. Você é um exemplo para mim e sou muito grata de ter sido sua primeira orientada. Meu muito obrigado por fazer parte desse trabalho e da minha vida.

À banca examinadora, Rogério Luiz da Silva e José Carlos Arthur Junior, pelo tempo dedicado e por todas as contribuições que enriqueceram o meu trabalho.

Aos integrantes dos laboratórios LAPER, LABACVET e REGEFLOR, pelos quais tive a oportunidade de estagiar nessa universidade. Tive sorte de trabalhar ao lado de pessoas tão excepcionais, sempre dispostos a me ajudarem e alegrando os meus dias.

Aos técnicos Carol, Zé, Tião e P.C., por toda a ajuda que vocês me deram, com boa vontade e carinho.

Ao meu pai Alexandre e minha mãe Adriana pelos seus sacrifícios, dedicação, força, ensinamentos, paciência e amor. Vocês me dão força e motivação para continuar no meu caminho e batalhar. Minha eterna gratidão por tudo!

Aos meus irmãos Paula, Bryan, Johann, Michele, Nicole, Alex e Victor, meus sobrinhos Felipe, Lucca e Isabela e minha prima Brenda por todo o companheirismo, alegria, apoio e amor ao longo dos anos.

Ao meu avô Juvenal, Avó Maria Magdalena, e meu tio avô Iwanir, que sempre estiveram presente e me apoiando nessa jornada.

Em especial, à minha tia-avó, Iolanda (*in memoriam*), que, por mais que não esteja mais comigo, sempre estará presente no meu coração e meus pensamentos e sempre será meu maior exemplo. Minhas eternas saudades e gratidão por tudo que você me ensinou e fez por mim.

À minha turma 2010-1 pela companhia nessa jornada e por dividir comigo as incontáveis experiências que a rural nos proporciona. Foram muitas noites sem dormir, seja por causa dos estudos ou por causa das festas. Tive sorte de poder compartilhar essas noites com vocês.

À todas as meninas que dividiram república comigo. Aos integrantes da minha primeira república, Aimée, Vanessa, Aninha, Manu, Nanda, Michele, Mariana, Gabi, Thay, e Jess e integrantes da minha atual república Renata, Thalita, Camilla, Day e Amanda, que me ajudaram a evoluir como pessoa nesses anos na rural e me proporcionaram momentos incríveis e memórias que sempre guardarei com muito carinho. Vou sentir saudades das jantas, doces, conversas, viagens e bobearas compartilhadas. Vocês foram a minha segunda família e transformaram a rural em meu lar longe de casa. Obrigada!

Ao time de basquete feminino e masculino da UFRRJ, que sempre estiveram ao meu lado pra comemorar as vitórias e crescer com as derrotas. Agradeço todos os treinos, campeonatos e risadas ao lado de vocês. Vocês me ensinaram o que é ser parte de um time e o que é dar o seu suor e sangue por algo que ama.

Ao programa Ciências sem Fronteiras e a University of Leeds por ter me proporcionado a oportunidade tão única e enriquecedora e à todos os amigos que fiz durante o programa: a Maria, Megan, Francesco, Esther, Michele, Ryan, Sarah e todos as outras pessoas que tive o prazer de conhecer. Vocês me abriram a novas culturas e possibilidades e me proporcionaram experiências incríveis que sempre lembrarei com muito carinho. Sinto muitas saudades de vocês!

(I would like to thank the Science without Borders program and the University of Leeds for such a unique and enriching opportunity and all the friends I made during my time abroad: Maria, Megan, Francesco, Esther, Michele, Ryan, Sarah and everyone else I had the pleasure to meet. You opened me up to new cultures and possibilities and helped me create the most amazing experiences and memories, which I will always cherish. I miss all of you so much!)

Às minhas amigas Vanessa, Ana Gabariela, Camilla, Jéssica e Nathalie. Obrigada pela compreensão das minhas ausências e por todo o apoio ao longo desses anos. O tempo nos mostra quem são nossos verdadeiros amigos, e tenho sorte de contar vocês como os meus.

À Juh Estrella, que começou como amiga de turma e se tornou uma irmã pra mim. Espero levar sua amizade por muito tempo e compartilhar muitos outros momentos importantes com você.

Ao Felipe Paladino (*in memoriam*), meu melhor amigo que viverá eternamente na minha memória como um símbolo de caráter e bondade. Minhas eternas saudades.

À Anne, Day, Thais, Karina, Marcos, Samira e Carol que me ajudaram com muita boa vontade nesse trabalho e que foram essenciais para a sua realização.

Em especial, ao Tharles, que tem sido meu anjo nesse último ano. Obrigado por ter me aturado nos momentos de mau humor. Obrigada por ter me ajudado a superar os estresses e me acompanhado nas aventuras. Obrigada por todos os momentos de risada, de carinho, de comilanças e de todas as memórias construídas. Obrigada por ter sido a fonte da minha força quando a minha estava esgotada. Obrigado por ser o melhor namorado. Sem você eu não teria conseguido. Te amo muito!

RESUMO

A *Dalbergia nigra* é uma espécie nativa do bioma Mata Atlântica de alto valor econômico. Devida a extração desordenada de sua madeira no passado, essa espécie está na lista das espécies ameaçadas de extinção. Diante desta realidade, estudos e o desenvolvimento de metodologias alternativas são necessários para estabelecer uma estratégia de conservação e propagação para a espécie. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver a micropropagação da *Dalbergia nigra* via organogênese indireta, a partir da desinfestação e germinação *in vitro* das suas sementes, a indução de calogênese a partir de segmentos de epicótilo das plântulas germinadas *in vitro*, e a regeneração de brotos a partir dos calos formados. A princípio, foi necessário o estabelecimento de um protocolo de desinfestação das sementes, onde foram testadas três concentrações de peróxido de hidrogênio (10%, 20% e 30%). Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS e aos 28 dias foram avaliados a porcentagem de germinação e contaminação. Para a indução de calos foram utilizados como explante segmentos de epicótilo das plântulas germinadas *in vitro*, sendo estes excisados e inoculados em meio de cultura MS modificado com a metade da concentração de nitrogênio, suplementado com combinações dos reguladores de crescimento ANA e TDZ e na ausência destes. Aos 45 dias os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de explantes com formação de calo e a porcentagem da área dos explantes coberto por calo. Os calos provenientes deste experimento foram utilizados para a regeneração de brotos. Estes foram inoculados em meio de cultura MS modificado com metade da concentração de nitrogênio, suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA. Aos 45 dias, foi avaliada a porcentagem de calos com formação de gemas e número de brotos formados. Para o experimento de desinfestação, observou-se que em todas as concentrações testadas o peróxido de hidrogênio foi eficiente para a desinfestação de sementes de *D. nigra*. Para a indução de calos, todos os tratamentos foram eficientes, principalmente na concentração de 0,009 μM ANA + 2,5 μM TDZ. Em relação à regeneração de gemas e brotos, concluiu-se que houve alta porcentagem de calos com gemas. Entretanto, a regeneração de brotos a partir das gemas foi baixa. Apesar dos avanços obtidos nesse estudo, outros se fazem necessários para o estabelecimento de um protocolo eficiente para a micropropagação dessa espécie.

Palavras-chave: *Dalbergia nigra*, micropropagação, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Dalbergia nigra is a native species of the Atlantic Forest biome of high economic value. Due to the disorderly extraction of its wood in the past, this species is on the list of species threatened with extinction. Faced with this reality, studies and the development of alternative methodologies are necessary to establish a conservation and propagation strategy for this species. In this way, the objective of this study was to develop the micropropagation of *Dalbergia nigra* via indirect organogenesis, from the *in vitro* disinfection and germination of its seeds, the induction of calogenesis from epicotyl segments of the *in vitro* germinated seedlings, and the regeneration of shoots from the formed calluses. At first, it was necessary to establish a seed disinfection protocol, where three concentrations of hydrogen peroxide were tested (10%, 20% and 30%). After the disinfection, the seeds were inoculated in MS medium and at 28 days the percentage of germination and contamination were evaluated. For callus induction, epicotyl segments of germinated seedlings were excised and inoculated in modified MS culture medium with half of the nitrogen concentration, supplemented with combinations of the growth regulators α -naphthaleneacetic acid (NAA) And thidiazuron (TDZ) and in the absence thereof. At 45 days the explants were evaluated for the percentage of explants with callus formation and the percentage of the explants area covered by callus. The calluses from this experiment were used for the regeneration of shoots. These were inoculated in modified MS culture medium with half of the nitrogen concentration, supplemented with different combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) and α -naphthaleneacetic acid (NAA). At 45 days, the percentage of calli with bud formation and the number of shoots regenerated were evaluated. For the disinfection experiment, it was observed that in all concentrations tested, hydrogen peroxide was efficient for disinfection of seeds of *D. nigra*. For callus induction, all treatments were effective, particularly at a concentration of 0.009 μ M ANA + 2.5 μ M TDZ. In relation to the regeneration of buds and shoots, it was concluded that there was a high percentage of calli with buds. However, the shoot regeneration from the buds was low. Despite the advances obtained in this study, other studies are necessary for the establishment of an efficient protocol for the micropropagation of this species.

