**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação,
regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando
resistência a *Hyblaea puera***

Evandro Vagner Tambarussi

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas**

**Piracicaba
2009**

Evandro Vagner Tambarussi
Engenheiro Florestal

Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera*

Orientadora:
Profa. Dra. **HELAINÉ CARRER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Tambarussi, Evandro Vagner

Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera* / Evandro Vagner Tambarussi. - - Piracicaba, 2009.
122 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Lagartas 4. Micropropagação vegetal
5. Organogênese vegetal 6. Plantas transgênicas 7. Reguladores vegetais 8. Resistência genética
vegetal 9. Teca - Regeneração - Técnicas in vitro I. Título

CDD 634.97338
T154d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Falar dos meus pais é uma tarefa fácil. Inicialmente porque eles são os melhores pais do mundo. Faltar-me-iam palavras e adjetivos para descrevê-los e agradecê-los. Entretanto, nesse espaço quero deixar eternizado o meu incondicional amor a essas duas pessoas que acreditam e se dedicam a mim.

Só nós três sabemos o quanto foi difícil dar esses passos que hoje me trazem a esta dissertação. Porém faria tudo de novo, apenas para ter o prazer do sorriso lindo, calmo e eficaz de minha mãe **Adelaide** e a força avassaladora de meu pai **Altair**.

À minha linda mãe **Adelaide**, guerreira, humilde e pura e ao meu pai **Altair**, “gigante”, humilde e íntegro...

Dedico

Às minhas irmãs, Elaine e Rosana,
Sobrinhos, Welton, Leandro, Aislan, Amanda e Júlia,
Cunhados, Zuliuro e João,
Tias, Maria e “Tica”...

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Nesses últimos anos conheci e aprendi a conviver com muitas pessoas, essas pessoas supriram, de certa forma, os bons momentos que deixei de passar com minha família e por isso são realmente muito especiais. Grande parte de mim está presente neste trabalho e é com grande alegria e responsabilidade que devo agradecer a todos...

A DEUS, por tudo!

“Eu sou o Alfa e o Ômega, o princípio e o Último, o começo e o Fim” Apocalipse, 22:13.

A Professora Dra. Helaine Carrer, pelo exemplo de trabalho e dedicação à Universidade, pela confiança a mim atribuída nesse período em que convivemos e pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por acreditar em nosso projeto, financiando e concedendo a bolsa de estudos.

A Empresa Proteca Biotecnologia LTDA, na pessoa do Biólogo Fernando S. Torres pelo auxílio financeiro e pelas sementes cedidas.

A técnica de laboratório MSc. Valentina de Fátima de Martin, pelo apoio técnico no dia a dia do laboratório.

Novamente à Fátima, pelo carinho e pelas filosóficas conversas ao caminho do “Rucas”. Conversas sobre a vida, sobre a morte e que delas nada sabemos...

Ao Dr. Ênio, pela paciência ao ensinar e pelos ensinamentos dos processos morfogénéticos *in vitro*.

Ao Marcelo Lattarulo Campos (Kokozão), um irmão que ganhei e que mesmo vivendo tão longe continua em meu coração.

Ao Dr. Marcelo Rogalski, pelos ensinamentos em cultura de tecidos, pelas chuletas no “Apê”, pelas risadas e ótimas conversas no Butiquim.

Ao Prof. Dr. Edson Seizo Mori, meu eterno mestre e uma pessoa a qual guardo grande consideração e carinho.

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura, pelos estímulos e produtivas conversas. Um profissional que realmente guardo grande admiração.

Ao Prof. Dr. Fábio T. S. Nogueira, pelos ensinamentos, estímulos e correções do artigo submetido.

A minha grande amiga Joice, por ser tão linda e estar sempre comigo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge, Coordenador do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo empenho e estímulo aos alunos.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas. Especialmente ao Prof. Dr. Lázaro, Prof. Dr. Paulo de Castro, Prof. Dr. Murilo de Melo, Prof. Dr. Marcílio de Almeida e Profa. Dra. Helaine Carrer.

Aos meus amigos Alexandre e Fred, pelos oito anos de convívio na República. Realmente obrigado!!!

Aos amigos do laboratório: Danila, Joice, Keini, Eduardo, Simone, Andrés, Geraldo, Amaral, Fred, Frederico “Pega bola”, Amanda, Bianca, Roberto, Daniel, Rafael, Felipe, Davis, Felipe Gasparotto, Karina, Carlos, Paulo, Carol, Tati, Aline, Marrrrtha.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pelas sugestões e auxílio nas análises anatômicas e a Técnica Cássia Regina Fernandes Figueiredo, pelos excelentes cortes anatômicos e a total disposição em ajudar.

A Profa. Dra. Laudenir Maria Prioli, pelo apoio, entusiasmo e ensinamentos.

A Profa Dra. Gislei Cristina Gonçalves (PUC-Campinas), pela amizade e oportunidades.

Ao Eng. Ftal MSc. Gilvano Brondani, pela disponibilidade em ajudar nas análises estatísticas.

Aos meus estagiários Lucas (Suruba) e Renato (Xamex), os quais, imprescindíveis na condução dos experimentos.

Aos valorosos e verdadeiros amigos da ESALQ: Magda, Anielca, Cris, Ju e Giovane.

A Solizéte, secretária do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo apóio, orientação, conversas, desabafos, risadas, bolos e cafés em sua companhia. Te adoro Sô!

Aos integrantes da 1ª Oficina de Integração e Vivências em Psicologia (DVATCOM/ CCLQ), na pessoa da Psicóloga Paula. Por todo o compartilhamento e vivência durante o 2º semestre de 2009.

A Silvia Maria Zinsly (Biblioteca ESALQ/USP) pela meticulosa revisão da Dissertação.

Um agradecimento especial a todos os funcionários da ESALQ que talvez nunca venham a ler se quer uma frase dessa Dissertação, mas que sempre deixaram os nossos dias mais fáceis e agradáveis... A vocês o meu honesto muito obrigado!

Muito obrigado a todos!

"As flores tem o perfume que a terra lhes dá sem ser perfumada. Assim, também nós devemos dar a nossos atos aquilo que não trazemos em nós, mas de que somos realmente capazes, e que não morrerá com a nossa morte."

(Campos de Carvalho - A lua vem da Ásia)

"Eu escolhi esta vida. Eu sei o que estou fazendo. E a qualquer momento eu poderia parar... Hoje, no entanto, não é o dia. E Amanhã também não será".

(Stan Lee)

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Descrição e ocorrência natural de teca.....	21
2.2 Cultivo de teca no Brasil e no mundo	24
2.3 Lagarta desfolhadora da teca (<i>Hyblaea puera Cramer, 1777</i>)	26
2.4 Controle biológico em plantações florestais	28
2.5 Perspectivas na transformação genética com genes <i>cry</i>	29
2.6 Cultura de tecidos de teca	31
2.7 Efeito de antibióticos repressores de <i>A. tumefaciens</i> na regeneração de teca.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material vegetal e condições de cultura <i>in vitro</i>	35
3.2 Desenvolvimento experimental	35
3.3 Análise estatística	36
3.4 Desinfestação e germinação das sementes de teca	36
3.5 Organogênese direta (micropropagação) a partir de gemas laterais e diferentes concentrações de macro e micronutrientes	37
3.6 Organogênese indireta	38
3.6.1 Experimento 1: Efeito de BAP e ANA	38
3.6.2 Experimento 2- Influência do pré tratamento com BAP e TDZ na indução da competência organogenética de diferentes explantes.....	39
3.6.3 Experimento 3- Efeito de BAP, AIB e GA ₃	39
3.7 Efeito de diferentes fontes de carbono.....	41

3.8	Análise histológica	41
3.9	Efeito de antibióticos para seleção e obtenção de plantas transgênicas	42
3.9.1	Higromicina	42
3.9.2	Timentin, Cefotaxima e Carbenicilina.....	42
3.10	Enraizamento de teca <i>in vitro</i> e aclimatização	43
3.11	Transformação genética de teca via <i>A. tumefaciens</i> e por bombardeamento de micropartículas	43
3.12	Bioatividade do <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Berliner, 1915) em ínstaes jovens de <i>Hyblaea puer</i> Cramer, 1777 (Lepidoptera: Hyblaeidae).....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Desinfestação e germinação das sementes de teca.....	47
4.2	Organogênese direta (micropropagação) a partir de gemas laterais e diferentes concentrações de macro e micronutrientes.....	49
4.3	Organogênese indireta.....	53
4.3.1	Experimento 1: Efeito de BAP e ANA.....	53
4.3.2	Experimento 2- Influência do pré tratamento com BAP e TDZ na indução da competência organogenética de diferentes explantes	56
4.3.3	Experimento 3- Efeito de BAP, AIB e GA ₃	59
4.4	Efeito de diferentes fontes de carbono	72
4.5	Análise histológica	74
4.6	Efeito de antibióticos para seleção e obtenção de plantas transgênicas	77
4.6.1	Higromicina	77
4.6.2	Timentin, Cefotaxima e Carbenicilina.....	80
4.7	Enraizamento de teca <i>in vitro</i> e aclimação	84
4.8	Transformações genética de teca via <i>A. tumefaciens</i> e bombardeamento de micropartículas	88

4.9 Bioatividade do <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Berliner, 1915) em ínstaes jovens de <i>Hyblaea puera</i> Cramer, 1777 (Lepidoptera: Hyblaeidae)	89
5 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	111

RESUMO

Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera*

A transformação genética possibilita a introdução de genes de interesse nos genomas, podendo assim ser empregada na tentativa de melhorar características agronômicas e florestais. No entanto, para a obtenção de plantas transgênicas são necessários protocolos eficientes de regeneração de plantas *in vitro*. Em teca, dados sobre cultura de tecidos são escassos, havendo a necessidade de determinar condições ótimas para a mesma. Com isso, o trabalho teve por objetivos estudar a organogênese *in vitro* de teca visando desenvolver um método de regeneração eficiente, avaliar condições para o processo de transformação e testar a susceptibilidade da lagarta *Hyblaea puera* a toxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis*. Foram avaliadas a influência de TDZ e BAP na indução da competência organogenética em hipocótilos, nó cotiledonar e cotilédones de teca. Os biorreguladores AIB, BAP, NAA e GA₃ foram utilizados na regeneração de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar, raiz, epicótilo e cotilédone. Antibióticos supressores de *Agrobacterium tumefaciens* e a higromicina (seleção de células transgênicas), foram também avaliados. Finalmente, testes com o inseticida biológico DipelTM e esporos de *B. thuringiensis* crescidos em laboratório foram realizados com as lagartas de *Hyblaea puera*. Na aquisição de competência organogenética o TDZ proporcionou um aumento de 46% na regeneração e o BAP 26% quando comparados ao controle. Para a organogênese *in vitro* foi avaliado um máximo de 70% de regeneração em nó cotiledonares em meio MS adicionado de 1 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃. Entretanto, em outras concentrações dos meios de regeneração hipocótilos, raiz, cotilédones e epicótilos tiveram máximas frequências de regeneração em torno de 60%, 60%, 30% e 10%, respectivamente. Os antibióticos supressores da *Agrobacterium tumefaciens* tiveram efeitos diferentes para cada explante. Timentin e cefotaxima na concentração de 300 mg.L⁻¹ aumentaram o número de brotos em hipocótilos e nó cotiledonar em 1,6 e 2,0 vezes, respectivamente. Em cotilédone esses antibióticos tiveram efeitos negativos no número de brotos. Carbenicilina em todas as doses influenciou negativamente a regeneração em todos os explantes utilizados. A higromicina a 2,5 mg.L⁻¹ inibe em 100% a regeneração de cotilédones, nó cotiledonar e hipocótilo. Os ínstares mais novos de *H. puera* são susceptíveis tanto ao produto comercial DipelTM quanto aos esporos crescidos em laboratório, apresentando 100% de mortalidade a concentrações de 2x10⁵ UFC após 24 horas de ingestão. Mostrando assim seu potencial na transgenia visando à expressão de genes de Bt para a resistência a insetos. Os resultados apresentados nesse trabalho contribuem para o ganho de informação sobre os fatores que influenciam a organogênese desta espécie, bem como, definir parâmetros que possam ser utilizados em experimentos futuros visando à transformação genética da espécie.

Palavras-chave - Biorreguladores; Organogênese; Cultura de tecidos de árvores; Controle biológico; Timentim; Cefotaxima

ABSTRACT

Development of biotechnological methods for micropropagation, regeneration and genetic transformation of teak (*Tectona grandis* L. f) to resistance for *Hyblaea puera*

Genetic transformation allows the introduction of genes in host genomes and can therefore be used to improve forestry and agronomic traits like insect resistance. However, efficient plant regeneration protocols are necessary to obtain transgenic plants. Thus far, information about *in vitro* teak (*Tectona grandis* L. f) organogenesis is scarce. Therefore, the aims of this study were: develop an efficient protocol for *in vitro* organogenesis of teak, assess conditions for its genetic transformation and test the susceptibility of the caterpillar *Hyblaea puera* to toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. We evaluated the influence of TDZ and BAP on the induction of organogenic competence in hypocotyl, cotyledonary nodes and cotyledons. Growth regulators IBA, BAP, NAA and GA3 were used in the regeneration of the hypocotyl, cotyledonary node, root, epicotyl and cotyledon. Antibiotics for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* (timentin, cefotaxime and carbenicillin) and for selection of transgenic cells (hygromycin) were also evaluated. Finally, tests with the biological insecticide Dipel™ and spores of *B. thuringiensis* grown in laboratory were performed with the caterpillar of *Hyblaea puera*. TDZ increases 46% the regeneration frequency and BAP 26% when compared to controls. Cotyledonary nodes showed the best regeneration frequency (70%) growing on MS medium added of 1 mg.L⁻¹ BAP + 0.5 mg.L⁻¹ GA3. Hypocotyls, roots, cotyledons and epicotyls presented variable frequency of regeneration (60%, 60%, 30%, and 10% respectively) growing on distinct concentrations of growth regulators. We tested three antibiotics (timentin, cefotaxime, and carbenicillin) to suppress *A. tumefaciens in vitro* growth and they presented different effects on the organogenesis of each explants used in this study. Timentin and cefotaxime at concentration of 300 mg.L⁻¹ increased the number of buds on hypocotyls and cotyledonary nodes. Conversely, these antibiotics had negative effects on the number of shoots of cotyledonary explants. Carbenicillin at all doses presented a negative influence on regeneration of all explants. Hygromycin at concentration of 2.5 mg.L⁻¹ inhibits 100% of regeneration of cotyledons, cotyledonary nodes, and hypocotyls. The young instars of *H. puera* are susceptible to likely both commercial product Dipel™ and spores grown in the laboratory, presented 100% mortality at concentrations of 2x10⁵ CFU after 24 hours of ingestion. These findings suggest its potential to be used in teak transgenic approaches for insect resistance. Our results contribute to information about factors that influence the organogenesis of this specie, as well as define parameters that can be used in future experiments aimed at the genetic transformation of the specie.

Keywords- Growth regulators; Organogenesis; Tree tissue culture; Biological control of insect; Timentin; Cefotaxime

1 INTRODUÇÃO

Tectona grandis Linn. f., popularmente conhecida como teca pertence a família Lamiacea e ocorre naturalmente na Índia, Myanmar, Tailândia e Laos. Esta espécie apresenta um alto valor madeireiro, sendo considerada uma das mais valiosas do mundo (MASCARENHAS et al., 1987; OLIVEIRA et al., 2007; TECA, 2007). Atualmente, a tora de desbaste com diâmetro variando de 15 a 20 centímetros chega a ser comercializada a valores entre US\$ 700 e US\$1200/m³ e é considerada uma das cinco espécies tropicais arbóreas mais plantadas no mundo (DAH e BAW, 2001; BHAT e MA, 2004).

Com a devastação das florestas naturais, aliadas à crescente demanda de madeira nos mercados nacional e internacional, para energia, celulose, serraria e usos nobres, esforços tem sido empreendidos para que florestas de uso múltiplo sejam estabelecidas, e que estas além de atender os mercados consumidores também evitem que os ecossistemas nativos sejam explorados (GRATTAPAGLIA, 2007; PIJUT et al., 2007; ANDRADE *et al.*, 2003; ROCHA e TRUGILHO, 2006).

A introdução de espécies florestais exóticas no Brasil trouxe grandes benefícios para o desenvolvimento social e econômico do país, principalmente em áreas onde as características edafo-climáticas eram desfavoráveis à agricultura (SAMPAIO et al., 2000; FURLAN et al., 2007). Atualmente diversas espécies arbóreas exóticas, como o eucalipto, pinus e a teca estão sendo plantadas no Brasil, entretanto a teca vem se destacando como uma das mais promissoras espécies para plantios nas regiões sudeste e centro-oeste do país (ABRAF, 2009).

A teca é uma espécie com produtividade relativamente alta quando comparada a outras madeiras de lento crescimento, como o mogno (*Swetenia macrophylla* G. King) e cerejeira (*Torresia acreana* Ducke). Entretanto, a espécie tem enfrentado o ataque da lagarta *Hyblaea puera* Cramer, a qual consome as folhas da espécie diminuindo a maior parte da área fotossintetizante e conseqüentemente causando perdas de até 44% nos plantios comerciais (NAIR, 1985; PERES FILHO et al., 2002).

O melhoramento genético de espécies florestais tem como principais objetivos o aumento da produtividade, a obtenção de matéria prima de maior qualidade, a melhoria nas condições adaptativas das espécies, a tolerância a pragas e doenças e ainda a manutenção da variabilidade genética, requisito fundamental para a obtenção de ganhos genéticos (MORI, 1993). Contudo,

clones de teca com características de resistência a *H. puera* são raros (RAWAT et al. 1998), apresentando dessa forma baixa variabilidade da espécie para o início de programas de melhoramento de resistência a esse inseto. As características desejadas, como resistência a pragas, inevitavelmente devem estar presentes nas populações base da espécie, para com isso, impulsionar programas de melhoramento visando à obtenção de ganhos genéticos para as progênies.

A vantagem de se trabalhar com engenharia genética como ferramenta no melhoramento é a obtenção de uma planta com a característica almejada, além da conservação da variabilidade genética já adquirida pelo melhoramento convencional. Isso é ainda mais complicado quando se trabalha com espécies florestais, que apresentam lento crescimento e demorados testes de progênies (POUPIN e ARCE-JOHNSON, 2005; GIRI et al., 2004). Entretanto, para os processos de transformação genética, protocolos de regeneração de plantas *in vitro* devem ser eficientes e repetitivos, o que ainda não ocorre com a teca.

A utilização de novas tecnologias associadas ao melhoramento genético clássico tais como, micropropagação (organogênese direta) e engenharia genética, permitem estudar e obter plantas melhoradas com mais rapidez, porém, essas tecnologias necessitam de protocolos bem estabelecidos de regeneração de plantas *in vitro* (GIRI et al., 2004; POUPIN e ARCE-JOHNSON, 2005). Avanços recentes em transformação genética de plantas arbóreas têm possibilitado a transferência de genes de interesse, antecipando e ajudando, no que diz respeito às limitações do melhoramento tradicional (POUPIN e ARCE-JOHNSON, 2005).