Key words: *Dalbergia nigra*, micropropagation, *in vitro* culture.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. A espécie <i>Dalbergia nigra</i> (Vell) Allemão ex Benth.	2
2.2. Cultivo <i>in vitro</i>	4
2.3. Desinfestação e germinação de sementes <i>in vitro</i>	5
2.4. Organogênese.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>Dalbergia nigra</i>	9
3.2. Indução de calos a partir de segmentos de epicótilo de <i>Dalbergia nigra</i>	11
3.3. Regeneração de brotos a partir de segmentos de calos de <i>Dalbergia nigra</i>	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	13
4.1. Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Dalbergia nigra</i>	13
4.2. Indução de calogênese a partir de segmentos de epicótilo de <i>Dalbergia nigra</i>	15
4.3. Regeneração de brotos a partir de segmentos de calos de <i>Dalbergia nigra</i>	18
5. CONCLUSÃO.....	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos utilizados para desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Dalbergia nigra</i>	10
Tabela 2 - Tratamentos utilizados para a indução de calos da espécie <i>Dalbergia nigra</i>	11
Tabela 3 - Tratamentos utilizados para a indução de brotação da espécie <i>Dalbergia nigra</i>	12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inoculação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> , desinfestadas com peróxido de hidrogênio, em meio MS.....	10
Figura 2 - Germinação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> : plântulas de <i>Dalbergia nigra</i> com 28 dias após a inoculação.....	13
Figura 3 - Contaminação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> : Contaminação por bactéria (A); Contaminação por fungo (B).	13
Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio na germinação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> , após 28 dias de cultivo <i>in vitro</i>	14
Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio na contaminação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> , após 28 dias de cultivo <i>in vitro</i>	14
Figura 6 - Formação de calos em segmentos de epicótilo de <i>Dalbergia nigra</i> após 45 dias de inoculação.	15
Figura 7 - Efeito de TDZ e ANA na porcentagem de explantes com formação de calos após 45 dias.	16
Figura 8 - Efeito de TDZ e ANA na área do explante coberto por calo (%) com formação de calos após 45 dias.....	18
Figura 9 - Calos de <i>Dalbergia nigra</i> após 45 dias em meio de regeneração. Gemas de calos provenientes do T2R1 e T2R2 (A); gemas de calos provenientes do T5R1 e T5R2 (B); gemas de calos provenientes T6R1 e T6R2 (C) (escala = 1mm).....	19
Figura 10 - Efeito dos diferentes tratamentos na regeneração de gemas e brotos em calos de <i>Dalbergia nigra</i> após 45 dias.....	20
Figura 11 - Brotações a partir de calos de <i>Dalbergia nigra</i> (escala = 1mm).	20

LISTA DE SIGLAS

2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP - 6-(g, g-dimetilaliminol) purina

AIA - ácido indol-3-acético

AIB - ácido indol-3-butírico

ANA - ácido α -naftalenoacético

BAP - 6-benzilaminopurina

D.B.O - Demanda Bioquímica de Oxigênio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

KIN - kinetina

MS – Murashige e Skoog

Picloram - ácido 4-amino-3,5,5-tricloropicolínico

PVP - polivinilpirrolidona

TDZ - thidiazuron

1. INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica tem como característica alta diversidade biológica e o endemismo de várias espécies vegetais (CEPF, 2001). Devido à ação antrópica que vem sofrendo, a Mata Atlântica é atualmente considerada o bioma mais ameaçado do Brasil, com menos de 8% de sua extensão restante, ocorrendo principalmente em remanescentes isolados (MYERS et al., 2000; CEPF, 2001). Como resultado, diversas espécies da flora e fauna desse bioma encontram-se na lista de espécies ameaçadas de extinção (CEPF, 2001).

Dentre as espécies ameaçadas, destaca-se a leguminosa *Dalbergia nigra*, classificada como vulnerável, conforme a “lista oficial de flora ameaçada de extinção” (MMA, 2008) e pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) das espécies ameaçadas (VARTY, 1988). Isso se deve a intensa exploração de sua madeira, no passado, além da fragmentação do habitat natural e consequente diminuição da diversidade genética da espécie (MARTINELLI; MORAES, 2013).

A inclusão das espécies ameaçadas de extinção em programas de restauração é imprescindível para a preservação dessas. Entretanto, a dificuldade da obtenção de mudas dessas espécies em quantidade suficiente para atender a demanda dos programas é um fator limitante (CARVALHO et al., 2013). Desta forma, a propagação vegetativa é uma alternativa para a produção de mudas de qualidade dessas espécies. Dentre os métodos de reprodução vegetativa, a micropropagação pode constituir uma alternativa adequada em relação aos métodos clássicos de propagação. A micropropagação se refere a uma técnica de cultura de tecidos, que resulta na produção de grande quantidade de indivíduos, geneticamente idênticos por meio de divisões celulares induzidas por hormônios e fitorreguladores (CARVALHO et al., 2006a), podendo ser realizada através da proliferação de gemas axilares, organogênese e embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 2000; CARVALHO et al., 2006a).

No setor florestal, a micropropagação é muito valorizada devido às diversas vantagens atribuídas a ela, como a propagação de genótipos superiores selecionados; possibilidade de produção de mudas durante o ano todo, devido ao controle das condições ambientais durante a propagação; a produção intensiva de mudas, em curto período de tempo e em espaço reduzido; e

a possibilidade de propagação de plantas de difícil reprodução vegetativa por métodos convencionais, como estaquia e miniestaquia (WENDLING; DUTRA, 2010). Porém, essa técnica necessita de muita experimentação para a obtenção de resultados que possam ser reproduzidos. Contudo, uma vez estabelecida, permite o desenvolvimento de protocolos que tem por objetivo tornar a operação prática e rotineira para uma dada espécie (WENDLING et al., 2006).

Destacando-se a necessidade de pesquisas e a rápida difusão dos conhecimentos adquiridos pertinentes à produção de mudas de espécies nativas da Mata Atlântica, esse trabalho objetivou desenvolver a micropropagação da *Dalbergia nigra* via organogênese indireta, a partir da desinfestação e germinação *in vitro* das suas sementes, a indução de calogênese a partir de segmentos de epicótilo das plântulas germinadas *in vitro*, e a regeneração de brotos a partir dos calos formados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Dalbergia nigra* (Vell) Allemão ex Benth.

Dalbergia nigra, popularmente denominada jacarandá-da-bahia, caviúna ou jacarandá-preto, entre outros, é integrante da família Fabaceae, subfamília Papilionoideae. Essa espécie é semicaducifólia, semi-heliófita, hermafrodita e pertence ao grupo sucessional das secundárias tardias (CARVALHO, 2003). Ela é característica da floresta pluvial da encosta atlântica, podendo ser encontrada tanto no interior das matas primárias densas como nas florestas secundárias. Sua ocorrência natural abrange os estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (LORENZI, 2002) sendo encontrada no sul da Bahia e norte do Espírito Santo, em altitudes que variam entre 30 e 1700 m, com a maior zona de ocorrência natural (RÊGO; POSSAMAI, 2003).

Essa espécie ocorre, naturalmente, em solos profundos, de boa drenagem, com baixa fertilidade química, pH superior a 5,2, e, preferencialmente, com baixo teor de alumínio. Ela também apresenta resistência à deficiência hídrica (CARVALHO, 2003) com ocorrência principal nas encostas bem drenadas, mas também podendo ser encontrado em cortes de barrancos (LORENZI, 2002).

O jacarandá-da-bahia é capaz de atingir altura e diâmetro variando de 15 a 25 m e 40 a 80 cm, respectivamente (LORENZI, 2002) podendo alcançar, na fase adulta, até 35 m de altura e 155 cm de DAP. Seu tronco é tortuoso, irregular e a sua copa é larga, achatada e densifoliada. Suas folhas são compostas, alternas e paripinadas com 10–20 folíolos de 0,7 a 2,5 cm de comprimento por 0,4 a 1,0 cm de largura (CARVALHO, 2003).

A época de floração do jacarandá-da-bahia é variável de acordo com o local de ocorrência, sendo de setembro a novembro em Minas Gerais; de outubro a novembro na Bahia; de outubro a maio no Espírito Santo; e de novembro a janeiro em São Paulo. As suas flores são branco-amareladas, perfumadas, com 0,5 a 1,0 cm de comprimento, reunidas em cachos axilares de até 6 cm de comprimento, dando origem a panículas de até 20 cm. A frutificação também é variável, sendo de maio a outubro, no Espírito Santo; de agosto a janeiro, em São Paulo; de setembro a dezembro, em Minas Gerais, e em dezembro, na Bahia (CARVALHO, 2003). Seus frutos são pequenas vagens achatadas e indeiscentes contendo de uma a duas sementes cada (LORENZI, 2002). As sementes de *Dalbergia nigra* possuem comportamento ortodoxo, podendo ser armazenadas por até dois anos a baixa temperatura, com redução em cerca de 50% de sua capacidade germinativa (AGUIAR et al., 2010). A dispersão dos frutos e sementes ocorre por anemocoria e essas não apresentam dormência. No Espírito Santo, foram observados florescimento e frutificação da *Dalbergia nigra* em intervalos de dois a três anos, com a quantidade de sementes produzidas variando a cada ano (CARVALHO, 2003).

A madeira do jacarandá-da-bahia é pesada, com a densidade entre 0,80 a 1,00 g/cm³, a 15% de umidade, muito durável, de alta resistência ao ataque de organismos xilófagos, e de fácil trabalhabilidade, com bom acabamento e alto polimento natural. O seu alburno varia de branco a amarelado e o cerne é geralmente pardo-escuro arroxeadado e com listras pretas (CARVALHO, 2003). Os seus usos incluem a fabricação de móveis, instrumentos musicais e acabamentos internos em construção civil (MARTINELLI; MORAES, 2013). Por ser considerada uma madeira muito decorativa, resistente e de longa durabilidade natural (LORENZI, 2002), é conhecida mundialmente como uma das espécies florestais brasileiras mais valiosas e tem sido objeto de exportação desde os tempos coloniais. Esta espécie também é utilizada para a produção de óleos essenciais, em arborização urbana, em praças, parques e avenidas, sendo também recomendada na recuperação de áreas degradadas (CARVALHO, 2003).

Devido à intensa extração de sua madeira no passado em decorrência do seu alto valor econômico, a *Dalbergia nigra* está na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2008) e é classificada, pela Lista Vermelha das espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN), como vulnerável (VARTY, 1988). Essa espécie atualmente é considerada rara em florestas primárias. Estima-se que pelo menos 30% das populações originais dessa espécie foram dizimadas e que uma redução populacional de 30% pode ser cogitada caso a perda do seu hábitat e a extração ilegal da madeira, principalmente de indivíduos de grande porte remanescentes, não seja contido. A fragmentação do hábitat da *Dalbergia nigra* também é visto como um problema, por comprometer a diversidade genética da espécie (MARTINELLI; MORAES, 2013). Além disso, o jacarandá-da-bahia dificilmente apresenta regeneração natural no seu habitat, devido ao ataque do coelho-do-mato, que consome plântulas dos gêneros *Dalbergia* e *Machaerium*. Este animal é o maior inimigo natural do jacarandá-da-bahia na fase inicial de desenvolvimento, sendo este um dos fatores da raridade da espécie. Ademais, essa espécie é suscetível ao ataque da praga broca-do-tronco (*Psygmatoceus wagneri*) no norte do Espírito Santo e no sul da Bahia e as larvas de *Troezon champion*, no Rio de Janeiro, que se criam nas sementes dessa espécie (CARVALHO, 2003).

2.2. Cultivo *in vitro*

Cultura de tecidos refere-se às técnicas nas quais explantes, como células, tecidos ou órgãos de planta, são cultivados em meio nutritivo, em condições assépticas e controladas (TORRES et al., 2000). Dentre as várias técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação destaca-se como a utilização mais prática e de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; WENDLING; DUTRA, 2010) e tem sido a mais difundida, com aplicações comprovadas em diversas espécies vegetais (XAVIER et al., 2009).

A micropropagação é um método de reprodução vegetativa, onde, por meio de divisões celulares induzidas por hormônios e fitorreguladores, há a produção de grande quantidade de indivíduos, geneticamente idênticos (CARVALHO et al., 2006a). Essa técnica pode ser realizada por meio da proliferação de gemas axilares, organogênese e embriogênese somática

(GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 2000; CARVALHO et al., 2006a; XAVIER et al. 2009).

O sucesso desse procedimento depende da combinação correta dos fatores que o influenciam, como o genótipo da planta, a fonte de explante e as condições de cultivo *in vitro* (ANDRADE, 2002). Essa prática fundamenta-se na totipotencialidade das células vegetais (CARVALHO et al., 2006a; WENDLING et al., 2006), que é definida como a propriedade inerente as células vegetais de manifestar, sob estímulos apropriados, a potencialidade em iniciar um novo indivíduo multicelular (TORRES et al., 2000). De acordo com Murashige (1974), existem três estágios de desenvolvimento no processo de micropropagação: seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; multiplicação dos propágulos; enraizamento e subsequente transplântio das partes aéreas produzidas. Entretanto, esses podem sofrer alterações conforme a peculiaridade de cada espécie.

2.3. Desinfestação e germinação de sementes *in vitro*

No cultivo *in vitro* de plantas, um dos processos primordiais é a desinfestação do material vegetal a ser micropropagado, uma vez que o ambiente de cultivo é extremamente favorável a proliferação de microorganismos. A presença de contaminação bacteriana ou fúngica é um dos maiores desafios na micropropagação podendo inviabilizar a cultura (CARVALHO et al., 2006b; WENDLING et al., 2006). Torres et al. (2000) define a desinfestação como o uso de soluções desinfestantes na eliminação de microrganismos das superfícies de um explante ou semente. Esse processo deve ser conduzido de maneira eficiente no que tange a remoção de contaminantes evitando ao máximo danos ao material vegetal (ILIEV et al., 2010).

As substâncias que possuem o poder de desinfestação são aquelas que controlam a proliferação microbiana, seja pela eliminação ou inibição do crescimento (TORRES et al., 2000). Os agentes desinfestantes mais usuais são o etanol e os compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio e de cálcio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 2000; WENDLING et al., 2006; CID; TEIXEIRA, 2010). Porém, outros produtos podem ser empregados, como o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998; WENDLING et al., 2006). O

método de desinfestação pode ser bastante variável, com modificações na concentração das soluções e na combinação dos princípios ativos desinfestantes, com variação no tempo de exposição do explante. Esses ajustes são realizados de acordo com a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

No sentido de estabelecer uma metodologia para desinfestação de sementes de plantas lenhosas, diversos estudos têm sido desenvolvidos. Couto et al. (2004) testaram diferentes concentrações e tempo de exposição do agente desinfestante hipoclorito de sódio em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*). Mamedes e Silva (2010) também estudaram o efeito de diferentes tempos de exposição ao hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*). Souza et al. (2011) e Nascimento et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na germinação e controle de contaminação em sementes de guabijuzeiro (*Myrcianthes pungens*) e sementes de gurucaia (*Parapiptadenia rígida*), respectivamente.

Martin-Corder e Borges Junior (1999), por sua vez, avaliaram diferentes tempos de autoclavagem e combinações de fungicida benomyl, hipoclorito de sódio e/ou álcool a 70% a fim de estabelecer um método para a desinfestação das sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii*). Já Picolotto et al. (2007) testaram a influência de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura na desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de jabuticabeira (*Myrciarias* pp.). Silva et al. (2011) analisaram o efeito do tratamento químico com fungicidas e hipoclorito de sódio no controle de patógenos em sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*), cássia-do-sultão (*Senna siamea*), jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*), ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*) e ipê-amarelo (*Tabebuia chysotricha*).

O uso do peróxido de hidrogênio como agente desinfestante tem apresentado grande potencial. Porém, os estudos em relação à desinfestação de sementes com esse agente são escassos. Silva e Andrade (2014) avaliaram o efeito do tempo de imersão e dos agentes desinfestantes hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio e peróxido de hidrogênio, na desinfestação de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*). Mello (1996), por sua vez, observou o efeito do hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio na desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*). Malaquias et al.

(2016) testou hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio na desinfestação de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*).

2.4. Organogênese

Organogênese trata-se do surgimento de novos órgãos adventícios em tecidos onde eles não ocorrem naturalmente. Esses órgãos podem surgir de células diferenciadas de um tecido vegetal via organogênese direta ou de células indiferenciadas via organogênese indireta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 2000; WENDLING et al., 2006; XAVIER et al. 2009; LEMOS, 2010). Na organogênese indireta a célula passa por um processo de desdiferenciação, resultando na formação de calos (TORRES et al., 2000). O controle da via de organogênese a ser seguida é condicionado pelo balanço de fitorreguladores na fase de indução (LEMOS, 2010).

O sucesso da organogênese é dependente da competência celular, que em cultura de tecidos vegetais refere-se à resposta das células a estímulos externos como reguladores de crescimento, nutrientes, luz e temperatura, que podem ser responsáveis por iniciar um processo morfológico (TORRES et al., 2000). Por meio desses estímulos, as células se tornam competentes e adquirem a capacidade de se rediferenciar, formando novos tipos de tecidos (LEMOS, 2010).