Antigamente o principal objetivo na utilização da cultura *in vitro* de árvores era o de propagar genótipos desejáveis e com isso fixar as características dessas plantas para a utilização na propagação massal. Mais recentemente os pesquisadores, além desse interesse, têm buscado protocolos eficientes de regeneração via organogênese e ou embriogênese somática no intuito da transformação genética dessas plantas (MERKLE e NAIRN, 2005). Entretanto espécies lenhosas apresentam dificuldades de regeneração em cultura de tecidos, além de protocolos poucos reproduzíveis (GIRI et al., 2004).

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivos estudar a organogênese *in vitro* de teca visando desenvolver método de regeneração eficiente para esta espécie, definir parâmetros do processo de transformação, avaliar a susceptibilidade da lagarta *H. puera* a toxinas produzidas

pelo *Bacillus thuringiensis* Berlinder e, finalmente, estudar e aplicar protocolos de transformação genética com o gene *cryIAb* em teca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição e ocorrência natural de teca

A teca (*Tectona grandis* Linn. f.), pertencente à família Lamiacea (APGII, 2003), ocorre naturalmente entre 10 a 23° Norte, em uma área que compreende a maior parte da Índia peninsular, Myanmar, Laos e Tailândia (Figura 1) (TROUP, 2006).

Figura 1- Área de distribuição natural de *T. grandis* no mundo. Adaptado de Fofana et al., (2009)

Considerada uma das espécies mais valiosa do mundo (FOFANA et al., 2009), é muito procurada no mercado internacional pela qualidade de sua madeira que possui sutis combinações de beleza, resistência e durabilidade (BEHLING, 2009).

Árvore decídua com folhas elípticas, coriáceas, opostas e em plantas jovens verticeladas, com uma tonalidade verde mais escura na parte adaxial e um tom mais claro na parte abaxial tomentosa e áspera ao tato. As folhas de *T. grandis* podem chegar a dimensões de até 60 cm de largura e até 80 cm de comprimento, a fase de brotação de novas folhas inicia-se com o período chuvoso (WEAVER, 1993).

As inflorescências são do tipo panícula terminais eretas e as flores são pequenas e numerosas (mais de 100 por inflorescência). Cálice de cor creme finamente pubescente, corola esbranquiçada e em forma de funil (com tubo curto e lóbulos estendidos), seis estames estendidos no tubo da corola, ovário tetralocular e flores monóicas. A floração é intensa e inicia após as primeiras chuvas, assim como as brotações, estendendo-se por mais de 60 dias (WEAVER, 1993). A polinização é feita por insetos (KAOSA-ARD, 1993) e as flores possuem um mecanismo de auto-incompatibilidade para evitar a autopolinização, sendo dessa forma preferencialmente alógama (FOFANA et al., 2009; BRYNDUM e HEDEGART, 1969).

A frutificação inicia-se a partir dos seis anos de idade, podendo ocorrer em algumas procedências antes de dois ou três anos de idade (JOSÉBIO et al. 2007). Os frutos são drupas de coloração castanho-claro, tetraloculares, envolto em cálice membranoso e persistente, 1 kg de frutos pode conter de 1.100 a 1.500 unidades. As sementes são pequenas e oleaginosas com 5 a 6 mm de comprimento e 2 a 3mm de largura (BARROSO, 1983).

Para potencializar o processo de germinação, as sementes de *T. grandis* precisam de um período de pós-maturação necessitando geralmente, ser armazenadas durante vários meses (CHAMPION e BRASNETT, 1958; TROUP 1996). Recomenda-se que os frutos menores do que 14 milímetros de diâmetro sejam descartados (BANIK, 1977), sabe-se ainda que sementes provenientes de regiões secas são mais difíceis de germinar. A teca apresenta germinação epígea (TROUP, 1996).

Em procedências de *T. grandis* da Índia, Schubert (1974) observou que cada fruto continha em média 1,7 sementes. Gupta e Kumar (1976) descreveram que 35% dos frutos continham uma semente, 12% duas sementes, 2% três sementes, 0.4% dos frutos continham quatro sementes e que em 51% dos frutos não continham sementes. Além dos frutos terem poucas sementes, a germinação é dificultada pela casca dura e baixa qualidade fisiológica da mesma (TIWARI et al. 2002).

T. grandis ocupa rapidamente as clareiras abertas das florestas, não sendo tolerante a qualquer forma de sombreamento. Seu crescimento inicial em altura é muito rápido, chegando aos três metros no primeiro ano e aos cinco metros no segundo ano, o que torna a espécie muito apreciada para a produção de madeira.

O alburno vai do branco ao cinza claro e normalmente o lenho (xilema secundário) vai do amarelo ouro ao marrom, escurecendo quando em contato com o ar e ao envelhecimento. O crescimento em anel é distinto a olho nú, essa madeira é considerada moderadamente pesada ($0,6\text{g/cm}^3$) e elástica (NAIR, 1997).

Além da durabilidade e estabilidade, a madeira da teca é muito resistente ao ataque de cupins, brocas marinhas e outros insetos, isso se deve ao fato de apresentar sesquiterpenos que são compostos inseticidas (ANON, 1996). A madeira da teca possui uma grande demanda, principalmente no continente europeu, superando cinco vezes o preço do mogno (*Swietenia macrophylla* G. King) no exterior. A tora de desbaste com diâmetro variando de 15 a 20 centímetros chega a ser comercializada a US\$900,00 e o metro cúbico de toras de 48 centímetros. Em Myanmar, essas mesmas toras chegam a ser vendidas em leilões por US\$1900,00 o m^3 (OLIVEIRA et al., 2007; TECA, 2007). Como comparação pode citar que toras de mogno com diâmetros similares a 48 centímetros são comercializadas a R\$500,00.

A madeira da teca é utilizada para os mais variados fins, dentre eles, podemos citar a carpintaria, marcenaria, produção de móveis finos, construção naval, onde é praticamente insubstituível, pelo fato de resistir muito bem às intempéries e a água do mar (RONDON NETO et al., 1998; LAMPRECHT, 1990). É também muito apreciada na ornamentação de parques e jardins pela beleza da árvore e na utilização para o seqüestro de carbono (SILVER et al. 2004).

A teca, para o Brasil, vem ao encontro das alternativas na substituição de espécies nativas de grande valor econômico, como o mogno e a Cerejeira (*Torresia acreana* Ducke), dentre outras, diminuindo a pressão de exploração aos ecossistemas florestais nativos que ainda resistem às perturbações antrópicas (BEHLING, 2009).

Em sua área de ocorrência natural, essa espécie enfrenta uma drástica diminuição de seu ecossistema, seja pelo extrativismo indiscriminado que sofreu ao longo dos últimos 50 anos, seja por condições bióticas e abióticas agora desfavoráveis. Essa diminuição dos recursos traz sérios malefícios para as populações naturais, tais como mudanças no fluxo de pólen, diminuição da variabilidade genética, com a diminuição das populações e aumento da endogamia (FOFANA et al., 2009).

A contínua perturbação antrópica em ambientes naturais afeta de maneira negativa a manutenção do germoplasma de teca. Esses efeitos são desconhecidos para as populações naturais (LOWE et al., 2003) e em consequência para as florestas plantadas com materiais provenientes desses ambientes perturbados, uma vez que a utilização de variabilidade genética natural pode ser restrita com a perda muitos indivíduos e genes respectivamente.

2.2 Cultivo de teca no Brasil e no mundo

A madeira da teca é utilizada há séculos no oriente, onde foi intensamente apreciada pelos seus colonizadores para a confecção de embarcações devido a sua alta resistência às intempéries (OLIVEIRA et al., 2007). Santhakumaran et al. (1997) citam que dentre os anos de 1495 e 1498 foram encontrados, na costa da Arábia (Ilha de Tylos), pedaços de madeira de teca em destroços de navios, dando a evidência de que essa madeira é utilizada há séculos. Na antiga Índia a teca também deveria ter sido popular dentre as pequenas embarcações pesqueiras (MONEY, 1811; WILLCOX 1827, apud SANTHAKUMARAN et al., 1997).

A primeira plantação da espécie ocorreu em Sri Lanka por volta de 1680 (procedência de Java). Na Índia as plantações iniciaram-se em 1840, avançando por Myanmar e Indonésia por volta de 1865. Fora do continente asiático a teca foi introduzida primeiramente na Nigéria em 1902, seguido por Ghana em 1905 e Côte-d'Ivoire em 1929. Na América o primeiro país a receber a espécie foi Trinidad em 1913 e Panamá e Costa Rica entre 1927 e 1929 (SCHLEDER, 2004).

A primeira experiência brasileira com plantios de *T. grandis* ocorreu no início do século 20 pelo Engenheiro Agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, nas cidades de Rio Claro-SP e Rio de Janeiro-RJ. Essas plantações ocorreram conjuntamente com outras espécies florestais com o intuito de se escolher madeira para construção das estradas de ferro (SAMPAIO, 1930; COUTINHO, 2004).

Plantios de teca são facilmente estabelecidos, por isso esta espécie é muito promissora para plantações nos trópicos (KEOGH, 1996). A área plantada de *T. grandis* em 1996 no Brasil era de 10 mil hectares, hoje esta área está em 48.576 hectares e cada vez aumentando, seja pela

maior visibilidade da madeira e valor da mesma ou visando reduzir a exploração dos recursos florestais naturais (ABRAF, 2008). A teca está sendo plantada em mais de 36 países tropicais ao redor do mundo, alcançando 187,1 milhões de hectares e até o ano de 2000, por volta de 5,7 milhões de hectares (3% do total mundial) eram de teca (FAO, 2001).

A produção mundial de madeira de teca atualmente chega aos 3 milhões de m³/ano, extremamente baixa quando observamos a demanda do mercado (FILHO et. al, 2007). Sua característica favorável ao mercado madeireiro rende a teca valorosas perspectivas, proporcionando reposição florestal por ser vigorosa e de resultados comprovados e apresentando-se como uma alternativa para a possibilidade de suprimento sustentável da indústria (BEHLING, 2009).

T. grandis cresce com maior facilidade em clima tropical úmido e quente, embora esta espécie possa ser plantada sob ampla diversidade de condições climáticas e de solo, seu cultivo pode ser feito em regiões com precipitação anual em torno de 600 mm e até acima de 5.000 mm, bem como em áreas com temperaturas que variam de 2° a 48°C. Condições ótimas são verificadas em regiões cuja precipitação varia em torno de 1.240 e 3.750 mm/ano, e ausentes de geadas (MASCARENHAS e MURALIDHARAN, 1993).

Além de Mato Grosso, plantações de *T. grandis* estão espalhadas por todo o Brasil, como nos estados do Paraná, São Paulo, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Pará, Acre, Amazonas, Rondônia e Amapá (ABRAF, 2008).

Na região de Cáceres-MT e em condições ideais de cultivo, o incremento médio anual é de 10 a 15 m³/ha/ano, com 250 a 350 m³/ha no final de um ciclo de 25 anos, com um regime de quatro desbastes. No corte final, 50 a 60% da produção total é colhida, correspondendo aproximadamente a 150 a 230 m³/ha. A madeira de primeiro desbaste, mesmo sendo considerada não comercial, tem aplicação no meio rural, como renda alternativa. Há estimativas de que a amortização dos custos de plantio se dá no terceiro ou quarto desbaste, e no último, a concentração dos rendimentos (ANGELI, 2003).

2.3 Lagarta desfolhadora da teca (*Hyblaea puera* Cramer, 1777)

A teca é bem adaptada no Brasil, porém as plantações comerciais enfrentam o ataque da lagarta *Hyblaea puera* Cramer 1777, inseto denominado “lagarta desfolhadora da teca”. Esta lagarta se caracteriza na principal praga que consome folhas da espécie diminuindo a maior parte da área fotossintetizante das plantas causando grandes prejuízos, não só no Brasil como no mundo (BEESON, 1941; NAIR et al., 1985; PERES FILHO et al., 2002).

Nativa do sudoeste asiático, embora tenha sido encontrado na América central, África e América latina, esse lepidóptero é mundialmente conhecido como lagarta desfolhadora da teca. *Hyblaea puera* Cramer, 1777 (Lepidoptera: Hyblaeidae). E teve a sua primeira citação como praga em 1898 na Divisão florestal de Konni em Kerala, Índia (BIJI et al., 2006) e até hoje é tida como a principal praga da teca na Índia (JAVAREGOWDA e NAIK, 2007) .

As mariposas adultas são relativamente pequenas, com uma envergadura de 3 a 4 centímetros e asas pretas, com manchas amarelo alaranjadas na parte posterior com alas castanho-acinzentado na parte superior. O acasalamento ocorre dentro de dois dias e os ovos são colocados um a um separadamente em folhas jovens próximos as nervuras, geralmente na superfície inferior (HYBLAEA, 2009).

Os ovos são lisos, brancos e medem cerca de 1 milímetro de comprimento. Cada mariposa dessa espécie chega a ovopositar cerca 1000 ovos, sendo que as lagartas nascem após o segundo dia. Para lagartas desta espécie existem cinco instares, o primeiro e segundo estádios, se alimentam na superfície da folha. A partir do terceiro ínstar, a larva corta uma ponta da folha, geralmente na borda e dobra por cima de si mesma, prendendo com um tipo de fio de seda e se alimenta dentro dessa estrutura, ficando assim protegida. Esse inseto devora a folha inteira, com exceção das nervuras principais (HYBLAEA, 2009).

Sob condições ideais, o período larval dura de 10 a 12 dias, nesse período as larvas alcançam de 3,5 a 4,5 centímetros e há considerável variação de cor no quarto e quinto instares, o corpo tanto pode ser totalmente preto ou acinzentado escuro com faixas coloridas longitudinais, podendo incluir uma mancha laranja dorsal e linhas laterais brancas (Figura 2) (JAVAREGOWDA e NAIK, 2007, HYBLAEA, 2009).

Figura 2 - Ínstar jovem de algarta de *Hyblaea puera* Cramer encontrada em plantio comercial de teca no município de Mirassol d'Oeste, estado do Mato Grosso em Dezembro de 2008 (Barra=1cm)

As lagartas no último ínstar descem até o chão com auxílio de fios parecidos como fios de seda e empupam sob uma camada fina de serapilheira ou solo. Os casulos construídos de folhas secas e/ou deterioradas, ou mesmo partículas do solo juntamente com seus fios de seda. O empupamento pode ocorrer algumas vezes em folhas verdes de outras plantas, dobradas ou justapostas com seus fios de seda. O período médio de pupa dura seis a oito dias, sob condições ideais. Não há nenhuma evidência de hibernação da pupa (HYBLAEA, 2009). Estimativas precisas dos danos na perda de madeira pelo ataque de tal inseto são escassas na literatura. Segundo Nair (1985) em plantios aos cinco anos de idade 44% do volume de madeira é perdida com ataque deste inseto.

Nos países que possuem plantações de *T. grandis* a presença deste inseto é tida como risco eminente as culturas. No Brasil, infestações com *H. puera* foram observadas nos municípios de Cáceres e Rosário Oeste-MT (2002) e na região de Cuiabá-MT. Cita-se também a ocorrência deste lepidóptero em outras localidades brasileiras, como: Chapada dos Guimarães-MT, Jataí-GO, Dourados-MS, Rio de Janeiro-RJ e região de Cubatão-SP (PERES FILHO et al. 2002). Esse inseto-praga, além de atacar a teca, pode também ocorrer em outras plantas hospedeiras como *Vitex*, *Clerodendron*, *Spathodea*, *Vitex altissima*, *Avicennia officinalis*, *Callicarpa arborea*, *Vitex*

peduncularis, *V. pubescens*, *V. negundo* e *Oroxylum indicum* (COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY, 1981; BAKSHA e CRAWLEY, 1995).

2.4 Controle biológico em plantações florestais

O controle biológico de insetos é foco inúmeros estudos face ao risco da utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos na agricultura, os quais podem ocasionar resistência das pragas ou a ocorrência de pragas secundárias, além dos danos ao meio ambiente. Normalmente são utilizados parasitóides, predadores, microorganismos e plantas para o controle das pragas, ou seja, para que os insetos que atacam as plantações florestais ou agrícolas, não atinjam níveis populacionais elevados que causem danos econômicos. No Brasil o controle biológico de insetos vem sendo reconhecido internacionalmente, principalmente pelos programas de controle biológico na área agrícola, com as culturas de cana-de-açúcar e de soja (BERLITZ e FIUZA, 2005; NOTÍCIAS, 2007).

O mesmo caminho tem sido trilhado no setor florestal, o qual tem sofrido perdas consideráveis com a introdução accidental de pragas exóticas. Quanto a isso podemos citar o Pinus, com a ocorrência da vespa-da-madeira (*Sirex noctilio*), e com as detecções dos pulgões do Pinus (*Cinara pinivora* e *C. atlantica*). As florestas de eucalipto têm enfrentado problemas com as pragas nativas, como as formigas cortadeiras, cupins e lagartas. Porém, a invasão de pragas exóticas, como a broca-do-eucalipto (*Phoracantha semipunctata*), o gorgulho-do-eucalipto (*Gonipterus scutellatus*) e o psílideo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*), também têm causado prejuízos (NOTÍCIAS, 2006).

O *Bacillus thuringiensis* Berlinder é um inseticida biológico muito utilizado no controle de insetos pragas e vem sendo intensamente utilizado em plantações anuais e perenes (TABASHNIK et al., 2008). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, sendo naturalmente encontrada no solo. Durante a fase de esporulação, essas bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos pólos da célula (HÖFTE e WHITELEY, 1989; PEFERÖEM, 1997). Esses cristais são compostos por uma ou mais proteínas Cry, também chamadas de delta-

endotoxinas que são altamente tóxicas e específicas, por isso inofensiva para a maioria dos outros organismos, também para insetos benéficos (HERRERO et al., 2001; SIEGEL, 2001).

As delta-endotoxinas no trato digestivo das lagartas susceptíveis são solubilizadas e proteoliticamente convertidas em pequenos polipeptídios. Um passo crítico para a atividade inseticida dessas proteínas é a ligação desses peptídeos a receptores localizados nas microvilosidades da membrana apical das células epiteliais do intestino médio (HOFMANN et al., 1988, VAN RIE et al., 1990). A interação da toxina com esses receptores desencadeia a formação de canais iônicos (SACCHI et al., 1986; LORENCE et al., 1995), os quais causam lise osmótica por meio de formação de poros da membrana (permitem a passagem de água e íons), levando ao inchaço do intestino médio e lise das células. Intoxicados, os insetos param de se alimentar e morrem (ARANDA et al., 1996).

Em florestas o controle químico é limitado por causa da preocupação ambiental e da certificação destas frente ao mercado consumidor internacional, o controle biológico vem sendo usado como forma alternativa para controle de pragas. Cita-se também como benefício deste inseticida o seu menor impacto para o meio ambiente uma vez que é inofensivo para a maioria dos outros organismos, também para insetos benéficos (HERRERO et al., 2001; SIEGEL, 2001).

Não há controle químico oficialmente regulamentado para a teca no Brasil, no entanto o uso de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tem trazido resultados bastante satisfatórios (PERES FILHO *et al.*, 2006), a utilização de produtos a base de *Bt* em teca é citada por Javaregowda e Naik (2008) e mostra-se muito eficiente chegando a 100% de mortalidade nos primeiros instares desse inseto.

O produto comercial a base de *Bt*, denominado Dipel PM® é o mais vendido mundialmente, sendo muito eficaz contra 170 espécies de insetos-praga da ordem Lepidoptera e pouco tóxicos para coleópteros, ácaros, dípteros e hemípteros (POLANCZYK e ALVES, 2005).