A organogênese pode resultar em cauligênese adventícia (formação de gemas e brotos adventícios) ou rizogênese (formação de raízes), dependendo dos níveis endógenos de hormônios e exógenos de reguladores de crescimento, em particular das citocininas e das auxinas (LEMOS, 2010). A resposta organogênica é afetada pelo balanço entre auxinas e citocininas no meio de cultura. Quando as proporções de auxina são altas em relação à citocinina, tende-se a indução de raiz, enquanto altas proporções de citocinina levam à formação de brotos. Em meios onde se tem razões balanceadas desses dois reguladores de crescimento, tende a ocorrer à proliferação de calos (TAKAHASHI, 2002). As auxinas mais utilizadas na micropropagação são o ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido α -naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D). Por sua vez, as citocininas mais frequentes, são a kinetina (KIN),

zeatina, 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-(g, g-dimetilaliminol) purina (2iP) (CARVALHO, 1999).

Vários trabalhos vêm sendo realizados utilizando a técnica de micropropagação para culturas agrícolas e medicinais, porém, os estudos em relação à organogênese indireta com espécies arbóreas são poucos. Com o intuito de desenvolver um protocolo eficiente para essas espécies, vários tecidos estão sendo utilizados como fonte de explante. Em estudos desenvolvidos para a indução de calos pré-organogênicos, Golle (2010) obteve a formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata* utilizando os reguladores de crescimento ANA, 2,4-D e BAP. Gobara (2011) avaliou o efeito de ANA, TDZ, BAP e picloram na capacidade de calogênese de segmentos de epicótilos e raízes de mogno (*Swietenia macrophylla*). Brunetta et al. (2006) também utilizaram segmentos de epicótilo de mogno (*S. macrophylla*) com o objetivo de induzir calos organogênicos usando os reguladores BAP e ANA. Nicioli (2006) utilizou picloram e KIN em segmentos nodais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) para indução de calos. Por sua vez, Reis et al. (2007) realizaram um estudo visando a indução de calos a partir de segmentos apicais e intercotiledonares de paricá (*Schizolobium parahyba*) utilizando os reguladores AIB e BAP. Degenhardt-Golbachet et al. (2011) avaliaram a indução *in vitro* de calos com o uso de zeatina, BAP 2,4-D e 2iP em explantes foliares de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Outros autores obtiveram sucesso na regeneração de plantas a partir de calos organogênicos. Em estudos de organogênese indireta para espécies de eucalipto, Hajari et al. (2006) utilizaram os reguladores de crescimento ANA, AIA, BAP e KIN com o objetivo de desenvolver um protocolo de organogênese indireta para explantes caulinares de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla*. Batista (2012) e Carvalho (2015) desenvolveram estudos utilizando os reguladores de crescimento ANA e TDZ com explantes foliares, ápices meristemáticos e ápices caulinares de *E. grandis x E. urophylla*. Fernando et al. (2016) por sua vez, utilizaram 2iP, AIB, ANA, BAP e TDZ em explantes foliares de *Eucalyptus polybractea*. Em estudos de organogênese indireta com outras espécies florestais, Samantaray et al. (1995), obtiveram sucesso na indução de calos e regeneração *in vitro* a partir de explantes foliares de *Trema orientalis* utilizando os reguladores ANA, BAP e KIN. Muthukumar et al. (2016) estabeleceram um protocolo de organogênese indireta a partir de segmentos internodais e

foliares da espécie *Helicteres isora* utilizando os reguladores AIA, ANA, BAP, TDZ e 2iP. Lavanya et al. (2014) também desenvolveram estudos de regeneração *in vitro* com os reguladores AIA, AIB, 2,4-D, BAP, KIN e TDZ em explantes foliares, internodais e peciolares de *Hildegardia populifolia*. Já Quoirin et al. (1998) utilizaram ANA, TDZ e KIN em segmentos de hipocótilo e cotilédones na regeneração *in vitro* de acácia-negra (*Acacia mearnsii*).

São raros os estudos sobre a indução de calos e regeneração *in vitro* da espécie *Dalbergia nigra*. Mello (1996) obteve sucesso na regeneração *in vitro* via organogênese direta a partir de nós cotiledonares, segmentos e ápices caulinares, com o uso dos reguladores de crescimento ANA e BAP. Já Sartor et al. (2014) obtiveram sucesso na indução de calos organogênicos utilizando explantes foliares e radiculares, em meio de cultura suplementado com os fitorreguladores AIA, 2,4-D e BAP. Porém, a regeneração de brotos foi observada em apenas 2 dos 32 tratamentos testados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Recursos Genéticos Florestais (REGFLOR) do Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.1. Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes de *Dalbergia nigra*

As sementes utilizadas nesse experimento foram coletadas de árvores matrizes na cidade de Alegre, Espírito Santo.

O peróxido de hidrogênio foi escolhido para os testes de desinfestação neste trabalho porque em testes preliminares realizados com o agente desinfestante hipoclorito de sódio em sementes de *Dalbergia nigra*, este apresentou uma alta taxa de contaminação em relação ao peróxido de hidrogênio (resultados não mostrados).

A desinfestação foi realizada em câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram submetidas a um pré-tratamento em álcool etílico 70% por um minuto, e, posteriormente, transferidas para uma solução de peróxido de hidrogênio, acrescentado de três gotas de TWEEN® 20 e mantido sob agitação por 5 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em frascos de 250 mL, contendo

40 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 0,3% de sacarose, 0,23% de Phytigel e 0,01% de PVP (Figura 1). O pH do meio foi ajustado a $5,8 \pm 0,1$ e a esterilização realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos a 1,05 atm.



Figura 1 - Inoculação de sementes de *Dalbergia nigra*, desinfestadas com peróxido de hidrogênio, em meio MS.

Para a desinfestação e germinação, foram realizados 3 tratamentos, como descrito na tabela 1. Cada tratamento foi composto por dez repetições (parcelas) contendo cinco sementes.

Tabela 1 - Tratamentos utilizados para desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra*

Tratamento	Concentração de H₂O₂ (% v/v)	Meio de cultura
T1	10	MS
T2	20	MS
T3	30	MS

Após a inoculação das sementes, os frascos foram acondicionados em uma estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O) e mantidos na ausência de luz sob temperatura de 26°C por 28 dias. Com o intuito de renovar os nutrientes do meio, aos 14 dias

após a inoculação, as plântulas foram transferidas para um novo meio de cultura. O experimento foi observado diariamente quanto à contaminação por fungos e/ou bactérias e aos 28 dias após a inoculação, foram avaliados a porcentagem de contaminação e de germinação.

3.2. Indução de calos a partir de segmentos de epicótilo de *Dalbergia nigra*

Para a indução de calos foram utilizados como explante segmentos de epicótilo de plântulas de *D. nigra*, com 28 dias, germinadas *in vitro*. A escolha do explante utilizado neste experimento partiu do pressuposto de que os tecidos jovens, não lignificados, geralmente, estão mais propensos a desdiferenciação celular. Pierik (1990) constatou que a maturidade fisiológica do órgão do qual se retira o explante afeta negativamente o número de divisões celulares e a capacidade de regeneração. Grattapaglia e Machado (1998) observaram que explantes de tecido jovem retirados de plântulas possuem maior capacidade de resposta à aplicação de fitorreguladores.

Para desinfestação e germinação, foi utilizado o melhor tratamento do experimento anterior (peróxido de hidrogênio na concentração de 20%). O experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, onde os explantes foram inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura MS modificado, com a metade da concentração de nitrogênio, acrescido de 3% de sacarose, solidificado com 0,23% de Phytigel e suplementado com auxina e citocinina. O pH foi ajustado a $5,8 \pm 0,1$ e a esterilização realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos a 1,05 atm. Foram testadas combinações dos reguladores de crescimento ANA e TDZ e na ausência destes (tratamento controle), totalizando 6 tratamentos (Tabela 2). Cada tratamento foi composto por 8 repetições (parcelas) com 7 explantes por repetição. Os tratamentos utilizados nesse experimento foram adaptados da metodologia proposta por Batista (2012).

Tabela 2 - Tratamentos utilizados para a indução de calos da espécie *Dalbergia nigra*

Tratamento	ANA (μM)	TDZ (μM)
T1	0,0	0,0
T2	0,009	0,5
T3	0,009	1,0
T4	0,009	1,5
T5	0,009	2,0
T6	0,009	2,5

Após a inoculação, os frascos foram acondicionados em D.B.O, na ausência de luz e em temperatura de 25 °C por um período de 45 dias. Os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura a cada intervalo de 15 dias, para renovar os nutrientes do meio. Ao final dos 45 dias os explantes foram analisados quanto à porcentagem de explantes com calo e área do explante coberto por calo. A área do explante coberto por calo foi estimada a partir da avaliação visual, sendo atribuído os valores de 0%, 25%, 50%, 75% ou 100%.

3.3. Regeneração de brotos a partir de segmentos de calos de *Dalbergia nigra*

Os calos provenientes dos tratamentos T2 (0,5 µM TDZ + 0,009 µM ANA), T5 (2,0 µM TDZ + 0,009 µM ANA), e T6 (2,5 µM TDZ + 0,009 µM ANA), foram utilizados como explantes para esse experimento. Os calos foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio de cultura MS modificado, acrescido de 3% de sacarose e solidificado com 0,23% de Phytigel.

Os tratamentos de regeneração foram realizados com duas combinações de ANA e BAP, sendo esses meios denominados: R1 (0,68 µM ANA + 1,1 µM BAP) e R2 (0,04 µM ANA + 2,46 µM BAP). O pH foi ajustado a $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Para verificar o efeito do meio de indução sobre a regeneração dos explantes, os tratamentos foram conduzidos como descrito na Tabela 3. Foram utilizados 6 tratamentos, compostos por 7 repetições (parcelas) contendo 4 explantes cada. Os meios de regeneração utilizados nesse experimento foram adaptados da metodologia proposta por Batista (2012).

Tabela 3 - Tratamentos utilizados para a indução de brotação da espécie *Dalbergia nigra*

Tratamento	Calo		Regeneração	
	ANA (µM)	TDZ (µM)	BAP (µM)	ANA (µM)
T2R1	0,009	0,5	1,1	0,68
T5R1	0,009	2,0	1,1	0,68
T6R1	0,009	2,5	1,1	0,68
T2R2	0,009	0,5	2,46	0,04
T5R2	0,009	2,0	2,46	0,04
T6R2	0,009	2,5	2,46	0,04

Após a inoculação, os frascos foram acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 °C por um período de 45 dias. Para renovar os nutrientes fornecidos aos explantes, estes foram transferidos para um novo meio de cultura a intervalos de 15 dias. Ao final dos 45 dias, foram analisadas a porcentagem de formação de gemas e o número de brotações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra*

Aos 28 dias após a inoculação, as sementes foram avaliadas quanto à porcentagem de germinação (Figura 2) e porcentagem de contaminação (Figura 3).



Figura 2 - Germinação de sementes de *Dalbergia nigra*: plântulas de *Dalbergia nigra* com 28 dias após a inoculação.

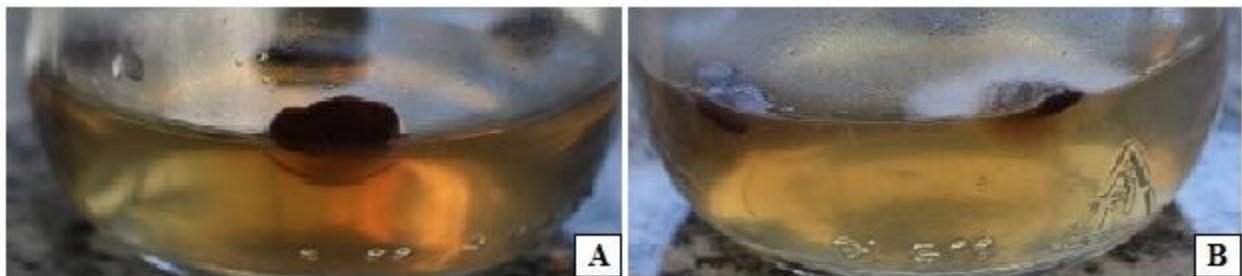


Figura 3 - Contaminação de sementes de *Dalbergia nigra*: Contaminação por bactéria (A); Contaminação por fungo (B).

O tratamento 2 (20% (v/v) de peróxido de hidrogênio) apresentou a maior porcentagem de germinação, com 88%, seguido do tratamento 1, com 72%, e o tratamento 3, com 70% (Figura 4). No que se refere a contaminação, o tratamento 2 também apresentou o melhor resultado, com apenas 6%, seguidos do tratamento 1 (12%) e do tratamento 3 (22%) (Figura 5).

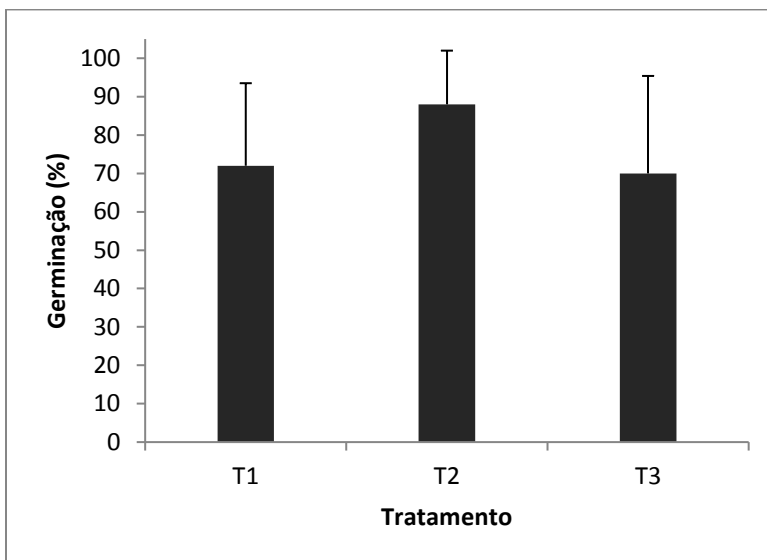


Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio na germinação de sementes de *Dalbergia nigra*, após 28 dias de cultivo *in vitro*.

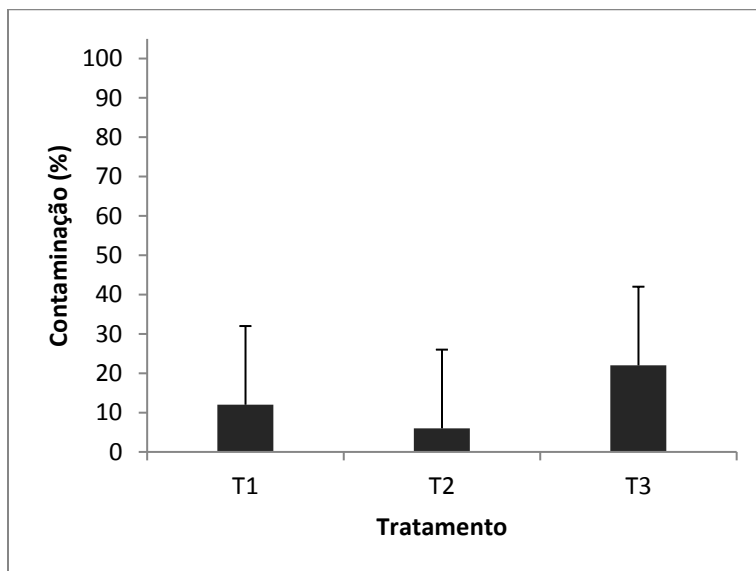


Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio na contaminação de sementes de *Dalbergia nigra*, após 28 dias de cultivo *in vitro*.

Malaquias et al. (2016) também observaram menor taxa de contaminação e maior taxa de germinação utilizando peróxido de hidrogênio em experimentos com sementes de *Dalbergia nigra*. Os autores encontraram taxas de contaminação de 12% e de germinação de 72% usando peróxido de hidrogênio na concentração de 3% por 3 minutos. Porém, Mello (1996) observou uma porcentagem de germinação de 33% em sementes de *Dalbergia nigra* quando utilizou uma solução de peróxido de hidrogênio 40% (v/v), inferindo que concentrações elevadas podem afetar a germinabilidade das sementes de dessa espécie.

Guedes et al. (2011) avaliaram a germinação *ex vitro* de sementes de *Dalbergia nigra* em diferentes substratos a 25 °C e encontraram valores entre 70 e 86%. Esses valores confirmam os encontrados nesse experimento. Portanto, é possível inferir que o uso do peróxido de hidrogênio não teve efeito nocivo na germinabilidade das sementes de *D. nigra*.

4.2. Indução de calogênese a partir de segmentos de epicótilo de *Dalbergia nigra*

Aos 45 dias após a inoculação, os explantes foram avaliados quanto a porcentagem de explantes com formação de calo e a área do explante coberto por calo. Observou-se a formação de calos em todos os tratamentos testados, sendo possível a visualização a partir da segunda semana de inoculação, com a formação iniciando pela borda do explante, onde foi realizada a incisão. Com relação a textura, 100% dos calos formados apresentaram textura compacta, com coloração branco-amarelada (Figura 6).



Figura 6 - Formação de calos em segmentos de epicótilo de *Dalbergia nigra* após 45 dias de inoculação.