2.5 Perspectivas na transformação genética com genes *cry*

Uma das técnicas de transformação genética é via *Agrobacterium tumefaciens*, que é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica e presente no solo. Essa bactéria tem a capacidade de transferir segmentos de seu próprio DNA, conhecido como DNA de transferência (T-DNA) para o genoma

das plantas, podendo incorporar os genes responsáveis por características desejáveis na planta em estudo (BRASILEIRO e LACORTE, 1998).

Há mais de vinte anos, o desenvolvimento de tecnologia de transformação genética de espécies arbóreas tem possibilitado o incremento de resistência a insetos em plantas (FERRY, 2006). A inserção de genes de *Bacillus thuringiensis* é uma das estratégias dos biólogos moleculares e melhoristas para o sucesso de obtenção desse tipo de resistência (MAZIER et al., 1997; ROMEIS et al., 2006), porém poucas espécies arbóreas são transformadas com os genes de *Bt*. Avanços recentes em transformação genética de plantas arbóreas têm possibilitado a transferência de genes de interesse antecipando e ajudando, no que diz respeito às limitações do melhoramento clássico (GIRI, 2004).

A importância de se desenvolver trabalhos de transformação genética de plantas com os genes de resistência a insetos está na redução de uso de inseticidas químicos, que causa grande impacto no meio ambiente, prejudicando animais e humanos, o que não ocorre com plantas *Bt*, pois as proteínas expressas por essas plantas não são tóxicas aos humanos e animais e nem se acumulam em tecidos adiposos ou persistem no meio ambiente como alguns inseticidas químicos (BISHOP et al., 1999; SIEGEL, 2001). Halcomb et al. (1997), obteve até 100% de controle de *Heliothis virescens* e *Pectinophora gossypiella* em milho *Bt* e em estudos com batata *Bt* demonstraram não necessitar de aplicações suplementares de inseticidas químicos no controle de *Leptinotarsa decemlineata* (PERLAK et al., 1997).

Jouanin (1998) relata que a inserção de genes em árvores é difícil e poucas espécies têm sido transformadas com genes para resistência a insetos. Contudo, esforços têm sido empreendidos na última década para trabalhos de transformação dessas espécies com tais genes (BOERJAN, 2005; NEHRA et al., 2005). As plantas geneticamente transformadas com o gene de *Bt* demonstram ser uma eficiente e promissora estratégia para controles de insetos praga, que vem crescendo muito por todo o mundo (RANJEKAR et al., 2003).

As principais proteínas de *Bt* são tóxicas para lepidópteros (*CryI*), lepidópteros e dípteros (*CryII*), coleópteros (*CryIII*) e dípteros (*CryIV*) (AGAISSE e LERECLUS, 1995). As toxinas *CryI*, específicas para lepidópteros, são as mais estudadas, existindo 20 seqüências diferentes de aminoácidos, codificadas por 6 genes (*CryIA(a)*, *CryIA(b)*, *CryIA(c)*, *CryIB*, *CryIC* e *CryID*)

(HÖFTE e WHITELEY, 1989). Os produtos dos genes ativos contra lepidópteros, derivados da subespécie *kurstaki*, que foram descritos no início dos anos 60, denominados genericamente *cryIa*, e seus derivativos isolados em meados da década de 80 são, de longe, os mais caracterizados (HÖFTE e WHITELEY, 1989).

Grace et al. (2005) discutem que em pinheiros (*Pinus spp*) os métodos de melhoramento convencionais de plantas utilizados ao longo dos últimos 50 anos resultaram em significativos ganhos genéticos em crescimento, forma e resistência a patógenos. Contudo, o tempo de reprodução destas plantas torna o melhoramento convencional uma técnica muito demorada, sem falar que algumas características desejáveis de valor comercial, tais como resistência a insetos, podem não estar disponíveis na população e nem nos recursos genéticos. Engenharia genética e tecnologias de cultura de tecidos já oferecem alternativas metodológicas para a introdução rápida e eficiente de características desejáveis diretamente em genótipos de famílias elite.

A inserção de genes que expressem proteínas inseticidas é uma nova maneira de acelerar o melhoramento agrícola e florestal. O desenvolvimento de plantas resistentes a insetos fornecem uma abordagem rápida e segura de manejo de pragas (YANG, 2003).

2.6 Cultura de tecidos de teca

Todas as células do corpo da planta, células vivas e normais, teoricamente, possuem a capacidade de regenerar em um organismo inteiro (totipotência) por meio de formação de um novo órgão ou embriões somáticos. O processo de aquisição de competência, desdiferenciação e rediferenciação é essencialmente regulado por substâncias de crescimento vegetal, exemplo, auxinas e citocininas (MURTHY et al., 1998).

Atualmente, as técnicas de cultura *in vitro* apresentam um papel importante para a conservação de germoplasma, fixação de ganhos genéticos e indução da variação genética. Desta maneira, um dos maiores benefícios das técnicas de cultura de tecidos vegetais para o melhoramento de plantas perenes, refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética através da propagação clonal.

Podemos citar ainda, os marcadores bioquímicos e moleculares como ferramentas biotecnológicas no auxílio de programas de conservação e melhoramento genético de espécies arbóreas (GRATTAPAGLIA et al., 2009; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), pois os programas de melhoramento genético florestal apresentam um tempo mais lento pelas características de crescimento, auto-incompatibilidade das espécies e locos altamente heterozigotos, o que dificulta em muito a seleção de caracteres de interesse agrônomo (GIRI et al. 2004).

A organogênese *in vitro* envolve vias complexas, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, dentre eles, fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente (D'ONOFRIO e MORINI, 2006). O processo de organogênese depende, também, da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (GEORGE et al., 2007).

Para *T. grandis* poucos estudos foram realizados a fim de se desenvolver protocolos de organogênese e/ou embriogênese eficientes, porém estudos com transformação genética requerem um sistema de regeneração de plantas *in vitro* eficiente e que permita obter uma alta taxa de regeneração e brotações (POCTRYCUS, 1991), além da transferência eficiente de transgene para a maior quantidade de células possíveis.

Mesmo sendo uma das espécies madeireiras mais valiosas do mundo, a teca possui uma literatura escassa aliada a trabalhos pouco eficientes de cultura de tecidos e transformação genética. Gupta e seus colaboradores iniciaram em 1977 as pesquisas em cultura de tecidos com teca (GRUPTA et al., 1980), porém até os dias atuais os protocolos são poucos eficientes ou mesmo quase inexistentes quando tratamos das principais vias morfogênicas (organogênese e embriogênese) utilizadas para transformação genética.

Protocolos de micropropagação (organogênese direta) estão sendo desenvolvidos e aprimorados por Tiwari et al. (2002), Daquinta et al. (2002), Shirin et al. (2005), Gyves et al. (2007), Akram e Aftab (2009). A preocupação em desenvolver protocolos eficientes de micropropagação (organogênese direta) em larga escala é para a obtenção de plantios clonais (plantas mais uniformes), uma vez que as sementes apresentam sérios problemas com a

porcentagem de germinação (casca dura e má qualidade fisiológicas das sementes), assim como a alta variabilidade genética presente nas populações de coleta, diminuindo a homogeneidade das plantas e consequentemente a produtividade (FAO, 2000a; FAO, 2000b).

No que diz respeito à organogênese indireta (a partir de tecidos indiferenciados) e embriogênese somática podemos citar Kushalkar e Sharon (1996) e Muminova et al. (1999), obtiveram calos a partir de gemas laterais formando embriões somáticos que não foram revertidos em plantas. Baghel et al. (2008) obteve plantas regeneradas a partir de três tipos diferentes de explantes (cotilédones, nós cotiledonares e epicótilos), entretanto seus dados são pobres e deixam grandes lacunas para serem utilizados eficientemente como protocolos de rotina de transformação genética da teca.

A maioria dos autores citam a importância de protocolos reproduzíveis de embriogênese e/ou organogênese para a transformação genética da espécie, porém ainda não se conseguiu transformar a teca por tais processos. Norwati et al. (2003; 2007) citam pela primeira vez na literatura sobre a transformação genética de *T. grandis*, entretanto o autor utilizou o bombardeamento em tecidos diferenciados (gemas laterais em desenvolvimento) conseguindo apenas quimeras transgênicas. Não sendo um processo indicado, pois apenas parte do tecido estará expressando os genes integrados.

Para iniciar os trabalhos de transformação genética, os aspectos relacionados à regeneração de plantas por meio de cultura de tecidos, devem ser todos elucidados, para com isso, serem reproduzíveis nos laboratórios.

2.7 Efeito de antibióticos repressores de *A. tumefaciens* na regeneração de teca

Muitos tipos de antibióticos são utilizados na cultura de tecidos de plantas. Estes compostos são preferivelmente requeridos por prevenir ou eliminar bactérias na cultura de tecidos e em alguns casos, auxiliar no desenvolvimento do tecido vegetal (HOLFORD e NEWBURY, 1991; MAMIDALA e NANNA, 2009). Entretanto, tais substâncias possuem certas desvantagens, ou seja, podem prejudicar as plantas submetidas a cultura de tecidos com efeitos fitotóxicos, bem como não serem economicamente viáveis (TERESO et al., 2006).

Timentin, ceforaxima e carbenicilina são antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, pertencentes ao grupo das penicilinas e possuem dessa forma, estrutura química similares. Esses compostos por sua vez podem influenciar positivamente o processo de regeneração *in vitro* de plantas por serem metabolizados a um composto chamado ácido fenil acético, similar estruturalmente a auxinas vegetais (HOLFORD e NEWBURY 1992; LIN et al. 1995; NAUERBY et al. 1997; LING et al. 1998, MILBORROW et al. 1975) auxiliando a regeneração.

Esses antibióticos são os três principais repressores de agrobactéria do meio de cultura quando os explantes são submetidos a processos de transformação genética de plantas. Entretanto, na literatura há vários trabalhos indicando a influência positiva ou mesmo negativa desses compostos na regeneração das espécies (LIN et al., 1995; VERGAUWE et al., 1996; NAUERBY et al., 1997; ZHI-NENG et al., 2007).

Esses antibióticos inibem a síntese da parede celular bacteriana, por ligação a uma ou mais das proteínas de ligação à penicilina (PLPs), que por sua vez, inibem a síntese da parede celular bacteriana. A cefotaxima, como outros β -lactâmicos não só bloqueiam a divisão de bactérias, mas também a divisão das organelas fotossintéticas de Glaucophyta e a divisão de cloroplastos de briófitas. Em contrapartida, ele não tem efeito sobre os plastídeos das plantas vasculares (KASTEN e RESKI, 1997).

O efeito de higromicina também foi avaliado para respostas morfogenéticas em teca. Esse antibiótico é utilizado nos processos de transformação genética como gene marcador dos tecidos transgênicos. O uso de um marcador de seleção eficiente é fundamental importância para o processo de transformação genética. A higromicina é um antibiótico que atua na proteína ribossomal 80s, bloqueando-a e bloqueando com isso a síntese de proteínas em eucariotos (EADY e LISTER, 1998), por isso é utilizada como gene marcador seletivo em protocolos de transformação genética, uma vez integrado no genoma vegetal seleciona os tecidos transgênicos e não transgênicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades referentes ao presente trabalho foram conduzidas no laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – Campus de Piracicaba - SP.

3.1 Material vegetal e condições de cultura *in vitro*

Os experimentos de cultura de tecidos de *Tectona grandis* L. f. foram realizados com sementes concedidas pela Companhia *Proteca Biotecnologia Florestal LTDA*. Os frutos, os quais foram originários de populações seminais de polinização aberta, foram recebidos sem beneficiamento, e então quebrados com auxílio de martelo para a obtenção das sementes. As sementes retiradas das drupas foram desinfestadas e germinadas *in vitro*. Os explantes obtidos das plântulas germinadas foram isolados e inoculados nos seus respectivos meios de cultivo e mantidos no escuro por um período de sete dias. Após, foram transferidos para sala de crescimento, a qual apresentou fotoperíodismo de 16 horas de luminosidade e 8 horas de escuro, intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$.

3.2 Desenvolvimento experimental

Com o intuito de atender os objetivos deste trabalho foram conduzidos experimentos envolvendo: a) tratamentos de desinfestação de sementes; b) comparação de concentrações de sais de macro e micronutrientes no desenvolvimento *in vitro*; c) indução da competência organogenética com pré tratamentos das sementes em biorreguladores; d) combinações de biorreguladores para regeneração de plantas; e) análise histológica f) testes com fontes de carbono para organogênese; g) avaliação do efeito da higromicina na organogênese indireta; h) testes com antibióticos repressores de *A. tumefaciens* na organogênese indireta; i) testes de enraizamento *in vitro* e aclimatização; j) avaliação da bioatividade de *Bacillus thuringiensis* à

Hyblaea puera; e k) teste de transformação genética de teca via *A. tumefaciens* e por bombardeamento com micropartículas.

3.3 Análise estatística

Primeiramente, foi realizada a análise exploratória dos dados objetivando averiguar as pressuposições básicas e necessárias para as análises estatísticas verificando a necessidade de transformação de dados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% e 1% de probabilidade. Em seguida, de acordo com a significância, as médias das variáveis analisadas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 Desinfestação e germinação das sementes de teca

Sementes previamente tratadas com álcool 70% v/v por 2 minutos foram submetidas à desinfestação final em três concentrações de cloro ativo (0,0; 1,3; 1,9 e 2,5%) e três tempos de imersão em cada concentração (10, 20 e 30 minutos), posteriormente enxaguadas três vezes em água destilada e esterilizada (autoclavada a 121°C e 1 kgf.cm⁻² de pressão por 20 minutos). O cloro ativo foi obtido a partir da solução comercial de hipoclorito de sódio (solução comercial com aproximadamente 2,5% de cloro ativo). Depois de desinfestadas, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de sacarose 30 g.L⁻¹, pH 5,8 e semi-solidificado com 2,3 g.L⁻¹ de PhytigelTM. O meio de cultura foi distribuído em frascos de 300 mL com 50 mL de meio, os quais foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1 kgf.cm⁻² de pressão. A condição de desinfestação utilizada para todos os experimentos subsequentes foi a de 1,9% de cloro ativo em 20 minutos de exposição. Essa condição foi utilizada por apresentar melhores resultados.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x3), contando com 12 tratamentos, seis repetições e seis sementes por vidro, totalizando 36 sementes. As avaliações das contaminações por fungos e/ou bactérias, assim como da germinação de sementes ocorreram aos 05 e 10 dias após inoculação em meio de cultura.

3.5 Organogênese direta (micropropagação) a partir de gemas laterais e diferentes concentrações de macro e micronutrientes

Para a obtenção de microplantas *in vitro* de teca, por meio de micropropagação, foram testadas três composições de macro e micronutrientes estabelecidas pelos meios de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), meio de JADS (CORREIA, 1993) e meio WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) (Tabela 1). As gemas laterais utilizadas para a obtenção das microplântulas foram isoladas de plântulas com 40 dias de germinação. Foram obtidas 40 microplantas em cada um dos meios de cultura testados. Os resultados foram analisados após 90 dias de cultivo mensurando-se a altura total (altura da base até o meristema apical), número de gemas laterais e a presença de raízes nas microplantas obtidas.

Tabela 1- Concentrações de sais (MS, JADS e WPM) utilizados nos experimentos de cultura *in vitro* de *T. grandis*

Categoria		MS	JADS	WPM
Macronutrientes (g L⁻¹)	NH ₄ NO ₃	1,65	0,320	0,4
	KNO ₃	1,9	0,81	-
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44	-	0,96
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37	0,74	0,37
	KH ₂ PO ₄	0,17	-	0,17
	KH ₂ PO ₃	-	0,41	-
	K ₂ SO ₄	-	-	0,99
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	1,181	0,556
Micronutrientes (g L⁻¹)	ZnSO ₄	8,6	4,32	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2	3,10	6,2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	16,9	16,9	22,3
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	1,25	0,25
	KI	0,83	-	-
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,15	0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,25	-
FeEDTA (mg)	FeSO ₄ .7H ₂ O	41,3	55,6	27,8
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	27,8	74,5	37,2
Vitamina (mg L⁻¹)	Tiamina	0,1	5,0	0,1
	Piridoxina	0,5	0,5	0,5
	Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5
	Mio-inositol	100	100	100
	Glicina	2,0	-	2,0
	Cisteína	-	5,0	-
	Pantotenato de Cálcio	-	2,4	-
Fonte de Carbono (g.L⁻¹)	Sacarose		30,0	
Fonte solidificante (g.L⁻¹)	Phytigel		2,3	
pH			5,8±0,2	
Autoclavar			20'/121°C/1 kgf.cm ⁻²	

3.6 Organogênese indireta

3.6.1 Experimento 1: Efeito de BAP e ANA

Segmentos de cotilédones, hipocótilos, nós cotiledonares, epicótilos e raízes, foram utilizados nesse experimento. Os explantes foram isolados de plântulas germinadas em meio MS e a formação e desenvolvimento de gemas adventícias foram estudados em meio MS acrescido

com combinações de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA).

3.6.2 Experimento 2- Influência do pré tratamento com BAP e TDZ na indução da competência organogenética de diferentes explantes

Neste experimento foi avaliada a indução da competência organogenética em hipocótilos, nós cotiledonares e cotilédones, utilizando o meio MS sem biorreguladores e acrescido de BAP e TDZ (thidiazuron) nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹ no momento da germinação. Foram utilizadas um total de 4883 sementes distribuídas para os cinco tratamentos.

3.6.3 Experimento 3- Efeito de BAP, AIB e GA₃

Nesse experimento foi estudado a indução e desenvolvimento de gemas adventícias em explantes obtidos de plântulas germinadas resultantes do experimento descrito no item 3.6.2. As plântulas obtidas tiveram os explantes isolados e inoculados em meio MS com 16 combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indolbutírico (AIB) e ácido giberélico (GA₃). As combinações e concentrações dos respectivos biorreguladores encontram-se detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações dos biorreguladores BAP, AIB e GA₃ utilizados para o estudo da organogênese *in vitro* de teca

Tratamentos	BAP	AIB	GA ₃
1	0	0	0
2	1	0	0
3	3	0	0
4	5	0	0
5	0	0,5	0
6	1	0,5	0
7	3	0,5	0
8	5	0,5	0
9	0	0,5	0,5
10	1	0,5	0,5
11	3	0,5	0,5
12	5	0,5	0,5
13	0	0	0,5
14	1	0	0,5
15	3	0	0,5
16	5	0	0,5

Para os experimentos 3.6.1 e 3.6.3, após três semanas de cultivo, os explantes foram transferidos para meios frescos com as mesmas composições, sendo que as respostas morfogênicas foram avaliadas até 12 semanas de cultivo. Os segmentos de epicótilos foram introduzidos horizontalmente no meio de cultura, sendo que os cotilédones foram cortados em duas partes e inoculados com a parte adaxial em contato com o meio. Por fim, os hipocótilos, nó cotiledonar e raízes foram inoculados verticalmente, onde a parte inferior cortada ficou em contato com o meio de cultura.

O delineamento utilizado para os experimentos 3.6.1 e 3.6.3 foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e quatro explantes por vidro (total de 20 explantes). Após a coleta de dados ao final de seis semanas, os melhores tratamentos foram repetidos com dez repetições e cinco explantes por repetição (total de 50 explantes), esse procedimento foi feito para maior acurácia nos resultados.

3.7 Efeito de diferentes fontes de carbono

Neste experimento foi avaliada a eficiência de fontes de carbono (Sacarose, Maltose, Manitol, Galactose, Glicose e Sorbitol) na organogênese *in vitro* de teca. Os hipocótilos e nós cotiledonares foram inoculados em meio MS acrescido de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 . Os cotilédones foram inoculados em meio MS acrescido de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 . Esses explantes foram mantidos nos respectivos meios de regeneração contendo 30 g.L^{-1} de cada uma das diferentes fontes de carbono. A porcentagem de gemas adventícias foi avaliada após 50 dias de cultivo. O experimento contou com dez repetições por tratamento e cinco explantes por vidro, totalizando 50 explantes por tratamento.

3.8 Análise histológica

Os cortes histológicos foram realizados no laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de plantas do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP. Este experimento foi realizado para confirmar a presença de gemas adventícias. Foi realizada a análise histológica dos hipocótilos germinados em $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ com 20 dias e segmentos com 28 dias de cultivo em meio de regeneração (1 mg.L^{-1} de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3).

Para a análise histológica foram selecionadas, aleatoriamente, três plântulas com 20 dias de germinação e hipocótilos com 28 dias em meio de regeneração, conforme já descrito. Dessa forma, os explantes foram separados e fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) por um período de 24 horas, desidratadas em série crescentes de concentração (10 a 100%) de solução de álcool etílico, infiltradas com a resina glicol-metacrilato e seccionadas longitudinalmente em micrótomo de rotação. As seções, com 5 mm de espessura, foram coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão fosfato 0,1M, pH 6.8 (O'BRIEN et al., 1965) e montadas em resina sintética "Entellan".

3.9 Efeito de antibióticos para seleção e obtenção de plantas transgênicas

3.9.1 Higromicina

Neste experimento foi avaliado o efeito de higromicina na regeneração de plantas de teca, pois o vetor pBA1 utilizado nos testes de transformação, contém o gene *hpt* em sua construção. O gene *hpt* (higromicina fosfotransferase) induz resistência a higromicina selecionando os tecidos transgênicos. Os segmentos de hipocótilos, nó cotiledonar e cotilédones foram obtidos de plântulas germinadas em meio MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de TDZ. Segmentos de hipocótilos e nó cotiledonar foram inoculados em meio MS suplementados com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5mg.L⁻¹ de GA₃ e cotilédones em meio MS suplementados com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5mg.L⁻¹ de GA₃. Para todos os explantes foram utilizadas as seguintes concentrações de Higromicina (0,0; 1,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 7,5 e 10 mg.L⁻¹). O experimento contou com dez repetições por tratamento e cinco explantes por vidro, totalizando 50 explantes por tratamento.

3.9.2 Timentin, Cefotaxima e Carbenicilina

Neste experimento foi avaliada a susceptibilidade e organogênese *in vitro* de teca aos antibióticos: timentin, cefotaxima e carbenicilina, os quais têm função de inibir o crescimento de *A. tumefaciens* após os processos de transformação genética mas a dose ideal não interfere no processo de regeneração de plantas.

Os segmentos de hipocótilos, nós cotiledonares e cotilédones foram obtidos de plântulas originadas de sementes e germinadas em 0,1 mg.L⁻¹ de TDZ. Os segmentos de hipocótilos e nó cotiledonares foram inoculados em meio MS suplementados com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ e, os cotilédones, em MS suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃. Para cada antibiótico foram utilizadas concentrações de 0,0; 100; 300 e 500 mg.L⁻¹ adicionados a cada meio após a autoclavagem. O experimento contou com dez repetições por tratamento e cinco explantes por vidro, totalizando 50 explantes por tratamento.

3.10 Enraizamento de teca *in vitro* e aclimatização

Neste experimento avaliou-se o efeito de ANA e AIB sobre o enraizamento de plântulas de teca obtidas a partir de gemas laterais de segmentos internodais de hipocótilos com 60 dias de regeneração. Esses explantes foram obtidos de segmentos de hipocótilos regenerados em meio MS acrescido de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 . As gemas assim obtidas foram inoculadas em meio MS acrescido de 0,0; 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e 0,0; 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB. Os resultados foram avaliados após 30 dias de cultivo. O experimento contou com dez repetições por tratamento e cinco explantes por vidro, totalizando 50 explantes por tratamento.

As plantas enraizadas *in vitro* foram transplantadas para condições *ex vitro* para aclimatização em casa de vegetação com umidade relativa em torno de 80% e temperatura em torno de 30°C . Tais condições foram mantidas por meio de sistema automatizado de microaspersão, exaustão de ar e sistema de refrigeração e umidificação tipo “pad house” da casa de vegetação. Foram utilizados vasos com 100cm^3 de substrato comercial a base de casca de arroz carbonizada, casca de pinus, vermiculita e fertilizantes. O experimento contou com um total de 58 plantas transferidas para condições *ex vitro*.

3.11 Transformação genética de teca via *A. tumefaciens* e por bombardeamento de micropartículas

Para os experimentos de transformação genética de teca, utilizou-se o vetor pBA1 contendo o gene *cryIA(b)* (gene de *B. thuringiensis*), o qual possui o gene *hpt* (higromicina fosfotransferase) para seleção dos transgênicos, conforme Figura 3. Foi utilizado segmentos de nó cotiledonar, hipocótilos e cotilédones foram excisados de plântulas com 20 dias de germinação *in vitro* em meio MS suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ nos experimentos de transformação genética.

Figura 3 - Representação esquemática do vetor binário de transformação denominado de pBA1 obtido pela clonagem do gene *cryIA(b)* em vetor pCAMBIA1302

No processo com agrobactéria os explantes foram submetidos à transformação com a linhagem EHA105 contendo o plasmídeo pBA1. Os explantes foram submetidos a três concentrações de acetoceringona, (50, 100 e 200 mM), em suspensão por 10 e 20 minutos com a bactéria ($DO_{600} = 0,7-1,0$). Em seguida os explantes foram secos em papel de filtro em fluxo laminar para a retirada do excesso de bactéria e passados em seguida para dois dias de co-cultivo em escuro sob uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

No período de co-cultivo os segmentos de hipocótilo e nó cotiledonar foram cultivados em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , os cotilédones em 3 mg.L^{-1} de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ GA_3 , isso para garantir maior porcentagens de regeneração. Depois desse período os explantes foram transferidos para esses mesmos meios suplementados com higromicina a $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

No experimento de bombardeamento utilizou-se um acelerador de micropartículas modelo PDS-1000/He *Biolistic® Particle delivery System* (BIO-RAD) e como fonte de explante utilizamos segmentos de nó cotiledonar, hipocótilo e cotilédone, obtidos de plântulas com 20 dias de germinação em meio MS suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ. Para a precipitação do plasmídeo na superfície do Tungstênio, utilizou-se o protocolo descrito a seguir:

O DNA plasmidial foi precipitado em partículas de tungstênio M10 de $0,1 \mu\text{m}$ (GTE Sylvania Chemicals/Metals) a uma concentração de $4 \mu\text{g}$ de DNA por mg de tungstênio. A assepsia das partículas, 25 mg foram pesadas e lavadas com $500 \mu\text{L}$ de etanol absoluto gelado, agitou-se o tubo de $1,5 \text{ mL}$ por 6 minutos e esse mesmo o tubo foi incubado a 95°C por 1 hora.

Centrifugou-se a 6797 xg por 2 segundos e a fase aquosa foi removida cuidadosamente. Adicionou-se 500µL de etanol absoluto gelado e as partículas foram sonicadas em aparelho ultrasol (*Sinics Vibra Cell*) por 15 minutos com os seguintes parâmetros: amplitude 75%; 3 segundos ligado e 1 segundo desligado e 20°C. Centrifugou-se a 6797 x g por 2 segundos e a solução aquosa foi removida. O precipitado foi lavado três vezes com 500µL de ddH₂O (resfriada) e após, centrifugou-se a 6797 xg por 2 segundos, removendo a solução aquosa a cada lavagem. Diluiu-se o precipitado com 500µL de ddH₂O (resfriada). Para a precipitação do DNA plasmidial nas partículas de tungstênio, utilizou-se para os seis disparos os seguintes componentes adicionados na ordem: 50µL de suspensão de tungstênio, 4µg de DNA do plasmídeo pBA1, 50µL CaCl₂ 2,5M gelado (-20°C), 20µL de espermidina 0,1M. Esta suspensão foi incubada em agitador durante 30 minutos a 4°C. Adicionou-se 200 µL de etanol absoluto gelado. Centrifugou-se a 10621 xg durante 1 segundo e a fase aquosa foi retirada. Esta etapa de lavagem do precipitado foi repetida três vezes. O precipitado foi diluído com 30µL de etanol absoluto gelado. Alíquotas de 5µL de partículas com DNA foram utilizadas nos disparos.

Todo o material utilizado nos experimentos de bombardeamento como membranas carregadoras, telas de retenção, membranas de ruptura e suportes para membranas carregadoras (BIO-RAD) foram desinfetados com etanol absoluto por 3 minutos e secos em condições assépticas. Para os disparos, 5µL da suspensão de partículas com DNA foram colocados no centro da membrana carregadora. Utilizou-se 11 cm, como distância de disparo (distância da placa de Petri contendo os tecidos alvos da membrana carregadora) e uma pressão de disparo de 1100 psi.

3.12 Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) em ínstares jovens de *Hyblaea puer* Cramer, 1777 (Lepidoptera: Hyblaeidae)

Neste experimento avaliamos a susceptibilidade de *H. puer* a toxinas expressas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. O objetivo deste experimento foi o de gerar resultados da toxicidade dessas toxinas corroborando o gene utilizado trabalhos de transformação genética para controle de insetos. Lagartas de *H. puer* foram coletadas em plantios homogêneos de teca no município de Mirassol d'Oeste, Estado de Mato Grosso-MT. Após a coleta as lagartas foram separadas

visualmente por idade dos ínstaes, sendo que os mais novos foram utilizados para o experimento. As lagartas foram acomodadas em placas de Petri em local protegido da luminosidade e deixadas sem alimentação durante três horas antes de serem alimentadas com folhas de teca, com e sem esporos de *Bacillus thuringiensis*.

Para a avaliação da bioatividade de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) sobre lagartas de *H. puera*, foram utilizadas três concentrações do produto comercial Dipel PM[®] encontrado na formulação pó molhável (PM), concentração de 32 g.kg⁻¹ (16.000 unidades internacionais de potência por miligrama do produto, contendo um mínimo de 25 bilhões de esporos viáveis por grama, de acordo com fabricante) e três concentrações de esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) crescidos em laboratório, além do tratamento controle.

As suspensões de Dipel PM[®] usadas nos três primeiros tratamentos foram de 2x10⁵; 2,6x10⁵ e 3,2x10⁵ unidades formadoras de colônias/mL⁻¹ (UFC/mL), calculadas segundo Silva (2006). Para os demais tratamentos foram utilizadas as suspensões de 2x10⁵; 3,2x10⁵ e 3,8x10⁶ UFC. mL⁻¹, colônias de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) provindas do *Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio State University/EUA.

Após a obtenção das colônias, uma amostra foi retirada com auxílio de palito devidamente estéril e inoculada em 120 mL de LB líquido por 48 horas a 28±2°C, sob rotação de 180 rpm. Após 48 horas foram realizadas várias diluições da cultura desde, 1 para 10 mL (1 : 10), até a diluição de 10⁻¹⁰. As diluições de 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰ foram plaqueadas em meio LB semi-sólido (7 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico) e deixadas 28±2°C por 16 horas e, logo após, realizou-se a contagem das colônias.

Para avaliar a suscetibilidade das lagartas de *H. puera* a Btk, folhas jovens de teca de aproximadamente 48 cm², foram devidamente coletadas e nelas foram aplicados um mililitro das soluções de Dipel PM[®] e esporos de Btk cultivados em laboratório (concentrações já descritas). Para o tratamento controle aplicou-se um mililitro da solução de água destilada estéril.

Para cada um dos sete tratamentos foram utilizadas sete repetições com uma lagarta por placa (7 lagartas por tratamento). Foi realizada a pesagem de cada lagarta em balança de precisão (0,001g) depois das três horas de coleta (antes do contato com os esporos) e, após 15, 24 e 36 horas em contato com os esporos de Btk.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desinfestação e germinação das sementes de teca

O etanol e o hipoclorito de sódio são as substâncias com ação germicidas mais utilizadas em processos de desinfestação *in vitro* (COUTO *et al.*, 2004; SOUSA *et al.* 1999). O hipoclorito de sódio (Cloro ativo) tem mostrado alta eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias e, também em alguns casos, promovendo aumento no total de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Os resultados referentes ao estímulo e mesmo à quebra de dormência de algumas sementes indicam que o hipoclorito de sódio escarifica o tegumento, aumentando sua permeabilidade ao oxigênio, à água e a solutos, aumentando a germinação (SOFIATTI *et al.* 2008).

As variáveis, concentrações dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição das sementes a tais compostos resultam em respostas diferenciadas de acordo com a espécie (MONTARROYOS, 2000), sendo necessária, a adequação de acordo com a sensibilidade do material a ser desinfestado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Nesse experimento foram utilizadas um total de 36 sementes por tratamento. A análise de variância dos tratamentos de desinfestação não mostrou significância para o fator tempo de exposição e para a interação entre tempo de exposição e concentração de cloro ativo (Anexo 1). Não havendo diferenças significativas para a quantidade de sementes desinfestadas e germinadas. Entretanto, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) para o fator concentração de cloro ativo.

As maiores porcentagens de contaminação (95%) foram verificadas nos tratamentos sem cloro ativo com menores tempos de exposição (10 e 20 minutos), seguido dos tratamentos com concentrações de 50%. No tratamento desprovido de cloro ativo, observou-se um aumento de contaminação por fungos. Contudo, altas concentrações de cloro ativo (1,3; 1,9 e 2,5%), a relação de contaminantes mudou consideravelmente, sendo observada predominância da contaminação por bactérias ou algum tipo de oxidação (a qual não foi identificada), mas que impedia a germinação. Essa oxidação aparentava-se com contaminação bacteriana, porém sem muito desenvolvimento (crescimento) durante o período avaliado, levando-nos a acreditar que se tratava de algum tipo de oxidação.

O menor índice de contaminação nas sementes foi verificado no tratamento com 2,5% de cloro ativo e com exposição de 30 minutos. Entretanto, a germinação foi inibida significativamente (Tabela 3). Essa inibição ocasionada por hipoclorito de sódio indicam que certas sementes, cujos tegumentos não representam barreira física para a germinação, podem ser escarificadas, a ponto de ocorrerem ferimentos nos tecidos vivos (CARNELOSSI et al., 1995), o que possivelmente deve ter ocorrido com as sementes de teca.

Tabela 3- Porcentagem de sementes viáveis de *Tectona grandis* submetidas à diferentes períodos de tempo e concentrações de cloro ativo

Cloro ativo (%)	Desinfestação	Germinação
0	6 C	25 C
1,3	45 B	67 A
1,9	62 B	65 A
2,5	78 A	34 B

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Nascimento *et al.* (2007) observaram que sementes de *Parapiptadenia rígida*, outra espécie arbórea, germinaram mesmo na presença de fungos e/ou bactérias, constatando que estes microorganismos não atuaram como fator limitante do processo. Entretanto, esses autores não citam em relação ao desenvolvimento das microplântulas na presença desses contaminantes. Esse efeito não foi constatado no presente trabalho, pois a germinação das sementes de teca foi totalmente inibida quando microorganismos estavam presentes.

Maiores porcentagens de germinação (48%) foram observadas em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) quando estas foram desinfestadas em 2,5% de hipoclorito de sódio durante 30 minutos (COUTO *et al.*, 2004). Apesar da alta porcentagem de desinfestação no tratamento 2,5% de cloro ativo, observamos houve influencia negativa nas taxas de germinação, ou seja, 33% menor que o melhor tratamento.

Em termos gerais, as sementes desinfestadas com 1,9% de cloro ativo durante 20 minutos apresentaram altas porcentagens de germinação e baixos índices de contaminação, sendo a combinação mais aconselhada para os protocolos de desinfestação das sementes a serem inoculadas nos experimentos *in vitro*. A maioria dos autores utiliza Cloreto de Mercúrio (Hg_2Cl_2) como forma de desinfestação dos explantes de teca (gemas ou sementes) para a introdução *in vitro* (SHIRIN et al., 2005; TIWARI et al., 2002; BAGHEL et al., 2008; GYVES et al., 2007).

Sabe-se que esse composto é altamente tóxico e degrada as membranas mucosas, causando efeitos malefícios para a saúde do ser humano (MERCÚRIO, 2009). Entretanto, em nosso trabalho nós mostramos que, ao menos em sementes esse composto pode ser substituído pelo hipoclorito de sódio no processo de introdução do material para condições *in vitro*.

4.2 Organogênese direta (micropropagação) a partir de gemas laterais e diferentes concentrações de macro e micronutrientes

A micropropagação, bem como outras técnicas de propagação assexuada, pode auxiliar na possibilidade de captura de genótipos superiores por meio da propagação clonal, sendo assim uma valiosa ferramenta nos programas de melhoramento genético de espécies florestais, as quais necessitam de estratégias para substituir os prolongados testes de progênes. O sucesso de um sistema de micropropagação é altamente dependente do meio de cultura, cuja composição física e química é previamente definida por um balanço nutricional e hormonal (CIRILLO *et al.*, 2003).

Segundo Caldas (1998) e George (2007), o meio de cultura apresenta importante papel no padrão de desenvolvimento *in vitro* das espécies. Uma ampla quantidade de meios de cultura são citados para a regeneração de espécie de diferentes gêneros (THORPE *et al.*, 1991). Alguns desses meios foram desenvolvidos para as necessidades da espécie estudada, como por exemplo, o meio MS que foi desenvolvido para *Nicotiana tabacum* e o WPM para plantas lenhosas, entretanto cada espécie responde de forma diferente aos diversos meios de cultura já propostos.

Com base na análise de variância, os meios MS (LLOYD e McCOWN, 1980), JADS (CORREIA, 1993) e WPM (MURASHIGE e SKOOG, 1962), testados na micropropagação de gemas laterais, apresentaram diferenças significativas tanto para altura de plântulas e para a quantidade de gemas laterais (Anexos 2 e 3).

O meio MS proporcionou o desenvolvimento de plântulas com altura média de aproximadamente 8,0 cm em relação as plântulas crescidas nos meios JADS e WPM que foram de 5,9 e 6,8 respectivamente (Figura 4). Esses dados podem ser explicados pela diferença na formulação de sais de cada meio de cultura. O MS, que apresentou um maior crescimento das plântulas, é rico em Nitrato de amônio (NH_4NO_3) e Nitrato de potássio (KNO_3), contendo 3 vezes a concentração presente em JDAS e 8 vezes maior que em WPM. Quando comparado o JADS

com o WPM, essa relação diminui, no entanto o WPM é constituído de uma menor concentração total de nitrogênio, explicando o menor crescimento das plântulas.