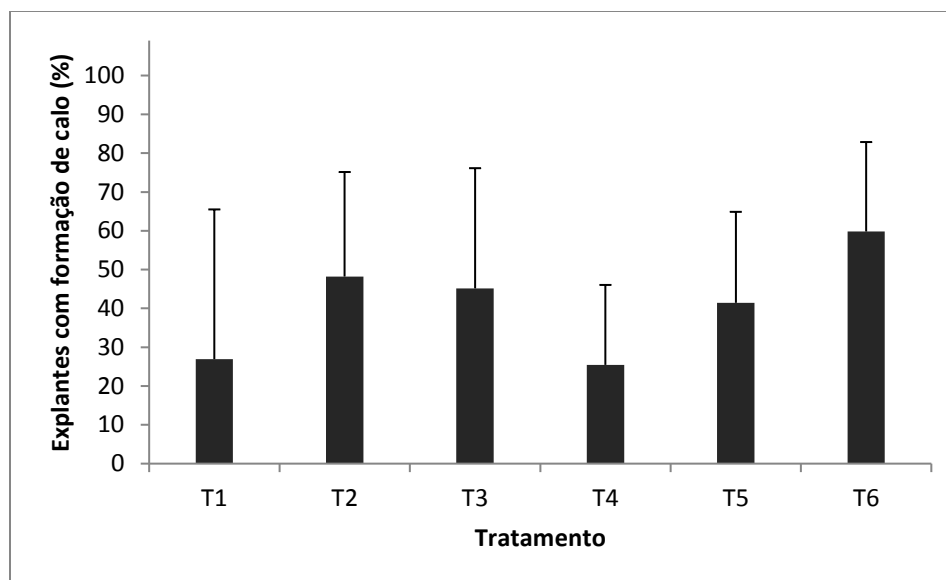


Figura 7 - Efeito de TDZ e ANA na porcentagem de explantes com formação de calos após 45 dias.

No que diz respeito à porcentagem de explantes com formação de calos, o T6 apresentou o melhor resultado, com 59,82%. Por sua vez, o tratamento controle e T4 apresentaram os piores resultados, com 26,93% e 25,45%, respectivamente (Figura 7). Outros autores também observaram uma menor porcentagem de explantes com formação de calos para o tratamento sem reguladores de crescimento (QUORIN et al., 1998; BRUNETTA et al., 2006; REIS et al., 2007; GOBARA, 2011; BATISTA, 2012). Isso pode ser atribuído à presença endógena de hormônios no tecido vegetal, que pode resultar em um processo morfogênico sem a necessidade de influencia exógena de reguladores de crescimento. Porém, na maioria dos casos, os reguladores de crescimento exercem papel fundamental na iniciação e no controle da resposta morfogênica *in vitro* (AMIRATO, 1986).

Todavia, notou-se grande variabilidade na calogênese nos explantes em cada repetição, com a formação de calos em diferentes intensidades, bem como a ausência de calos (Figura 4). Isso pode estar relacionado com a complexa interação dos fatores envolvidos na morfogênese, que podem gerar resultados diferentes no desenvolvimento de plantas pertencentes ao mesmo gênero, espécie e genótipo. A influência do genótipo e a competência celular também são fatores determinantes. Além disso, existe variabilidade genética entre plântulas germinadas *in vitro* e

diferenças fisiológicas entre os tecidos de uma plântula (GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998), estas diferenças marcantes influenciam a regenerabilidade durante o cultivo *in vitro* (AMIRATO, 1986).

No presente experimento os segmentos de epicótilo de plântulas de *Dalbergia nigra* germinadas *in vitro* proporcionaram porcentagens de explantes com formação de calos menores que os encontrados em outros estudos com explantes juvenis. Gobara (2011) utilizou segmentos de epicótilo de plântulas de *Swietenia macrophylla* germinadas *in vitro* em meio MS suplementado com ANA e TDZ. O autor observou a formação de calos em mais de 80% dos explantes por tratamento. No tratamento com 0,1 μM ANA e 1,0 μM TDZ a porcentagem de explantes com formação de calos chegou a 91%. Reis et al. (2007), encontraram altas taxas para a formação de calos utilizando os reguladores de crescimento AIB e BAP em segmentos intercotiledonares e apicais de plântulas de *Schizolobium parahyba* germinadas *in vitro*. No seu estudo, os explantes intercotiledonares apresentaram 100% de explantes com formação de calos, enquanto os segmentos apicais variaram de 67% a 92%. Samantaray et al. (1995) também notaram uma porcentagem de explantes com formação de calos acima de 80% em segmentos foliares de plântulas de *Trema orientalis* inoculados em meio suplementado com 2,22 μM BAP e 13 e 42 μM ANA. Batista (2012) observou porcentagens de calogênese superiores a 80% em ápices meristemáticos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* com o uso de ANA e TDZ. No entanto, observou-se uma maior porcentagem de formação de calos com 0,009 μM ANA x 1,5 μM TDZ, resultados que diferem dos encontrados no presente experimento, onde o tratamento com as mesmas concentrações (T4) apresentou a menor porcentagem de explantes com calos (25,45%).

Sartor et al. (2014) estudaram a indução de organogênese indireta em explantes foliares e radiculares de *Dalbergia nigra* germinadas *in vitro* em meio de cultura MS utilizando os reguladores de crescimento, BAP, AIA e 2,4-D. Ao final de 12 semanas, tanto AIA quanto 2,4-D em combinação com BAP apresentaram indução de calos em explantes foliares e radiculares. Os autores observaram que 10 μM AIA em combinação com 10 μM BAP apresentou o melhor resultado, com 100% de formação de calos em explantes foliares. Porém, após 4 semanas não foi registrado formação calogênica para segmentos foliares e baixa formação calogênica em segmentos radiculares. No presente estudo a formação de calos foi avaliada após 6 semanas do

início do experimento. Portanto, é possível que um maior tempo de avaliação possa influenciar a porcentagem de formação de calos.

Em relação à variável área do explante coberto por calo, o T6 também apresentou resultado superior (76,79%). Semelhante ao encontrado para a variável porcentagem do explante coberto por calo, o T1 e T4 apresentaram os piores resultados com 38,10% e 46,43%, respectivamente (Figura 8). Reis et al. (2007) apresentaram resultados similares, com a menor porcentagem de área coberto por calo encontrado no tratamento controle. Ele também encontrou uma porcentagem de área coberto por calo variando entre 70% e 80% em segmentos apicais. Já para segmentos intercotiledonares, as porcentagens foram mais altas, variando entre 95% e 100%.

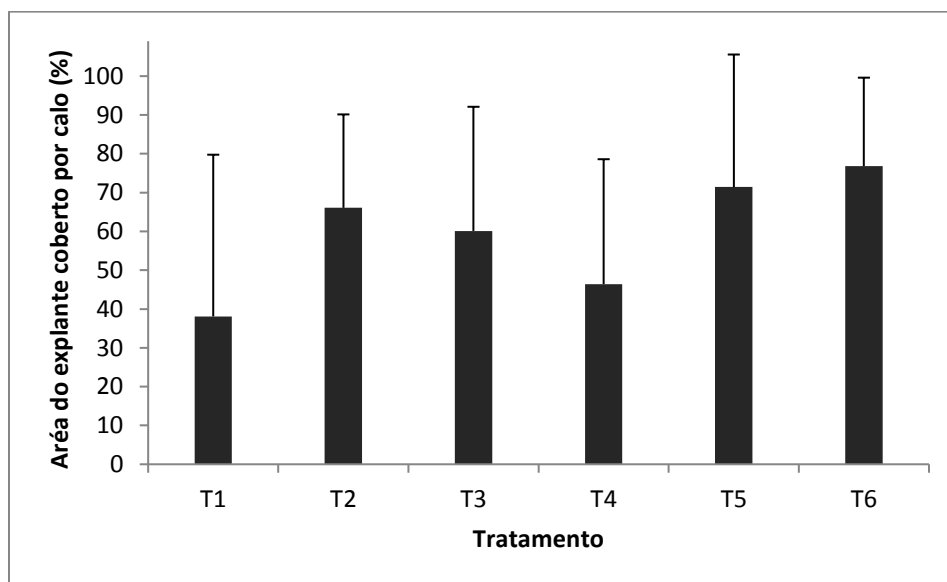


Figura 8 - Efeito de TDZ e ANA na área do explante coberto por calo (%) com formação de calos após 45 dias.

4.3. Regeneração de brotos a partir de segmentos de calos de *Dalbergia nigra*

Aos 45 dias após a inoculação, os calos de *Dalbergia nigra* foram avaliados quanto à porcentagem de formação de gemas e o número de brotos formados. Observou-se a formação de gemas em todos os tratamentos (Figura 9).