O MS foi o melhor confirmando estudos em teca e com outras espécies lenhosas (KUSHAOKAR e SHARON, 1996; TIWARI *et al.*, 2002). Couto *et al.* (2004), estudando a multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., observaram que um maior número médio de brotações por explante (1,2 brotos) ocorreu no meio com a redução de 50% dos sais MS, enquanto o maior comprimento médio de brotações no meio MS foi observado na concentração original de sais. Em outro trabalho, sobre multiplicação *in vitro* da amoreira-preta, realizado por Villa *et al.* (2005), um maior número de folhas (7,89) e brotos (3,99) foi estimulado pelo aumento da concentração de sais de MS. Rocha *et al.* (2007) que avaliaram o número de brotos por explante e rizogênese *in vitro* de *Cabrarea canjerana*, observaram que o meio MS apresentou melhores resultados (1,77 brotos) quando comparado ao WPM (1,12 brotos). No híbrido entre *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* o meio MS proporcionou até 8,8 brotos por explante (BRONDANI, 2008).

Figura 4 - Avaliação de diferentes formulações salinas, WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), JADS (CORREIA, 1993) e MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) na altura das brotações *in vitro* de *Tectona grandis*. Tratamentos seguidos de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

No presente trabalho foi observado que o MS promoveu a obtenção de uma média de 4,0 gemas internodais, seguido pelo meio JADS e WPM com 3,65 e 2,95 gemas respectivamente (Figura 5). Os meios MS e JADS podem ter influenciado na produção de um maior número de gemas laterais por possuírem maior quantidade de Nitrato de potássio (KNO_3), que é citado por Echer et al. (2009) por influenciar uma maior produção de gemas laterais em algodão. Melhores resultados para alongamentos dos brotos e quantidades de gemas, foram observadas por Rogalski et al. (1999) em *Prunus domestica* var. *Kantimirovskaja* quando os explantes foram expostos em maiores concentrações de NO_3^- e NH_4^+ .

Observamos que quando o meio MS foi utilizado, as plântulas apresentaram maiores alturas (7,5 cm) e um número elevado de gemas laterais (4,0 gemas). No meio JADS as plântulas eram menores, com uma média de 6,0 cm (com entrenós curtos) e apresentavam também, um número elevado dessas gemas (3,65 gemas). Já em WPM, essas plântulas possuíam 6,8 cm e

entrenós alongados com menor quantidade de gemas laterais (2,95 gemas). Em louro-pardo (*Cordia trichotoma*) o meio WPM promoveu maiores taxas de multiplicação (63,3 brotos) e alongamento (2,2 cm) dos brotos, em relação a MS (39,7 brotos e 0,98 cm de alongamento) (FRANCO, 2000). Dados similares foram observados em Caixeta (*Didymopanax morototoni*), onde um maior número de brotos (32,5 brotos) e alongamento (1,35 cm) foram também observados em meio WPM. Para *Eucalyptus camaldulensis* o meio MS apresentou uma média de brotos igual a 4,8, enquanto o meio WPM e JADS obtiveram 4,2 e 3,5 brotos respectivamente (QUISEN, 2007), mostrando-se mais eficiente para a espécie.

Figura 5 - Avaliação de diferentes formulações salinas, WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), JADS (CORREIA, 1993) e MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) no número de gemas *in vitro* de *Tectona grandis*. Tratamentos seguidos de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

O meio MS tem sido amplamente utilizado em experimentos de regeneração de plantas *in vitro* de *T. grandis* e tem sido o mais utilizado quando comparado aos meios WPM e B5 (KUSHAOKAR e SHARON, 1996; TIWARI *et al.*, 2002; RAMESH *et al.*, 2003; BAGHEL *et al.*, 2008).

4.3 Organogênese indireta

A organogênese *in vitro* de teca foi estudada em função dos biorreguladores e tipo de explante. Inicialmente foi avaliada a resposta morfogenética em segmentos de epicótilos, cotilédones, nó cotiledonar, hipocótilos e raízes inoculados em diferentes concentrações e combinações de BAP e ANA. Em experimentos subsequentes foi avaliado a aquisição de competência morfogenética com pré tratamento em citocininas (BAP e TDZ) e a organogênese indireta desses explantes em função das combinações de BAP, AIB e GA₃.

4.3.1 Experimento 1: Efeito de BAP e ANA

A análise de variância (Anexos 4 e 5) mostrou significância para os tratamentos e explantes testados. As médias de porcentagem de regeneração estão apresentadas na Tabela 4.

A presença de ANA, nas combinações testadas (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0 mg.L⁻¹) inibiu a formação de brotações nos diferentes explantes utilizados. Entretanto, houve a formação de calos compactos e não morfogênicos, após 60 dias de cultivo. Esses calos tornaram-se necróticos e morreram e uma pequena regeneração ocorreu quando epicótilos foram cultivados em meio suplementado de 2,0 mg.L⁻¹ ANA associado a 3 e 5 mg.L⁻¹ de BAP. Observou-se que para teca, ocorreu formação de gemas adventícias em altas concentrações desses biorreguladores, com taxas de 5,0%.

Em relação aos explantes responsivos, os segmentos de raiz e hipocótilos foram dependentes de altas concentrações de BAP (até 5 mg.L⁻¹). Os resultados obtidos estão de acordo com Barbosa *et al.* (1990) que identificaram alto estímulo das gemas de macieira em meio acrescido de 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹ de BAP. Estes resultados coincidem também com os registrados por Pasqual e Barros (1992), em segmento caulinar de barbatimão (*Strynodendron adstringens* (Mart.)) onde a melhor proliferação de brotos foi observada pelos autores em 4,0 mg.L⁻¹ de BAP. Correia e Graça (1995), em segmentos de caule de acácia negra (*Acacia mearsii* De Wild) obtiveram melhores resultados na presença de 3,0 mg.L⁻¹ de BAP em meio MS.

Tabela 4 - Porcentagem de regeneração de explantes (EPI-epicótilo, HIP- hipocótilo, COT-cotilédones, NC-Nó cotiledonar e RAIZ-raiz) de *Tectona grandis* aos 100 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA

Meios de reg. (mg.L ⁻¹)		Porcentagem de regeneração			Número de brotos/exp. resp.			Altura dos brotos (explante.cm ⁻¹)		
-----		-----			-----			-----		
BAP	NAA	EPI	HIP	RAIZ	EPI	HIP	RAIZ	EPI	HIP	RAIZ
0	0	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
1.0	0	10,0Aa	0,0Db	0,0Cb	1,0Ba	0,0Db	0,0Bb	1,0Aa	0,0Bb	0,0Bb
2.0	0	0,0Cb	10,0Ba	0,0Cb	0,0Cb	2,0Ba	0,0Bb	0,0Bb	1,4Aa	0,0Bb
3.0	0	0,0Cc	30,0Aa	10,0Bb	0,0Cb	4,0Aa	4,0Aa	0,0Bb	1,0Aa	1,0Aa
4.0	0	5,0Bb	10,0Ba	10,0Ba	1,0Bb	2,5Ba	3,0Aa	0,7Aa	1,0Aa	1,0Aa
5.0	0	5,0Bb	5,0Db	60,0Aa	1,0Bb	1,0Cb	4,0Aa	1,0Aa	1,0Aa	1,0Aa
10.0	0	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
0	0.5	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
1.0	0.5	5,0Ba	0,0Db	0,0Cb	4,0Aa	0,0Db	0,0Bb	1,0Aa	0,0Bb	0,0Bb
2.0	0.5	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
3.0	0.5	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
4.0	0.5	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
5.0	0.5	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
10.0	0.5	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
0	2.0	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
1.0	2.0	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
2.0	2.0	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
3.0	2.0	5,0Ba	0,0Db	0,0Cb	1,0Ba	0,0Db	0,0Bb	1,0Aa	0,0Bb	0,0Bb
4.0	2.0	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba
5.0	2.0	5,0Ba	0,0Db	0,0Cb	1,0Ba	0,0Db	0,0Bb	1,0Aa	0,0Bb	0,0Bb
10.0	2.0	0,0Ca	0,0Da	0,0Ca	0,0Ca	0,0Da	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba	0,0Ba

Médias seguidas por mesma letra maiúscula nas colunas e, médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, respectivamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Uma maior taxa de regeneração em hipocótilos e raiz está ligada as células do procambio, as quais apresentam alta capacidade meristemática e alto potencial morfogenético (GEORGE et al., 2007). Esses explantes apresentam traços de uma zona de transição da raiz para hipocótilo, ocorrendo um arranjo dos tecidos vasculares (ESAU, 1974). Essas mudanças na disposição dos tecidos vasculares sugerem complexas mudanças na distribuição hormonal (SIEBERER et al., 2003) e fazem destes, explantes promissores para eventos organogenéticos (ASCOUGH et al., 2009).

A quantidade de brotações observadas em raiz e hipocótilo em meio de cultura acrescido de 2,0 a 5,0 mg.L⁻¹ de BAP não foram significativas, contudo apresentaram até 4,0 brotos por explante responsivo em meios com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP. Arello e Pinto (1993), utilizando 5 mg.L⁻¹ de BAP em segmentos nodais de pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Martius) obtiveram até 6,3 brotos por explante. Em outra espécie arbórea, o *Schizolobium amazonicum* uma taxa de 2,14 brotos foram obtidos em doses de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP, indicando que na maioria das vezes para arbóreas, maiores doses de citocininas são indicadas (CORDEIRO et al., 2004). Bravo et al. (2008) obtiveram regenerações de até 60% em hipocótilos de *Eucalyptus grandis* quando cultivados em meio JADS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ ANA + 0,5 mg.L⁻¹ BAP.

Dentre as citocininas, o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies lenhosas. Alguns autores sugerem que essa citocinina é a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (HU e WANG, 1983). O BAP estimula a multiplicação de brotações e liberação de gemas auxiliares inibidas pela dominância apical. Os dados obtidos são concordantes com as afirmações de Barbosa et al. (1990) que identificaram ótimo estímulo ao desenvolvimento das gemas de macieira, em meio MS acrescido de BAP com as concentrações de 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹.

As combinações de biorreguladores apresentados na Tabela 4 não mostraram diferenças significativas sobre a altura das brotações. A amplitude desses brotos foi realmente bem pequena (0,7 a 1,4 cm), apresentando homogeneidade para o tamanho das brotações obtidas. Nota-se que, as maiores brotações atingiram uma média de 1,4 cm em hipocótilos a uma concentração de 1 mg.L⁻¹ de BAP. A diminuição do comprimento da brotação pode estar ligada ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas até determinada concentração (variando com a espécie) e, a partir desta, ocorre efeito tóxico que se caracteriza pela falta de alongamento

das culturas (GARTTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ROGALSKI et al., 2003). Os sintomas, segundo os mesmos autores, que mais caracterizam a toxidez por citocinina são: a falta de alongamento das brotações, a redução no tamanho das folhas, o encurtamento nos entrenós, o engrossamento excessivo dos caules e hiperhidricidade generalizada das plântulas.

A partir das interações de BAP e ANA utilizadas nesse experimento, não obtivemos altas porcentagens de regeneração para dar início aos protocolos de transformação. Com o intuito de potencializar o processo de regeneração e com isso abrir um amplo leque de explantes e meios e cultura a serem utilizados nos protocolos de transformação genética da espécie, montamos outros experimentos, itens 4.3.2 e 4.3.3. Esses próximos experimentos contam com: a) a aplicação de biorreguladores no meio de germinação das sementes, induzindo assim, a aquisição da competência organogenética dos explantes e b) combinações de BAP, AIB e GA₃ na regeneração de plantas.

4.3.2 Experimento 2- Influência do pré tratamento com BAP e TDZ na indução da competência organogenética de diferentes explantes

A presença dos biorreguladores BAP ou TDZ influenciou significativamente a germinação de teca (Anexo 6 e Tabela 5).

Tabelas 5 - Médias da porcentagem de germinação de sementes de *T. grandis* influenciadas pelos biorreguladores BAP e TDZ

Tratamento	Sementes inoculadas	Germinação
		------(%)-----
Controle (isento de regulador)	890	52 A
0,1 BAP	1090	39 BC
0,5 BAP	1123	30 C
0,1 TDZ	860	46 AB
0,5 TDZ	920	41 B
Média	4883	42

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

BAP ou TDZ alteraram significativamente o número de sementes germinadas. A germinação das sementes foi ligeiramente inibida nos meios com presença de biorreguladores,

como mostrado na Figura 6. O uso de BAP ou TDZ na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ foram os que mais afetaram a germinação. As sementes germinadas na presença de BAP e TDZ, não apresentaram epicótilos e nem clara distinção entre a zona de transição do hipocótilo e raiz (até os 20 dias). Por isso, foram utilizados apenas segmentos de cotilédones, nós cotiledonares e hipocótilos nos meios de regeneração.

Figura 6 - Diferenças morfológicas no desenvolvimento de plântulas de *Tectona grandis* germinadas *in vitro* em meio MS acrescido de citocininas após os 20 dias. A- Plântula germinada em meio MS ; B- Plântula germinada em MS + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; C- Plântula germinada em MS + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; D- Plântula germinada em MS + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ; e- Plântula germinada em MS + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ. Barra=1cm

Em nossos resultados, observamos que as citocininas influenciaram negativamente a germinação. Entretanto, esse tipo de hormônio é citado por estimular a germinação, pois minimizam os efeitos dos inibidores como o ABA e jasmonato de metila na semente (SINGH e SAWHNEY, 1992; BIALECKA e KEPCZYNSKI, 2003). Há muitos relatos de citocininas diretamente envolvidos nos eventos de germinação, como, crescimento da radícula, hipocótilo e síntese de clorofila (SINGH e SAWHNEY, 1992). Entretanto, não há provas conclusivas ou indicações de que citocininas estão diretamente envolvidas no processo (del POZO et al. 2005).

Esse efeito contrário observado na germinação de sementes de teca pode estar relacionado pelo elevado tempo (20 dias) que essas sementes ficaram expostas a citocininas.

Houve inibição das raízes e epicótilos na presença de BAP e TDZ aos 20 dias de germinação. No caso da inibição nas raízes, muitos autores citam a interferência negativa das citocininas no alongamento. Em *Arabidopsis*, por exemplo, essa inibição ocorre pela presença de três sinalizadores (histidina kinase- AHK2, AHK3, e CRE1/AHK4), principalmente o CRE1/AHK4 presente nas células do cilindro vascular e periciclo da raiz (RIEFLER et al., 2006; MÄHÖNEN et al., 2000; HIGUCHI et al., 2004) que percebem as citocininas exógenas, enviando sinais para o núcleo e dessa forma inibindo a expressão de genes para o crescimento da raiz. Paiva (2001) mostraram que o uso de BAP inibe o desenvolvimento da radícula, independentemente da cultivar de café, sendo que uma melhor porcentagem de germinação pode ser obtida quando o meio de cultura é desprovido de BAP, corroborando assim com os nossos resultados.

A ausência de epicótilos até os 20 dias pode ter ocorrido pela quebra da dominância apical em função das doses exógenas de citocininas, desbalanceando os níveis endógenos desse hormônio. Os explantes foram utilizados com 20 dias de idade, pois nesse período as plântulas apresentavam partes bem diferenciadas (hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone) e jovens o suficiente para a indução da organogênese. A idade da planta e o grau de diferenciação dos tecidos interferem no efeito da organogênese *in vitro*. O tamanho e o grau de desenvolvimento de certos órgãos, especialmente cotilédones, hipocótilo e epicótilo dependem da idade da planta, ou seja, quanto mais velho, mais diferenciado o tecido estará e, com isso, a capacidade organogenética estará sendo prejudicada (GEORGE et al., 2007).

O pré tratamento foi utilizado para a indução da competência organogenética dos tecidos. O pré tratamento com TDZ é citado como sendo mais eficiente que o com BAP na indução de regeneração em muitas espécies (PRATHANTURARUG et al. 2003; 2005). Entretanto, estudos histológicos mostram que tanto o BAP quanto o TDZ são potenciais indutores de células com atividade meristemática em diferentes explantes (THOMAS, 2007; SAN-JOSE et al. 2001; KUCHARSKA e ORLIKOWSKA, 2009).

4.3.3 Experimento 3- Efeito de BAP, AIB e GA₃

A análise de variância para as três variáveis analisadas (Meios de germinação x Meios de regeneração x Explante) diferiu significativamente (Anexos 7, 8 e 9). Na Tabela 6, são mostrados os resultados do teste de Tukey para comparação de médias. As médias de regeneração mostram que a presença das citocininas BAP ou TDZ, durante a germinação influenciou de forma positiva a regeneração.

Hipocótilo, cotilédone e nó cotiledonar apresentaram diferenças significativas para porcentagem de regeneração, bem como no número de brotos por explantes responsivos e altura. Essas diferenças podem ter sido ocasionadas pela competência organogenética de cada um dos explantes. Hipocótilo e nó cotiledonar apresentaram maior potencial para regeneração, pois novas plantas são formadas a partir de células do parênquima, associadas aos tecidos vasculares (MIRANDA *et al.* 1999), conforme já discutido anteriormente.

O TDZ e o BAP são excelentes indutores de regeneração em plantas arbóreas, (BHAGWAT e LANE 2004; GIRI *et al.*, 2004). O pré tratamento na germinação de sementes e as concentrações dos reguladores vegetais BAP, GA₃ e AIB utilizadas neste estudo propiciaram um aumento na formação de brotos.

Alta variabilidade genética foi encontrada entre famílias e dentro de famílias em *Eucalyptus grandis* quanto à capacidade de formação de gemas (BRAVO *et al.* 2008; SOBROSA e CORDER, 2003) e habilidade de enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* (RUAUD *et al.* 1999). Dessa forma pode-se aferir que em nosso trabalho, cada plântula agiu geneticamente independente de sua “irmã”, dificultado assim a visualização de um padrão de regeneração. No entanto, esse efeito foi minimizado pelo uso de citocininas na germinação.

Independentemente do meio de germinação, após o período que os explantes permaneceram no escuro (Sete dias) eles apresentaram intumescimento, porém nenhuma estrutura como gemas ou calos foi formada. Na ausência de BAP, AIB e GA₃ não houve proliferação de gemas axilares e, após 20 dias, todos os explantes ficaram necrosados, indicando, portanto, a necessidade destes reguladores para a manutenção dos explantes e regeneração *in vitro* de teca. Foi observado aumento de 34% na frequência de regeneração quando se utilizou BAP e TDZ na germinação em relação ao controle. Os explantes obtidos de plantas germinadas em meio controle, regeneraram plantas em apenas 8 tratamentos. Quando os explantes foram

obtidos de plantas germinadas nas duas doses de BAP, observamos uma média de resposta organogênica em 27,5 meios e 28 meios para a germinação dos explantes nas concentrações de TDZ (Tabela 6).

Para hipocótilo observou-se aumento de 19% na regeneração quando os explantes foram obtidos de plântulas germinadas em 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de TDZ quando comparados ao controle. Foi observado em nó cotiledonar um incremento de 37% na eficiência de regeneração quando obtidos de plântulas germinadas em 0,1 mg.L⁻¹ de BAP em relação ao controle. No entanto, observou-se aumento de 27% na regeneração dos explantes germinados em 0,5 mg.L⁻¹ de BAP em relação a 0,1 mg.L⁻¹ de BAP.

Para cotilédones não foi observado regeneração em explantes obtidos de plântulas germinadas em meio controle e MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP. Validando mais uma vez os dados obtidos no primeiro experimento indicando que o pré tratamento é necessário para a indução do desenvolvimento de gemas adventícias. Entretanto, quando os explantes foram obtidos de plântulas germinadas em 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, observamos que os tratamentos com 1 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ AIB + 0,5 mg.L⁻¹ GA₃ e 1 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ GA₃, apresentaram 10% de regeneração. Para sementes germinadas em 0,1 mg.L⁻¹ TDZ e 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ, tivemos 25% e 31% dos tratamentos regenerando plantas. Fica evidente que houve influência pelo BAP e, principalmente, TDZ nas taxas de regeneração em cotilédones.

Tabela 6- Porcentagem de regeneração de nó cotiledonar (N), cotilédone (C) e hipocótilo (H) de *Tectona grandis* quando germinados em meio MS sem biorreguladores e suplementado com diferentes concentrações de citocininas (BAP e TDZ) em função do meio de regeneração e após 80 dias de cultura

Meios de regeneração			Meios de germinação (mg.L ⁻¹)														
(mg.L ⁻¹)			MS			0,1BAP			0,5BAP			0,1TDZ			0,5TDZ		
BAP	AIB	GA ₃	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H
0	0	0	0Aa	0Aa	0Ca	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Ca	0Ca	0Ba	0Ba	0Aa	0Ba
1	0	0	0Aa	0Aa	0Ca	0Ab	0Ab	15Aa	0Ab	0Ab	15Aa	15ABCa	0Cc	5 ABb	20ABa	0Ab	20ABa
3	0	0	0Ab	0Ab	30Aa	0Ab	0Ab	20Aa	10Aa	0Ab	5 Aa	20ABCa	0Cb	0Bb	15ABa	5 Ab	15ABa
5	0	0	0Ab	0Ab	10BCa	0Ab	0Ab	20Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Cc	10Ba	5 Bb	0Bb	20Aa	15ABa
0	0,5	0	0Aa	0Aa	0Ca	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Ca	0Ca	0Ba	0Ba	0Aa	0Ba
1	0,5	0	0Ab	0Ab	20ABa	15Aa	0Ab	0Ab	15Ab	0Ac	30Aa	45Aba	0Cb	40ABa	30ABa	10 Ab	0Bc
3	0,5	0	0Aa	0Aa	0Ca	20Aa	0Ab	30Aa	25Aa	0Ab	30Aa	25ABCa	0Cb	15ABa	25ABa	0Ab	30ABa
5	0,5	0	0Ab	0Ab	20ABa	0Ab	0Ab	30Aa	0Ab	0Ab	20Aa	5 BCb	0Cc	15ABa	0Bb	10Aa	10ABa
0	0,5	0,5	0Aa	0Aa	0Ca	0Ab	0Ab	10Aa	0Ab	0Ab	5Aa	10BCa	0Cb	0Bb	40ABa	0Ab	40ABa
1	0,5	0,5	0Ab	0Ab	10ABCa	0Ab	0Ab	25Aa	10Ab	10Ab	25Aa	55Aa	30Ab	25ABb	55Aa	0Ab	40ABa
3	0,5	0,5	0Aa	0Aa	0Ca	0Aa	0Aa	0Aa	10Aa	0Ab	0Ab	15ABCa	0Cb	20ABa	40ABa	0Ac	15ABb
5	0,5	0,5	0Aa	0Aa	0Ca	10Ab	0Ac	25Aa	20Aa	0Ab	20Aa	20ABCa	0Cb	20ABa	20ABa	0Ac	5 ABb
0	0	0,5	0Aa	0Aa	0Ca	10Aa	0Ab	0Ab	20Aa	0Ab	25Aa	10ABCa	10Ba	0Bb	20ABa	0Ac	10ABb
1	0	0,5	0Ab	0Ab	5 BCa	0Ab	0Ab	15Aa	0Ac	10Ab	20Aa	15ABCb	0Cc	60Aa	70Aa	15Ab	55Aa
3	0	0,5	0Ab	0Ab	5 BCa	15Ab	0Ac	25Aa	25Aa	0Ab	0Ab	20ABCa	30Aa	15ABab	15ABb	0Ac	40ABa
5	0	0,5	0Ab	0Ab	5 BCa	10Ab	0Ac	20Aa	0Ab	0Ab	20Aa	15ABCb	0Cc	30ABa	40ABa	0Ab	35ABa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula nas colunas e, médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, respectivamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Semelhantemente aos nossos resultados, Thomas (2007) verificou um aumento de 50% no processo de regeneração *in vitro* em cúrcuma (*Curculigo orchioides*), quando as folhas foram submetidas a pré tratamento com 5,0 mg.L⁻¹ de TDZ antes da inoculação no meio de regeneração. O TDZ pode promover a síntese e o acúmulo de purinas no tecido excisado como também alterar o metabolismo de citocininas, aumentando assim, seus níveis endógenos. Esse mecanismo é ativado, porque o TDZ age inibindo a ação da citocinina oxidase, deixando assim, os níveis de citocininas endógenos mais elevados e promovendo maiores taxas de regeneração de plantas (HARE e VAN STADEN, 1994; MURTHY *et al.*, 1998). Murthy et al. (1998) também comenta sobre a capacidade do TDZ em alterar o metabolismo endógeno reguladores de crescimento como etileno e ABA, facilitando assim os processos morfogênicos.

Kucharska e Orlikowska (2009) discutem que a capacidade de regeneração com explantes submetidos ao pré tratamentos, dependem significativamente do tipo de citocinina utilizada. Murthy et al. (1998) afirmam que para plantas recalcitrantes, como muitas espécies lenhosas, o TDZ é a melhor citocinina na indução de regenerantes. Em *Castanea sativa* o pré tratamento com 1 mg.L⁻¹ de BAP foi significativamente melhor que 0,1 mg.L⁻¹ TDZ (SAN-JOSE et al. 2001). Em amora e maçã, o pré cultivo em TDZ aumentaram a porcentagem de regeneração (SWARTZ et al., 1990; SRISKANDARAJAH e GOODWIN, 1998). Srisankandarajah e Goodwin (1998) discutem que a eficiência de transformação genética aumentou em explantes tratados com TDZ, pois a porosidade da parede celular, a densidade do citoplasma e vacúolo aumentou, facilitando o processo. Dessa forma podemos enfatizar a importância do TDZ como citocinina para o processo de organogênese (IBRAHIM e DEBERGH, 2001).

Em relação ao aspecto hormonal, os reguladores de crescimento presentes no meio de cultura direcionam não só o desenvolvimento da planta, mas também o sucesso do cultivo. Entre os reguladores de crescimento utilizado no cultivo *in vitro*, Gonçalves (2002) afirma que o BAP (6- benzilaminopurina) é o que, em geral, apresenta melhores resultados.

Baghel *et al.* (2008) observaram regeneração em teca com eficiência de 62% utilizando cotilédones e 69% com nó cotiledonar sem pré tratamentos. Esses dados são conflitantes com a presente pesquisa, uma vez que em aproximadamente 58 tratamentos utilizados neste trabalho não apresentaram nenhum resquício de regeneração nessas estruturas quando são obtidas de plântulas germinadas em MS.

Na regeneração de segmentos de cotilédone e explantes não responsivos de hipocótilo, as maiores concentrações de BAP, sem a interação com outros reguladores, foi observado calos compactos, verdes escuros e não organogênicos. A iniciação dessa estrutura ocorreu por volta dos 14 dias de cultivo e permaneceu até os dois meses de cultura *in vitro* (explantes foram transferidos a cada 20 dias), após dois meses, ocorreu necrose do tecido. A formação de gemas se iniciou aos 18 dias de cultivo em meios com presença de BAP (3,0 e 5,0 mg.L⁻¹) e ausência de outros biorreguladores.

Nos tratamentos onde apenas o AIB estava presente, os calos iniciaram por volta dos 15 dias, primeiramente nas partes expostas ao meio, e possuíam coloração amarronzada, friáveis e não morfogênicos. Em alguns casos, foi observada a presença de raízes; esses calos não permaneceram por muito tempo em cultura, sendo eliminados após 30 dias por estarem necrosados. Para meios com concentrações de AIB + GA₃ e ausência de BAP, os calos possuíam aspecto verdes claros e friáveis, sem qualquer característica morfogenética, além de serem gelatinosos. Permaneceram por volta de 30 dias em cultivo e aos 35-40 dias estes apresentaram escurecimento na parte basal, necrosando aos 50-60 dias.

Os tratamentos com altas doses de BAP (3,0 e 5,0 mg.L⁻¹) e presença de AIB e GA₃, influenciaram o desenvolvimento de calos verdes claros, compactos e em alguns casos, regeneração de plantas. Respostas morfogênicas foram observadas no décimo quinto dia de cultivo para o meio 3,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ AIB + 0,5 mg.L⁻¹ GA₃ e 5 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ AIB + 0,5 mg.L⁻¹ GA₃ em hipocótilo e nó cotiledonar, com o espessamento dos tecidos e a formação de massas celulares nas zonas de presença de tecido de condução (vasos). Gemas adventícias foram observadas nessas zonas e após 20 dias, plântulas já eram diferenciadas, nos explantes responsivos.

Os calos dos tratamentos com presença de 1 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ AIB + 0,5 mg.L⁻¹ GA₃, apresentaram consistência friável e compacta na mesma estrutura e sem a presença de gemas. Após 60 dias de cultivo os calos que não apresentaram nenhuma resposta morfogenética, começaram formar gemas (Figura 7a, b) e em torno de 80 dias as plantas já apresentavam em média 5,0 mm (Figura 7c).

Figura 7- Organogênese indireta em *Tectona grandis*, gemas adventícias sendo formadas *in vitro* em calos com 60 dias em cultivo em meio MS+1mg.L⁻¹ de BAP+0,51mg.L⁻¹ de GA₃. a- Calo friável com características morfogênicas (barra=1cm), b- gema adventícia em início de desenvolvimento e c- plântula já apresentando nós e entrenós (barra 5mm). Seta mostrando a formação de gemas e brotos

Em 100% dos calos que regeneraram plantas, foi observado o desenvolvimento de tricomas na superfície do tecido. Esses tricomas podem ser caracterizados como marcador morfológico dos tecidos organogênicos. Os tricomas em teca apresentam alta concentração de fenóis, dando a essa estrutura uma coloração avermelhada, bem típica da espécie (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2004), sendo assim de fácil visualização, podendo ser então utilizado como forma de escolhas de tecido morfogênético.

Não houve diferenças visuais aparentes no aspecto dos calos entre os explantes e nem mesmo entre os diferentes meios de germinação. Em *Acer pseudoplatanus* o TDZ foi mais eficiente na produção de calos e posterior regeneração de gemas adventícias (WILHELM, 1999). Conforme discutido, o melhor desempenho do TDZ, aparentemente, pode estar relacionado à maior atividade citocinínica ou a forma de ação diferente de outras citocininas durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular, como também ao fato de o TDZ induzir a acumulação de auxinas e citocininas endógenas do tecido (MURTHY *et al.*, 1998). Este balanço pode então, favorecer a organogênese em teca.

A influência positiva de TDZ e BAP na germinação das sementes e consecutivo sucesso na regeneração de plantas têm sido demonstrados, principalmente em soja, leguminosas não arbóreas, Rosa sp, e cinamomo (KONG *et al.*, 2009; KUCHARSKA e ORLIKOWSKA, 2009; SHAN *et al.*, 2005). Em geral a influência do pré tratamento na germinação potencializa a organogênese *in vitro* em estruturas como nó cotiledonar, hipocótilos e outros explantes, induzindo a competência organogenética do tecido (SHAN *et al.*, 2005).

Em *Arabidopsis thaliana* a formação de brotos também envolve uma indução de competência organogenética do tecido. Inicialmente explantes radiculares são incubados em meio $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ de Kin (cinetina) + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) por quatro dias e transferidos para meio com 1 mg.L^{-1} de 2-iP (isopenteniladenina) e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (ácido 3-indolacético) para a formação de gemas adventícias e formação de brotações. Os fatores moleculares responsáveis para aquisição de competência organogenética, ainda não são entendidos. Entretanto, em nível celular essa competência é adquirida quando células do periciclo sofrem uma única divisão periclinal, induzindo assim, a formação das gemas adventícias (HOWELL *et al.*, 2003).

Carmen *et al.* (2001) mostraram histologicamente que a aplicação de citocininas exógenas alteraram o desenvolvimento de meristemas axilares promovendo a proliferação das células meristemáticas e o aumento do número de primórdios de gemas que se originam a partir do meristema axilar já presente.

Não foram observadas diferenças significativas para os três diferentes explantes na porcentagem de plantas regeneradas nos 16 tratamentos, quando as sementes foram germinadas nas concentrações de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Maiores taxas de regeneração foram observadas em explantes obtidos de sementes germinadas em $0,1$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ, sugerindo que o TDZ possui uma maior capacidade de induzir a organogênese de hipocótilos, nós e cotilédones de teca. Resultados similares foram encontrados para explantes cotiledonares por Sujatha *et al.* (2008) em *Pongamia pinnata*, onde maiores concentrações de TDZ potencializaram maiores taxas de regeneração dos cotilédones.

Houve certa tendência à regeneração nos meios que apresentavam baixas doses de BAP em conjunto com o GA_3 , provavelmente os meios com maiores doses de BAP, os níveis exógenos do biorregulador interagindo com o nível endógeno de citocinina, causaram efeito de supressão de regeneração. Interessante ressaltar que no caso do tratamento controle na germinação, os hipocótilos apresentaram maior regeneração nos meios com maiores concentrações de BAP, e nos tratamentos com germinação em BAP e TDZ, esse mesmo explante apresenta melhores resultados doses de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Isso aconteceu para a maioria dos explantes, sugerindo um efeito residual do pré tratamento com TDZ e BAP na regeneração.

Houve diferenças significativas ($p < 1\%$) entre os meios de regeneração em relação a número de brotações (Anexo 8). As médias de número de brotos mostram que a presença de BAP

e TDZ no momento da germinação influenciou maior número de brotações, sendo significativo estatisticamente, como aconteceu para frequência de regeneração. Os dados médios para número de brotações estão apresentados na Tabela 7.

A maior média de número de brotações (7,3) foi observada em hipocótilo no tratamento de 1 mg.L^{-1} BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ GA₃ e com pré tratamento de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Nesse mesmo pré tratamento e também em hipocótilo, foi onde observamos um maior número de brotações (4,15), quando comparados aos demais pré tratamentos.

Paiva Neto *et al.* (2003), no cultivo *in vitro* de hipocótilos de *Bixa orellana* e, Singh *et al.* (2002) em regeneração de hipocótilos de *Psidium guajava*, mostraram que elevadas concentrações de BAP promoveram redução no percentual de explantes com brotações. No presente estudo não foi constatada essa influência para número de brotos em teca, uma vez que obtivemos até 5,5 brotos por explante responsivo em hipocótilos em meios com 5 mg.L^{-1} de BAP.

Os cotilédones foram muito heterogêneos e responderam a diferentes meios de regeneração, entretanto o meio com maior número de brotos foi na interação de 1 mg.L^{-1} de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA₃ germinados em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ. Houve pouca influência de AIB na organogênese em cotilédones. Concentrações de BAP de 5 mg.L^{-1} resultando em efeitos positivos quanto à proliferação de gemas e regeneração em brotos. Para Nim (*Azadirachta indica*), explantes cotiledonares cultivados em altas doses de ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) de BAP promoveram a maior formação de calos com potencial morfogênico (RODRIGUES *et al.* 2009). O pré tratamento em $0,1$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ foram os que mais influenciaram a regeneração de cotilédones nos tratamentos testados (Tabela 7). Um média de 2,25 e 2,14 brotos foi observada nesses dois pré tratamentos, respectivamente.

Tabela 7 - Valores médios do número de brotações de nó cotiledonar (NC), cotilédone (COT) e hipocótilo (H) de *Tectona grandis* germinados em meio MS sem biorreguladores e suplementado com diferentes concentrações de citocininas (BAP e TDZ), após 80 dias de cultura

Meios de regeneração			Meios de germinação (mg.L ⁻¹)														
			MS			0,1BAP			0,5BAP			0,1TDZ			0,5TDZ		
(mg.L ⁻¹)																	
BAP	AIB	GA ₃	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H
0	0	0	0 Aa	0Aa	0Ea	0Ca	0Aa	0Ga	0Fa	0Ca	0Ea	0Ca	0Aa	0Da	0Ea	0Ca	0Fa
1	0	0	0 Aa	0Aa	0Ea	0Cb	0Ab	2,3EFa	0Fb	0Cb	1,7Da	3,5 Aa	0Ab	1,0Cab	2,7ABCa	0Cb	2,3Da
3	0	0	0 Ab	0Ab	5,7 Aa	0Cb	0Ab	4,3Ca	2,0CDB	0Cc	3,5BCa	2,3ABa	0Ab	0Db	2,0BCDa	2,0Ca	2,0Da
5	0	0	0 Ab	0Ab	1,5 Da	0Cb	0Ab	2,3Fa	0Fa	0Ca	0Ea	0Cb	2,0Ab	4,0Ba	0Eb	2,7Aa	2,0Da
0	0,5	0	0Aa	0Aa	0Ea	0Ca	0Aa	0Ga	0Fa	0Ca	0Ea	0Ca	0Aa	0Da	0Ea	0Ca	0Fa
1	0,5	0	0Ab	0Ab	2,3 Ca	1,0 Ba	0Ab	0Gb	5,5Aa	0Cc	3,0Cb	2,5ABb	0Ac	4,0Ba	1,6CDa	1,0Bb	0Fc
3	0,5	0	0Aa	0Aa	0Ea	2,5 Ab	0Ac	3,7CDEa	2,2Cb	0Cc	4,0ABa	1,5ABb	0Ac	4,3Ba	2,0BCDB	0Cc	3,0Ca
5	0,5	0	0Ab	0Ab	5,0Aba	0Cb	0Ab	4,5BCa	0Fb	0Cb	3,7BCa	1,0BCb	0Ac	2,7Ba	0Ec	1,0Ba	1,0DEa
0	0,5	0,5	0Aa	0Aa	0Ea	0Cb	0Ab	3,5CDa	0Fb	0Cb	3,0Ca	1,0BCa	0Ab	0Db	4,0Aa	0Cb	5,0BCa
1	0,5	0,5	0Ab	0Ab	3,5Ba	0Cb	0Ab	2,5DEFa	1,0 Eb	1,0Bb	2,3Da	3,2ABb	2,5Ac	4,8Ba	2,4ABCb	0Cc	5,0BCa
3	0,5	0,5	0Aa	0Aa	0Ea	0Ca	0Aa	0Ga	1,5DEa	0Cb	0Eb	2,5ABa	0Ab	3,7Ba	2,7ABCa	0Cc	1,0DEb
5	0,5	0,5	0Aa	0Aa	0Ea	1,0Bb	0Ac	5,5Ba	2,0CDB	0Cc	3,3BCa	1,3ABCb	0Ac	3,7Ba	2,0BCDa	0Cc	1,0DEb
0	0	0,5	0Aa	0Aa	0Ea	1,0Ba	0Ab	0Gb	3,0Bb	0Cc	5,0Aa	0Ca	1,5Ab	0Da	1,3CDa	0Cb	1,0DEa
1	0	0,5	0Ab	0Ab	1,0Da	0Cb	0Ab	6,9Aa	0Fc	3,0Ab	5,0Aa	1,3ABCb	0Ac	7,0Aa	3,2ABb	4,0Ab	7,0Aa
3	0	0,5	0Ab	0Ab	1,0Da	1,5Bb	0Ac	4,5BCa	1,7CDa	0Cb	0Eb	3,3Aa	3Ab	3,0Ba	1,0Db	0Cc	5,0BCa
5	0	0,5	0Ab	0Ab	1,0Da	1,0Bb	0Ac	5,3Ba	0Fb	0Cb	3,5BCa	2,0ABb	0Ac	4,3Ba	2,0BCDB	0Cc	5,5ABa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula nas colunas e, médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, respectivamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os melhores resultados em hipocótilos (Figura 8) foram observados na interação $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 (em pré tratamentos com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ), apresentando uma média de 7,0 brotos por explante responsivo. No caso de nó cotiledonar, a interação foi em 1 mg.L^{-1} de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, com média de 3,2 brotos (em pré tratamentos com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ).