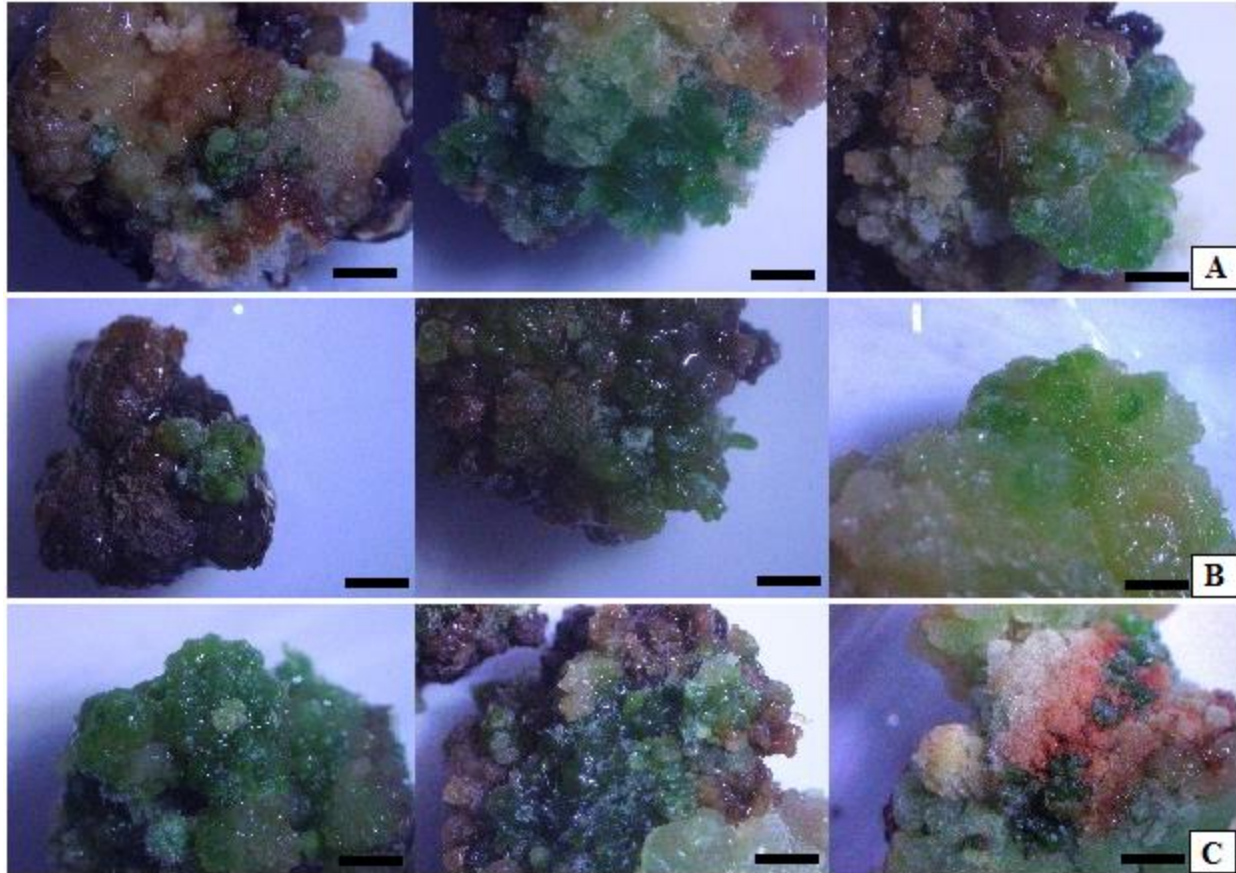


Figura 9 - Calos de *Dalbergia nigra* após 45 dias em meio de regeneração. Gemas de calos provenientes do T2R1 e T2R2 (A); gemas de calos provenientes do T5R1 e T5R2 (B); gemas de calos provenientes T6R1 e T6R2 (C) (escala = 1mm).

Os tratamentos T6R1 e T6R2 apresentaram maior porcentagem de calos com formação de gemas, com 78,57% em ambos. Os tratamentos T2R1 e T2R2 também proporcionaram formação de gemas com 60,71% e 64,29%, respectivamente. As menores respostas foram observadas nos tratamentos T5R1 (46,43%) e T5R2 (42,86%) (Figura 10). Desta forma, pode-se inferir que o meio de regeneração usado não interferiu na porcentagem de calos com formação de gemas. Esses resultados corroboram com os encontrados por Batista (2012) que concluiu que os meios para a regeneração suplementados com 0,68 μM ANA x 1,1 μM BAP e 0,04 μM ANA e 2,46 μM BAP não diferiram entre si. Entretanto, notou-se que a procedência dos calos pode ter influenciado na porcentagem de calos com formação de gemas. Samantaray et al. (1995) também observam a formação de gemas em calos de *Trema orientalis* antecedendo a formação de brotos.

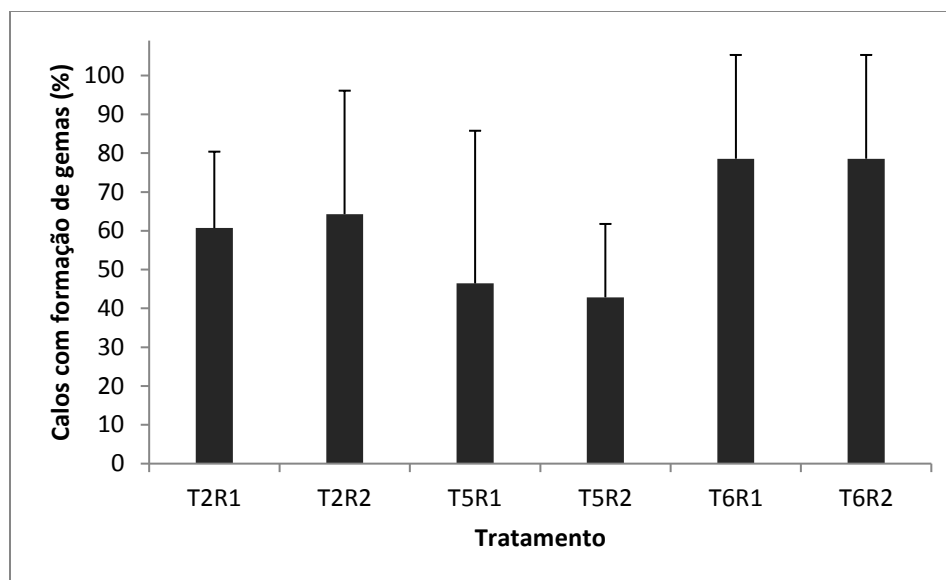


Figura 10 - Efeito dos diferentes tratamentos na regeneração de gemas e brotos em calos de *Dalbergia nigra* após 45 dias.

Apesar da alta porcentagem de formação de gemas em geral, a regeneração de brotos foi baixa (Figura 11). Os tratamentos T2R1 e T2R2 apresentaram maior regeneração de brotos (4 e 7 brotos). Foi observado apenas 1 broto a partir de calos do T6R2. Já os tratamentos T5R1, T5R2 e T6R1 não apresentaram regeneração de brotos (Figura 12).

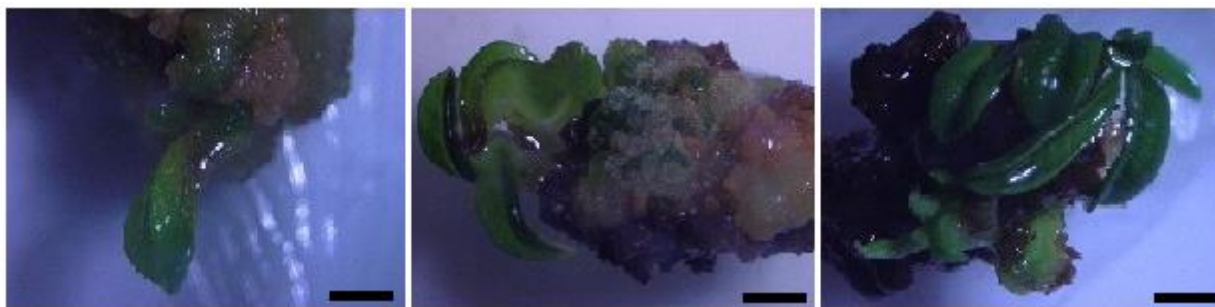


Figura 11 - Brotações a partir de calos de *Dalbergia nigra* (escala = 1mm).

Foi possível observar que o tratamento com calos provenientes da menor concentração de TDZ produziu maior número de brotos. Segundo Santos (1998) apud Brunetta et al. (2006), elevadas concentrações de citocinina com níveis endógenos de auxina do explante, podem levar

à formação de calos provocando certa inibição no surgimento dos brotos. Esses resultados concordam com Batista (2012) que observou um decréscimo no número de brotações com o aumento da concentração de TDZ utilizado na indução de calos em explantes apicais de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. A autora observou que o tratamento com a composição 0,009 μM ANA + 0,5 μM TDZ proporcionou maior regeneração, com 72,02% de presença de plantas.

Corroborando com os resultados encontrados nesse estudo, Quorin et al. (1998) observaram baixa regeneração de brotos a partir de calos de segmentos caulinares de *Acacia mearnsii* usando os reguladores ANA e TDZ, com apenas um tratamento apresentando brotos (5,37 μM ANA + 0,45 μM TDZ). Sartor et al. (2014) também observou baixa porcentagem de regeneração de brotos para calos de explantes foliares e radiculares de *D. nigra*. Eles observaram a regeneração em apenas um tratamento para ambos os explantes (1 μM ANA + 10 μM BAP).

Samantaray et al. (1995) observaram porcentagens de regeneração com alta variação (42% a 83%) em calos provenientes de explantes foliares de plântulas de *Trema orientalis* quando inoculados em meio com BAP e ANA, com ou sem a adição de KIN. Já Hajari et al. (2006) observaram taxas de regeneração variando de 35% a 40% com o uso dos reguladores AIA e BAP.