Figura 8- Morfologia de explantes hipocotiledonares obtidos de plântulas com 20 dias de germinação e regenerados em meio MS acrescido de 1 mg.L^{-1} de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 com 30 dias. a) MS, b) MS + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, c) MS + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, d) MS + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ e e) MS + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ. Barra= $0,5 \text{ cm}$

Neste estudo a regeneração de teca a partir de segmentos cotiledonares ocorreu também por organogênese indireta, os explantes inoculados em meio para regeneração apresentaram, após o período de escuro, certo intumescimento na base do pecíolo e, em média após 20 dias, as primeiras gemas já eram evidentes (Figura 9). Elas iniciaram como pequenos pontos esverdeados juntamente a área expostas ao meio de cultura e, após 25 dias, pequenas folhas já eram evidentes. Resultados similares foram obtidos por Kucharska e Orlikowska (2009) em *Rosa spp*, onde o

pecíolo alargava-se apresentando um maior número de vasos condutores, os quais possuem uma maior quantidade de células meristemáticas.

Figura 9- Processo de regeneração em cotilédone de teca. a) Segmento cotiledonar obtido de plântula germinada em $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ aos 20 dias da germinação. b) Segmento de cotilédone em meio de regeneração (3 mg.L^{-1} de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3) aos 20 dias de cultivo. c) Segmento de cotilédone em processo de regeneração (30 dias de cultivo) e d) Segmento de cotilédone em processo de regeneração (50 dias de cultivo). Barra branca= $\pm 1 \text{ cm}$; Barra preta= $\pm 3 \text{ cm}$; seta preta= Base de inserção do pecíolo; setas brancas= gemas sendo formadas

Os explantes de cotilédones oxidaram com mais frequência havendo a necessidade de um maior número de transferência que os demais explantes.

Houve influência do pré tratamento na germinação e dos tratamentos para regeneração também para altura das brotações. Ocorreram diferenças significativas ($p < 0,01$) (Anexo 9) para altura dos explantes e suas médias estão apresentadas na Tabela 8. Uma amplitude de 0,4 a 4,0 cm foi observada na elongação das brotações. As menores alturas foram observadas no meio de

cultura com 5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e no pré tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ e as maiores alturas foram observadas em 1 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃, tanto para pré tratamentos em 0,5 mg.L⁻¹ de BAP quanto para 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ. Essas maiores alturas no tratamento (1 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃) podem estar relacionadas ao efeito do ácido giberélico (GA₃), influenciando o aumento do comprimento das brotações. Sabe-se que o ácido giberélico atua como regulador da divisão e alongamento das células (TAKAHASHI *et al.*, 1988). Uma menor altura de explantes tratados com doses relativamente altas de BAP é citado por Silva et al. (2003) em *Prunus*. Esses autores demonstraram que em doses de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP as plantas possuíam uma média de 8,8 mm, passando para 5,8 mm na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ do biorregulador. Resultados similares da interação entre BAP e alongamento das brotações foram constatados por Leontiev-Orvov et al. (2000a; 2000b), onde os autores citam uma diminuição de 55% no tamanho das brotações com o aumento de BAP no meio de cultura.

Tabela 8- Valores médios da altura das brotações regeneradas de nó cotiledonar (N), cotilédone (C) e hipocótilo (H) de *Tectona grandis* germinados em meio MS sem biorreguladores e suplementado com diferentes concentrações de citocininas (BAP e TDZ) , após 80 dias de cultura

Meios de regeneração			Meios de germinação (mg.L ⁻¹)														
			MS			0,1BAP			0,5BAP			0,1TDZ			0,5TDZ		
(mg.L ⁻¹)																	
BAP	AIB	GA ₃	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H
0	0	0	0 Aa	0 Aa	0 Ba	0 Ca	0 Aa	0 Ca	0 Da	0Ca	0 Da	0 Ea	0Ba	0Ea	0Ea	0 Ca	0Da
1	0	0	0 Aa	0 Aa	0 Ba	0 Cb	0 Ab	1,17ABa	0 Db	0Cb	1,7Aa	1,8ABb	0Bc	2,3Aa	1,3BCa	0Cb	1,0Ba
3	0	0	0 Ab	0 Ab	1,07Aa	0 Cb	0 Ab	1,0Ba	1,5Ba	0Cb	1,0Ba	1,3BCDa	0Bb	0 Eb	1,0CDa	2,0Ba	1,0Ba
5	0	0	0 Ab	0 Ab	1,0Aa	0 Cb	0 Ab	1,0Ba	0Da	0Ca	0 Da	0Ec	2,2Aa	1,8ABb	0Eb	1,7Ba	1,0Ba
0	0,5	0	0Aa	0 Aa	0 Ba	0 Ca	0 Aa	0 Ca	0Da	0Ca	0 Da	0Ea	0Ba	0Ea	0 Ea	0Ca	0Da
1	0,5	0	0Ab	0 Ab	1,0 Aa	1,3Aa	0 Ab	0 Cb	2,0Aa	0Cb	1,0Bb	1,4BCDa	0Bb	1,4BCDa	1,0CDa	2,0Ba	0Db
3	0,5	0	0 Aa	0 Aa	0 Ba	1,3Aba	0 Ac	1,0Bb	1,3BCa	0Cb	1,7Aa	1,3CDa	0 Bc	1,0Db	1,3BCa	0Cb	1,3ABa
5	0,5	0	0 Ab	0 Ab	1,0 Aa	0 Cb	0 Ab	1,3ABa	0 Db	0Cb	1,0 Ba	1,0Da	0 Bb	1,0Da	0Ec	2,0Ba	0,40Cb
0	0,5	0,5	0 Aa	0 Aa	0 Ba	0 Cb	0 Ab	1,0Ba	0 Db	0Cb	1,0Ba	1,0Da	0 Bb	0Eb	2,7Aa	0Cb	1,3Bb
1	0,5	0,5	0 Ab	0 Ab	1,0 Aa	0 Cb	0 Ab	1,0 Ba	1,0Ca	1,5Ba	1,3Ba	1,2CDb	2,4Aa	1,2Db	1,4BCa	0Cb	1,3ABa
3	0,5	0,5	0 Aa	0 Aa	0 Ba	0 Ca	0 Aa	0Ca	1,0Ca	0Cb	0 Db	2,0Aa	0Bc	1,4CDb	1,0CDa	0Cb	1,3Ba
5	0,5	0,5	0 Aa	0 Aa	0 Ba	1,0 Bb	0 Ac	1,25ABa	1,3BCa	0Cb	1,0 Ba	1,7ABCa	0Bb	1,7BCa	1,5Ba	0Cb	1,0Ba
0	0	0,5	0 Aa	0 Aa	0 Ba	1,5Aa	0 Ab	0 Cb	1,0 Ca	0Cb	1,0 Ba	1,0 Db	2,5Aa	0Ec	1,0CDa	0Cb	1,0Ba
1	0	0,5	0 Ab	0 Ab	1,0 Aa	0 Cb	0 Ab	1,0 Ba	0Db	4,0Aa	1,0 Bb	1,3BCDa	0Bb	1,3CDa	1,0CDb	3,0Aa	1,0Bb
3	0	0,5	0 Ab	0 Ab	1,0 Aa	1,0 Ba	0 Ab	1,0 Ba	1,0Ca	0Cb	0 Db	1,3BCDb	2,7Aa	1,0Dc	1,0CDa	0Cb	1,0Ba
5	0	0,5	0 Ab	0 Ab	1,0 Aa	1,0 Bb	0 Ac	1,33 Aa	0Db	0Cb	1,3BCa	1,0 Da	0 Bb	1,12 Da	0,80 Db	0Cb	1,75Aa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula nas colunas e, médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, respectivamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os explantes reagiram de forma diferente em meios com relativa proximidade dos biorreguladores, dificultando dessa forma a análise dos dados e a validação dos nossos resultados com a literatura de espécies lenhosas, uma vez que a literatura da teca para organogênese é muito escassa. Dessa forma, pode-se inferir que o material vegetal utilizado seja responsável por parte dessa variação. O material utilizado é proveniente de populações seminais variáveis e de polinização aberta. Diferenças entre progênies indicam que fatores genéticos controlam os processos de desenvolvimento *in vitro* (CHRISTIANSON e WARNICK, 1983). Além disso, a nutrição mineral também participa na regulação morfogênica (RAMAGE e WILLIAMS, 2002), assim como o balanço dos reguladores de crescimento determina o potencial de regeneração (ZAFFARI *et al.*, 2000).

Tratando-se da variabilidade genética da teca, podemos citar os estudos de Inza Jesus Fofana, mais especificamente de Fofana *et al.* (2009), que a partir de marcadores moleculares SSR encontraram altas taxas de heterozigiosidade (até 0,79) e baixas taxas de autofecundação (entre 0,081 e 0,369) o que caracteriza sementes muito variáveis genotipicamente, dificultando ainda mais o processo de regeneração *in vitro*.

4.4 Efeito de diferentes fontes de carbono

As fontes de carbono são componentes importantes do processo de cultura *in vitro*, elas são empregadas como fonte de energia e também são reguladores osmóticos do meio (FERRIE *et al.*, 1995). Todavia trabalhos desenvolvidos com várias espécies mostraram que a troca do tipo de carboidrato pode aumentar a eficiência da regeneração.

Verificou-se pela análise de variância que não existiu interação entre explante e fonte de carbono (Anexo 10). Entretanto, houve diferenças estatísticas ($P < 0,01$) para a porcentagem de regeneração nos açúcares.

Nesse trabalho a sacarose foi o açúcar que propiciou a maior taxa de regeneração, seguida pela glicose (Tabela 9). Segundo Caldas *et al.* (1998), a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, pois esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies, além de ser o açúcar mais encontrado na seiva de plantas.

Tabela 9 - Porcentagem de explantes de *Tectona grandis* regenerados em função da fonte de carbono no meio de cultura *in vitro*

Fonte de Carboidrato	Porcentagem de Explantes regenerados
Sacarose	43 A
Maltose	17 BC
Galactose	12 BC
Sorbitol	0 C
Glicose	27 AB
Manitol	0 C

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Menores taxas de regeneração foram obtidas em maltose e galactose; manitol e sorbitol inibiram completamente a regeneração, este fato pode ser explicado pela possibilidade da teca em não possuir mecanismos necessários para metabolizar os açúcares álcoois (sorbitol ou manitol), ao contrário de algumas espécies de Rosaceas (COFFIN *et al.*, 1976), e tenha utilizado toda a sacarose para produzir energia necessária ao desenvolvimento de calos. Com isso, os explantes provenientes dos tratamentos com esses dois alcoóis consumiram as reservas do meio mais rapidamente, apresentando, assim, inibição na formação de plantas. Outra possibilidade seria o efeito tóxico do sorbitol e manitol no cultivo da teca, esses efeitos nocivos do manitol no crescimento foram descritos por Lemos e Baker (1998) em internós de *Annona muricata* cultivados *in vitro*.

Em espécies arbóreas, os meios de cultura estão sendo cada vez mais otimizados e a procura de melhores fontes de carbono, bem como outros fatores que influenciam positivamente o desenvolvimento *in vitro*, estão em constante aperfeiçoamento. Em meio de cultura para *Quercus suber*, brotos axilares foram utilizados na presença de 20 g.L⁻¹ de sacarose para a indução de embriões somáticos (CHALUPA, 1993). O manitol na concentração de 30 g.L⁻¹ foi considerado a melhor fonte de carbono em explantes de *Olea europaea*, comparado com a mesma concentração de sacarose, os autores observaram aumento de duas vezes na quantidade de brotos por explante (GARCIA *et al.*, 2001). Na presença de 20 g.L⁻¹ de sorbitol, *Pyrus pyrifolia* apresentou um aumento de 25% de brotos, quando comparado com as mesmas concentrações de sacarose e 42% para glicose (KADOTA *et al.*, 2001). Em *Hevea brasiliensis*, a maltose aumentou em 85% a eficiência na formação de embriões somáticos do que sacarose e 82% para a glicose, o segundo açúcar mais responsivo (BLANC *et al.*, 1999).

Os efeitos interativos do tipo de carboidrato e genótipo foram importantes para a proliferação de gemas em *Vaccinium vitis*. A melhor resposta foi observada em 20 g.L⁻¹ de sacarose tanto para a regeneração quanto para o desenvolvimento. Embora a glicose a 10 g.L⁻¹ tenha influenciado de forma positiva o crescimento no genótipo 'NL1' (DEBNATH, 2005). Mostrando diferentes exigências ou necessidades para cada explante e genótipo.

O número de brotações por explante foi influenciado pela fonte e dose de carboidratos em *Pfaffia glomerata*, as doses de 15 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹ da sacarose apresentaram efeito semelhante ao da lactose para as mesmas concentrações, onde houve o menor número de brotações por explante (NICOLOSO *et al.*, 2003). Esse mesmo autor observou que a partir de 45 g.L⁻¹ o efeito da sacarose igualou-se ao da frutose e maltose, e essas fontes foram superiores a glicose, que reduziu o número de brotações. Em qualquer dose das fontes de carbono testadas, o mais alto número de brotações obtido (média = 1,80) foi semelhante àquele observado para mesma espécie por Nicoloso *et al.* (2001), demonstrando que a *Pfaffia glomerata* não apresenta grande plasticidade quanto ao número de brotações, inferindo mais uma vez sobre o efeito do genótipo na regeneração em diferentes fontes de carbono.

Contudo, pelos dados apresentados e de acordo com George (2007), o sorbitol usualmente não é metabolizado pelas plantas, e sua atuação frequentemente está relacionada em modificar o potencial osmótico do meio de cultura. De acordo com Mello *et al.* (2001), o sorbitol foi ineficiente para o crescimento *in vitro* de *Bauhinia forficata* L., *Curcuma zedoaria* e *Phaseolus vulgaris* L., esses dados corroboram com os dados em teca, onde o sorbitol inibe a organogênese.

4.5 Análise histológica

Pela análise histológica realizada nos segmentos de hipocótilo obtidos de plântulas germinadas em meio MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de TDZ após 20 dias, notou-se que não haviam gemas pré formadas (Figura 10a, b e c) e após 28 dias de cultivo em meio de regeneração (MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ GA₃), foi possível verificar respostas morfogênicas. Esse explante representa um alvo em potencial para transformação genética, atingindo porcentagens de regeneração de até 60%, com média de 7,0 brotos por explante responsivo, observou-se ainda, que sua estrutura apresenta-se formada pelos tecidos meristemáticos protoderme, meristema fundamental e procâmbio.

Figura 10 - Análise histológica do processo organogenético em teca (*T. grandis*) a partir de segmento de hipocótilo. a-c) cortes longitudinais de segmento de hipocótilo aos 20 dias de germinação em meio MS, (mf) meristema fundamental, (pt) protoderme, (pr) procâmbio. d-f) cortes histológicos de hipocótilos de teca em regiões de indução organogênica indireta, gemas adventícias- (pf) primórdio foliar e (ma) meristema apical. g-h) segmento de hipocótilo em 28 dias no meio de regeneração ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), (pf) primórdio foliar. Barra horizontal: $50\mu\text{m}$, Barra vertical: 5mm

Após 28 dias de cultivo *in vitro* desses explantes em meio de regeneração notou-se o desenvolvimento de calos nas extremidades dos segmentos. Esses calos foram formados provavelmente pela desdiferenciação da protoderme e procâmbio e a partir dessas estruturas observamos a formação das gemas adventícias, as quais deram origem a plântulas (Figura 10 d-h).

O procâmbio e futuramente os tecidos vasculares são regiões meristemáticas que possuem alta capacidade organogénética (CHOI et al., 2003; MIRANDA et al., 1999), sendo muito utilizados nos processos de morfogênese *in vitro*. Desta forma, o hipocótilo apresenta traços de uma zona de transição da raiz para uma parte aérea, ocorrendo um arranjo dos tecidos vasculares (ESAU, 1974). Essas mudanças na disposição dos tecidos vasculares sugerem complexas mudanças na distribuição hormonal (SIEBERER et al., 2003). Essas características dos tecidos vasculares do hipocótilo, além da idade, fazem deste um promissor explante para eventos organogénéticos (ASCOUGH et al., 2009).

Fica evidente pela Figura 10-d e 10-e que a gema é composta por primórdios foliares, com uma protoderme bem desenvolvida e um meristema apical evidente. O processo de xilogênese (conexão vascular da gema com o explante) deveria ter ocorrido anteriormente a essas duas estruturas, entretanto isso não foi verificado. Provavelmente a partir desses órgãos pré-estabelecidos o tecido vascular se originaria secundariamente, suprindo a gema com nutrientes. Salientamos que esse padrão organogénético é atípico e merece estudos mais aprofundados.

Células grandes com uma baixa relação núcleo/citoplasma foram verificadas nas estruturas abaixo das gemas formadas, essas características são claras evidências de tecido indiferenciado, como tecido de calos. Dessa forma, verificou-se que a formação de gemas adventícias deu-se por organogênese indireta. Miranda et al. (1999) observaram essas mesmas características em hipocótilos de *Stellaria longipes*, os mesmos autores citam ainda, como em nosso trabalho, a formação de gemas pela diferenciação de células do parênquima vascular.

Tavano (2008) mostrou que em *Citrus wolkameriana* e *C. aurantium* o processo organogénético ocorre de forma similar em segmentos de epicótilos, entretanto a xilogênese se desenvolveu de forma normal. Em urucum (*Bixa orellana*) as gemas adventícias formaram-se a

partir de camadas da epiderme e tecidos do córtex, isso quando os tecidos estavam sob influência de TDZ (PAIVA NETO et al., 2003).

Indícios da origem das gemas adventícias são de grande importância quando se pretende estabelecer protocolos de organogênese *in vitro* visando posterior uso em processos de transformação genética. Para a obtenção de uma plântula transgênica é necessário o contato e infecção da *Agrobacterium* com as células que irão se diferenciar em gemas adventícias (MIRANDA et al., 1999).

4.6 Efeito de antibióticos para seleção e obtenção de plantas transgenicas

4.6.1 Higromicina

O gene *hpt* (higromicina fosfotransferase) sintetiza uma quinase que inativa o antibiótico higromicina por meio de sua fosforilação (RAO *et al.*, 1983). Desde a descoberta deste gene a higromicina tornou-se um antibiótico muito usado na seleção de células transgênicas em protocolos de transformação genética.