5. CONCLUSÃO

As concentrações utilizadas de peróxido de hidrogênio foram eficientes para a desinfestação de sementes *Dalbergia nigra*.

O regulador de crescimento TDZ combinado com ANA proporcionou a indução de calos em epicótilo de *D. nigra*.

As concentrações de TDZ no meio de cultura influenciaram na porcentagem dos calos com formação de gemas.

Os meios de regeneração não interferiram na porcentagem de calos com formação de gemas.

Houve baixa conversão das gemas em brotos, apesar disso foi possível a regeneração de brotos a partir de calos de *D. nigra*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como observado nesse trabalho, foi obtido um avanço no estudo de organogênese indireta para a espécie *Dalbergia nigra*, uma vez que os meios de cultura utilizados para indução de calos e regeneração de plantas foram eficientes em proporcionar a formação de gemas. Apesar disso, a conversão de gemas em plântulas foi baixa. Desta forma, são necessários mais estudos a fim de otimizar esse processo e produzir um protocolo eficiente para micropropagação da espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, F. F. A.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; LUZ, P. B.; SANTOS JÚNIOR, N. A. Germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (fabaceae-papilionoideae) no armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1624-1629, 2010.

AMIRATO, P.V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: BHOJWANI, S.S. (Ed.) **Plant tissue culture and its agricultural applications**. Cambridge: University press, 1986. p. 23 - 45.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2002. 16p. (Documentos, 58)

BATISTA, T. R. **Organogênese e Embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Calogênese in vitro em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese Somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35p. (Documentos, 152). a

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores Inerentes à Micropropagação**. Campina Grande: Embrapa algodão. 2006. 28p (Documentos, 148). b

CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1999. 39p. (Documentos, 64).

CARVALHO, L. S. O. **Influências do TDZ e de meios de cultivo na organogênese indireta de um híbrido comercial *urograndis***. 2015. 66f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

CARVALHO, M. O.; CUNHA, A. C. M. C. M.; RIBEIRO, F. C.; ATAÍDE, G. M. Propagação clonal de *Dalbergia nigra* por miniestaquia. In: IV CONGRESSO NORDESTINO DE ENGENHARIA FLORESTAL – III SEMANA DE ENGENHARIA FLORESTAL DA BAHIA. **Anais eletrônicos...** Vitória da Conquista: UESB. 2013. Disponível em: <http://www.uesb.br/eventos/seeflor/publicacoes/2013/1066_PDFsam_Anais_IV_CONEFLOI_II_SEEFLOI.pdf> Acesso em: 05 Mai. 2017.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v.1, 2003.1039p.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa, 2010. p. 25-30.

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). **Árvore**, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

CEPF - CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND. **Perfil do ecossistema Mata Atlântica: Hotspot de Biodiversidade - Brasil**. Arlington: VA-USA., 2001. 29p.

DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; STACHEVSKI, T. W.; FRANCISCON, L.; BUSS, S.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Calogênese *in vitro* a partir de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) mantidas em casa de vegetação. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LAYERBA MATE. **Anais...** Posadas: Instituto Nacional de La Yerba Mate, 2011. p. 61-66.

FERNANDO, S. C.; GOODGER, J. Q. D.; GUTIERREZ, S. S.; JOHNSON, A. A. T.; WOODROW, I. E. Plant regeneration through indirect organogenesis and genetic transformation of *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 73–78, 2016.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000**. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo, 2002. 45p.

GOBARA, B. N. K. **Calogênese a partir de segmentos de epicótilos e raízes de mogno (*Swieteniamacrophylla king*)**. 2011. 34f. Monografia (graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de Eugenia involucratad.** 2010. 159f. Tese (doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, RS. 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. p. 99-170.

HAJARI, E.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. J.; MCALISTER, B. Plant regeneration from induced callus of improved Eucalyptus clones. **South African Journal of Botany**, v.72, p. 195 – 201, 2006.

ILIEV, I.; GAJDOŠOVÁ, A.; LIBIAKOVÁ, G.; JAIN, S. M. Plant Micropropagation. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods.** Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2010. p. 1-23.

LAVANYA, A. R.; MUTHUKRISHNAN, S.; MUTHUKUMAR, M.; BENJAMIN, J. H. F.; KUMAR, T. S.; KUMARESAN, V.; RAO, M.V. Indirect organogenesis from various explants of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl. - A threatened tree species from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.12, p. 95-101, 2014.

LE MOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L.P. B. **Cultivo in vitro de plantas.** Brasília: Embrapa, 2010. p. 113-128.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1. 2002. 368p.

MALAQUIAS, J. O. S.; MANTOVANI, A. T.; FRANCA, T. C. C.; MARTINS, G. S.; SANTOS, R. C.; CORRÊA, M. S.; WERNER, E. T. Germinação in vitro de *Dalbergia nigra* Vell. Fr. All. Ex benth. In: XX INIC, XVI EPG, X INIC JR. E VI INID. **Anais eletrônicos...** São José dos Campos: UNIVAP, 2016. Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2016/anais/arquivos/RE_1102_1061_01.pdf> Acesso em: 27 Abr. 2017.

MAMEDES, T. C.; SILVA S. A. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de ipê roxo. In: VIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E V JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO. **Anais eletrônicos...** Anápolis: UEG, 2010. Disponível em: <http://www.prp2.ueg.br/sic2010/apresentacao/trabalhos/pdf/agrarias/seminario/desinfestacao_germinacao_ipe.pdf> Acesso em: 27 Abr. 2017.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil.** Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson, 2013. 1100 p.

MARTINS-CORDER, M. P.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

MELLO, L. N. C. **Micropropagação de Dalbergianigra (Fr. Aliem) a partir de sementes germinadas "in vitro"**. 1996. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

MMA- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Instrução normativa nº 6, de 23 de Setembro. 2008.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual review of plant physiology**, v. 25, n. 1, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, n.1, p. 437-496, 1962.

MUTHUKUMAR, M.; KUMAR, T. S., RAO, M. V. Organogenesis and evaluation of genetic homogeneity through SCoT and ISSR markers in *Helicteres isora* L., a medicinally important tree. **South African Journal of Botany**, v. 106, p. 204-210, 2016.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenan). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 141-143, 2007.

NICLIOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville] – Fabaceae**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; CARLOS FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.19-23, 2007.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi, 1990. 326p.

QUOIRIN, M.; BITTENCOURT, J. M.; ZANETTE, F.; OLIVEIRA, D. E. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured in vitro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p. 101-105, 1998.

RÊGO, M.; POSSAMAI, E. **Jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* Vellozo) Leguminosae - Papilionoidae**: produção de mudas. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 3 p. (Comunicado técnico, 106)

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Indução da calogênese em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) através da adição de AIB e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 501-503, 2007.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R.; DAS, P. An in vitro study on organogenesis in *Trema orientalis* (Blume) Linn. **Plant Science**, v.105, p. 87-94,1995.

SANTOS, M.R.A. **Germinação, calogênese e caracterização e saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**.1998. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Morfogênese in vitro em explantes foliares e radiculares de jacarandá-da-bahia. **Agrotecnologia**, v. 5, n. 2, p. 82 – 93, 2014.

SILVA, L. G.; COSMI, F. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; SOUZA, A. F.; MORAES, W. B. Efeito do tratamento químico na sanidade de sementes de espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 3, p. 473-478, 2011.

SILVA, R. F.; ANDRADE, B. B. Técnicas de desinfestação de sementes de macaúba (*acrocomia aculeata*) para cultivo “in vitro”. In: 7º COMEIA - CONGRESSO MINEIRO DE INOVAÇÕES AGROPECUÁRIAS. **Anais eletrônicos...** Patos de Minas: Centro Universitário de Patos de Minas. 2014. Disponível em: <<http://comeia.unipam.edu.br/documents/430450/0/T%C3%89CNICAS+DE+DESINFESTA%C3%87%C3%83O+DE+SEMENTES+DE+MACA%C3%9ABA+%28Acrocomia+aculeata%29%20PARA+CULTIVO+%E2%80%9CIN+VITRO%E2%80%9D.pdf/3915c48d-d920-4614-9da9-06ec1acb32f2>> Acesso em: 27 Abr. 2017.

SOUZA, L. S.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011.

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 137f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

VARTY, N. *Dalbergia nigra*. (errata version published in 2016) The IUCN Red List of Threatened Species 1998. 1998. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/32985/0>>. Acesso em: 31 de Jan. 2017.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de Mudanças de Eucalipto**. Colombo: Embrapa florestas. 2010. 184p

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de Mudanças de Espécies Lenhosas**. Colombo: Embrapa florestas. 2006. 55p. (Documentos, 130)

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura conal: princípios e técnicas**. 2 ed. Viçosa, MG. UFV, 2009. 272p.