Com base na análise de variância, verificamos que não existiu interação entre explante e concentração de higromicina, entretanto foram observados efeitos significativos na regeneração dos diferentes explantes ($P < 0,05$) e diferentes concentrações de higromicina ($P < 0,01$) (Anexo 11 e Tabela 10).

Resultados positivos da utilização de higromicina como agente seletivo em protocolos de transformação de várias espécies estão disponíveis na literatura, entretanto para a teca apenas dois relatos são encontrados. Segundo Norwati *et al.* (2003; 2007) 10 mg.L^{-1} desse antibiótico é capaz de selecionar com 100% de eficiência os tecidos transgênicos de teca dos não tecidos não transgênicos após o processo de transformação por bombardeamento. É importante salientar que esse autor utilizou gemas laterais como tecidos alvo e, conseqüentemente, uma dose maior de higromicina para a seleção é necessária. Os explantes aqui estudados possuem outras características, morfológicas e fisiológicas, que tornaram necessária a avaliação desse antibiótico antes de submetê-los a transformação genética. Para os nossos resultados observamos alta sensibilidade de teca a higromicina.

Tabela 10 - Porcentagem de regeneração de hipocótilo, cotilédone e nó cotiledonar de *Tectona grandis* em função de doses de higromicina que regeneraram plantas (0,0; 1,0 e 2,5 mg.L⁻¹ de higromicina)

Tipo de Explante	Média de explantes resp. em doses que regeneraram plantas
Cotilédone	4,62 B
Nó	14,07 A
Hipocótilo	10,36 AB

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. resp. = responsivo

Doses acima de 1,0 mg.L⁻¹ influenciaram negativamente a regeneração em todos os explantes testados (Tabela 11). A análise dos dados nos sugere que a teca possui alta sensibilidade a tal antibiótico e que concentrações de 2,5 mg.L⁻¹ já são capazes de diminuir cerca de 7 vezes a regeneração, sendo que doses de 3 mg.L⁻¹ inibem totalmente a formação de brotações, deixando o tecido necrótico a partir da segunda semana.

Tabela 11 - Médias da porcentagem de regeneração em hipocótilo, cotilédone e nó cotiledonar de *Tectona grandis* em função das doses de higromicina

Concentração	% de regeneração
0,0 (controle)	44,45 A
1,0	17,50 B
2,5	6,00 BC
3,0	0,00 C
3,5	0,00 C
4,0	0,00 C
5,0	0,00 C
7,5	0,00 C
10,0	0,00 C

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Resp. = responsivo.

No tratamento controle as brotações apresentam-se vigorosas, verdes e com múltiplos brotos, no entanto nas doses acima de 1,0 mg.L⁻¹ os brotos regenerados apresentam tamanho bem inferior a testemunha, cloróticos (hipocótilos) e/ou escurecidos (nó e cotilédones) e esses morreram após a 3ª semana de cultivo *in vitro* (Figura 11). Essa característica clorótica pode ser

explicada, pois a higromicina é um antibiótico que atua na proteína ribossomal 80s, bloqueando a síntese de proteínas em eucariotos (EADY e LISTER, 1998).

Figura 11 - Regeneração *in vitro* de nó cotiledonar (a), hipocótilos (b) e cotilédones (c) de *Tectona grandis* em presença de diferentes concentrações do antibiótico Higromicina. Da esquerda para direita: Regeneração em meio MS suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP +0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ sem adição de higromicina (controle); 2,5 mg.L⁻¹; 5,0 mg.L⁻¹; 7,5mg.L⁻¹ e 10 mg.L⁻¹ de higromicina, respectivamente

Para selecionar com eficiência os tecidos transgênicos de teca, observamos que a concentração de 2,5 mg.L⁻¹ de higromicina deve ser utilizada. As plantas inoculadas nessa concentração não morrem de imediato, o que permite que as células transgênicas possam se dividir e formar plântulas.

4.6.2 Timentin, Cefotaxima e Carbenicilina

Verificou-se pela análise de variância que existiu interação entre as variáveis analisadas (Anexo 12, 13 e 14). Não houve diferença significativa para a porcentagem de regeneração entre os explantes (cotilédones, hipocótilos e nós cotiledonares) e antibióticos (timentin, cefotaxima e carbenicilina) nas doses baixa (100 mg.L^{-1}) e intermediária (300 mg.L^{-1}) (Tabela 12). Todavia, os antibióticos timentin e cefotaxima mostraram positivo efeito na regeneração de plantas de teca, aumentando-a em 5% para cotilédones a 300 mg.L^{-1} de timentin, ou mesmo não prejudicando nessa mesma concentração em hipocótilos e nó cotiledonar. Em geral os melhores resultados de Cefotaxima e timentin para os três diferentes explantes foram obtidos para a dose baixa e intermediária, pois, doses altas (500 mg.L^{-1}) desses mesmos antibióticos apresentaram efeito negativo na regeneração, diminuindo essa em 21% para hipocótilos, 64% para nó cotiledonar e 25% em cotilédones.

Tabela 12 - Porcentagem de regeneração a partir de segmentos de hipocótilo (H), nó cotiledonar (NC) e cotilédone (C) de *Tectona grandis*, sob influência de timentin (Ti), cefotaxima (Ce) e carbenicilina (Ca). As médias foram obtidas após cinco semanas de cultura

Antibiótico (mg.L^{-1})	Frequência de regeneração ^a (%)		
	H	NC	C
Controle	50Aab	70Aa	30Ab
100 Ti	40Aba	60Aa	30Aa
300 Ti	50Aa	70Aa	35Aa
500 Ti	16ABCab	45Aa	5Ab
100 Ce	50Aa	70Aa	35Aa
300 Ce	45Aa	57Aa	25Aa
500 Ce	5BCb	45Aa	10Aab
100 Ca	25ABCa	40Aa	10Aa
300 Ca	0 Ca	0 Ba	0Aa
500 Ca	0 Ca	0 Ba	0Aa

^aMédias seguidas por mesma letra maiúscula nas colunas e, médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A carbenicilina, para todas as concentrações e explantes testados apresentou influência negativa na regeneração, diminuindo ou mesmo inibindo a mesma. O uso de carbenicilina em processos de transformação ou mesmo na cultura de tecidos de teca mostrou-se inibitório, pois a partir de 300 mg.L⁻¹ a regeneração ficou muito prejudicada chegando a inibições da ordem de 100% para cotilédones, hipocótilos e nós cotilédonares (Figura 12 a, d e g).

Figura 12 - Efeito de timentin, cefotaxima e carbenicilina em cotilédones, hipocótilos e nó cotilédonar na regeneração *in vitro* de *Tectona grandis* (barra=1cm). a, d, g- Efeito de carbenicilina em cotilédones, hipocótilos e nó respectivamente. b, e, h- Efeito de cefotaxima em cotilédones, hipocótilos e nó respectivamente e c, f, i- Efeito de timentin em cotilédones, hipocótilos e nó respectivamente. Em todas as figuras da esquerda para a direita diz respeito à explantes submetidos a concentrações de zero (controle) mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 300 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹

A partir de Holford e Newbury (1992), o grupo das penicilinas tem sido sugerido como substâncias que afetam a morfogênese das plantas pela degradação desses compostos a ácido fenilacético (APA), uma auxina natural (MILBORROW *et al.*, 1975; WIGHTMAN e LIGHTY 1982; BOSELA, 2009; ROBERT *et al.*, 1989; LIN *et al.*, 1995; NAUERBY *et al.*, 1997; LING *et al.*, 1998). Mais recentemente, Bosela (2009) avaliou o efeito dos antibióticos do grupo das ampicilinas (β -lactanos) na regeneração de *Populus* sp., e em conjunto avaliou também, citocininas e auxinas, incluindo o ácido fenil acético (produto da degradação dos β -lactanos). O autor observou que esses antibióticos, bem como o do ácido fenil acético não induziram os mesmos efeitos observados para auxinas. O mesmo autor evidenciou que explantes de *Populus* submetidos à ANA respondem de forma negativa em relação à APA, inferindo que este composto

pode ser utilizado em cultura de tecidos de forma mais eficiente que certas auxinas para determinadas espécies.

Em cultura de tecidos de teca as auxinas não apresentam efeitos positivos na regeneração, via organogênese e/ou embriogênese, de plantas (BAGHEL *et al.*, 2008) e a hipótese de degradação de penicilinas a APA pode ser válida para este caso. Outras pesquisas neste sentido devem ser realizadas para afirmações mais veementes, entretanto calos e ausência de regeneração são fortemente influenciados pela presença de auxina no meio de cultura (BAGHEL *et al.*, 2008), assim como a presença de carbenicilina e doses mais elevadas de cefotaxima e timentin.

Em *Stylosanthes goianensis* cultivar “Bandeirantes” a regeneração foi inibida de 66% para 0% em meio de cultura com 250 mg.L⁻¹ de cefotaxima porém para outro cultivar, denominado de “Mineirão”, efeitos negativos não foram observados na mesma concentração (HOFFMANN e VIEIRA, 2000), indicando com isso que a influência de antibióticos na regeneração pode ser controlada pelo genótipo da planta em estudo.

Cefotaxima e timentin em cotilédones de *Pinus pinea* apresentaram positivas influências na obtenção de maior número de gemas que regeneraram plantas (HUMARAS e ORDÁS, 1999). Em *Platanus acerifolia*, timentin mostrou influenciar o aumento de regeneração em 24%, entretanto efeitos negativos foram observados nas concentrações de 100 e 500 mg.L⁻¹. Para cefotaxima a regeneração foi significativamente reduzida em concentrações entre 100 e 500 mg.L⁻¹ (ZHI-NENG *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007).

A análise do número de brotos regenerados foi significativa entre timentin e cefotaxima para hipocótilo e nó cotiledonar, indicando que houve uma influência positiva para a dose de 100 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹. Para carbenicilina, houve um decréscimo gradual no número de brotos em todas as doses para esses explantes (Tabela 13).

Explantes cotiledonares apresentaram diminuição do número de brotos para todas as doses de antibióticos utilizados. No processo de transformação genética, os explantes cotiledonares podem ser utilizados, todavia, lavagens com antibióticos supressores da *Agrobacterium* devem ser feitas antes da inoculação desses em meios de cultura. Esse passo deve ser realizado para que não ocorram os efeitos negativos dos antibióticos no meio de cultura, como mostrado no presente trabalho.

Tabela 13 - Número de brotos por explante responsivo em de segmentos de hipocótilo (H), nó cotiledonar (NC) e cotilédone (C) de *Tectona grandis*, sob influência de timentin (Ti), cefotaxima (Ce) e carbenicilina (Ca), após cinco semanas de cultivo

Antibiótico (mg.L ⁻¹)	Número de brotos regenerados por explante responsivo ^a		
	H	NC	MC
Controle	2,0BCb	2,0Bb	4,0Aa
100 Ti	2,8ABa	2,8Ba	3,0ABa
300 Ti	3,2Ab	4,0Aa	2,8Bb
500 Ti	1,4CDa	1,0Ca	1,0CDa
100 Ce	2,0BCa	2,0Ba	2,0BCa
300 Ce	3,0Aa	2,6Ba	2,6Ba
500 Ce	1,0Db	2,0Ba	2,0BCa
100 Ca	1,0Da	1,0Ca	1,0CDa
300 Ca	0 Ea	0 Da	0 Da
500 Ca	0 Ea	0 Da	0Da

^aMédias seguidas por mesma letra maiúscula nas colunas e, médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em *Populus euphratica* o número de brotos foi significativamente reduzido em concentrações de carbenicilina de 600 mg.L⁻¹, além dos brotos ficarem estiolados e morrerem quando permaneciam nessa concentração por algumas semanas (XIA *et al.*, 2006). Em nosso estudo, hipocótilos, nó cotiledonar e cotilédones no meio controle apresentaram alturas médias de 20 mm, 20 mm e 30 mm, respectivamente. Já em meios com cefotaxima as alturas diminuíram para 10 mm em hipocótilos, 12 mm em nó e 20 mm em cotilédones. Alturas similares foram observadas em presença de timentin, onde a média para hipocótilos e nó cotiledonar foram de 15 mm e 20 mm para cotilédones.

Novamente a carbenicilina foi o antibiótico menos eficiente, tendo alturas muito inferiores aos demais antibióticos, hipocótilos apresentaram em média 0,5 mm, seguidos de 0,8 mm em nós cotiledonares e 15 mm para cotilédones.

No caso das melhores concentrações de timentin, menores alturas dos regenerantes podem ser explicadas pelo aumento do número de brotos. Há um maior gasto de energia para a produção

de brotos em detrimento da altura das brotações. Para cefotaxima esse fato também ocorreu. Em cotilédones, mesmo com a diminuição da altura houve um menor número de brotos por explante responsivo.

Em nosso estudo 300 mg.L⁻¹ de timentin e cefotaxima não inibiram a organogênese e influenciaram positivamente a quantidade de brotos regenerados. Com tais concentrações desses antibióticos, uma ampla gama de linhagens de *Agrobacterium* são inibidas, podendo ser utilizadas nos protocolos de regeneração. As linhagens mais utilizadas em processos de transformação genética são: EHA101, EHA105, LBA4404, C58, GV 3101 e GV 2260. A concentração dos antibióticos para a total eliminação de *Agrobacterium* é variável para os diferentes compostos, mas em geral doses de 150-400 mg.L⁻¹ de timentin, 250-500 mg.L⁻¹ de cefotaxima e 200-400 mg.L⁻¹ de carbenicilina são suficientes para a eliminação desses microorganismos do meio de cultura (MENDES *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2004; ZHI-NENG *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007).

4.7 Enraizamento de teca *in vitro* e aclimação

A análise da variância (Anexo 15) não mostrou significância para a quantidade de raiz nos tratamentos testados (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹ de ANA e AIB), entretanto houve diferenças significativas para porcentagem de enraizamento (Tabela 14). Esse efeito, provavelmente se deve a alta capacidade de rizogênese *in vitro* de teca quando se utiliza gemas apicais oriundas de sementes germinadas *in vitro* como fonte de explante. A quantidade de raízes variou de 1,4, para explantes cultivados em 1,0 mg.L⁻¹ de ANA, para 4,2 em presença de 0,5mg.L⁻¹ de AIB, nos tratamentos as médias ficaram em torno de 3,5 raízes por explante aos 30 dias.

O enraizamento foi mais uniforme dentro dos tratamentos, que entre os tratamentos. Essa variabilidade talvez seja devido ao material vegetal originário de semente que apresenta alta variabilidade genética. O genótipo, assim como os reguladores de crescimento (auxinas), estão entre fatores mais importantes para o sucesso no enraizamento *in vitro* (DEKLERK *et al.*, 1997; ROGALSKI *et al.*, 2003).

Tabela 14 - Médias da porcentagem de enraizamento *in vitro* de gemas laterais de *Tectona grandis* em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de AIB e ANA (0,1; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹), após 30 dias de cultura

Biorreguladores (mg.L ⁻¹)	Porcentagem de Regeneração
0,0 (Controle)	55,0 AB
0,1 ANA	60,0 AB
0,5 ANA	60,1 AB
1,0 ANA	16,7 B
0,1 AIB	55,0 AB
0,5 AIB	65,0 A
1,0 AIB	25,0 AB

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Após dez dias observou-se o início da formação de raízes com a presença de protuberâncias na base dos alguns explantes. Enquanto, explantes que apresentaram esse tipo de alteração tiveram certa dificuldade de emissão de raízes. Verificou-se também, que a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e ANA favoreceu a rizogênese, enquanto que a concentração de 1 mg.L⁻¹ de AIB e ANA reduziu o enraizamento.

Apesar dos tratamentos com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e ANA não diferirem significativamente, foram os que mais proporcionaram enraizamento (Tabela 14), além de apresentarem raízes mais vigorosas. Apesar de Centellas *et al.* (1999) e Erig *et al.* (2004) obterem apenas 5% (*Malus domestica*) e 0% (*Cydonia oblonga*) de enraizamento na ausência de biorreguladores para essas duas espécies lenhosas, o presente trabalho mostra que altas taxas de enraizamento podem ser obtidas para outras espécie arbóreas, como a teca.

Em cultivo *in vitro*, Tiwari *et al.* (2002) enraizaram gemas de *T. grandis* vindas de plantas com 45 anos de idade com 77% de eficiência em presença de pré tratamentos, de imersão por dois minutos em presença de 2mg.L⁻¹ de AIB. Gyves *et al.* (2007), entretanto, obtiveram enraizamento em *T. grandis* vindas de brotos de casa de vegetação, com 100% de eficiência em 0,5mg.L⁻¹ de AIB + 160mg.L⁻¹ de putrecina, corroborando com nossos resultados. Também trabalhando com *T. grandis in vitro*, Shirin *et al.* (2005) induziram a rizogênese (67%) em explantes provindos de árvores de 60 anos, utilizando 2,7 mg.L⁻¹ de ANA. Nenhum dos autores relatou dificuldade em enraizar *T. grandis in vitro*, no entanto, no presente trabalho, se observou um efeito positivo com a utilização de auxinas para obtenção de altas taxas de enraizamento. As

auxinas AIB e ANA são as mais indicadas e usadas no enraizamento de plantas lenhosas (LEOPOLD e KRIEDERMANN, 1975; MELO *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos para teca são muito promissores, uma vez que não é necessária a utilização de biorreguladores no desenvolvimento de raízes *in vitro*, diminuindo custos no processo de micropropagação. O meio de cultura desprovido de auxinas pode ser suficiente para a emissão de raízes, isso pode ser determinado pelo genótipo/espécie (THORPE, 1991).

Para o processo de aclimatização, foram transplantadas 58 plantas com tamanho aproximados de 5 cm para condições *ex vitro*. Observamos facilidade de aclimatização das plantas de teca, onde obtivemos um total de 60% de sobrevivência (Figura 13).

Figura 13 - Enraizamento *in vitro* e aclimatização de teca. a) sequência de enraizamento *in vitro* em meio MS. Esquerda para a direita: Explantes com 5, 22, 30, 42 e 70 dias de cultura *in vitro*. b) plântula de 70 dias de cultivo *in vitro* transferida para casa de vegetação. c) mudas de teca com 72 dias em de cultivo em casa de vegetação. Barra= 5cm

4.8 Transformações genética de teca via *A. tumefaciens* e bombardeamento de micropartículas

Foi utilizado para os processos de transformação um total de 1348 explantes. Sendo assim divididos: 206 segmentos de nó cotiledonar, 150 segmentos de hipocótilo e 260 segmentos de cotilédones para o processo com *Agrobacterium*. E também 266 segmentos de nó cotiledonar, 166 segmentos de hipocótilo e 300 segmentos de cotilédones para o processo de biolística. Os explantes utilizados foram obtidos de plântulas germinadas em $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ, essa concentração foi a escolhida por influenciar uma maior frequência de regeneração e maior quantidade de brotos por explante, potencializando o processo de transformação.

A etapa inicial de infecção consiste na fixação da bactéria à célula vegetal do explante (na região de ferimento), em resposta da bactéria a certos compostos fenólicos produzidos pelo hospedeiro, tais como acetoseringona. Esses compostos induzem a atividade dos genes *vir* codificados nos plasmídeos Ti. Com o intuito de aumentar a eficiência de transformação, testamos três concentrações de acetoceringona (50, 100 e 200 mM) e dois tempos de suspensão dos explantes com a agrobactéria (10 e 20 minutos), tempos maiores não foram realizados, pois os explantes de teca apresentam altos índices de oxidação, liberando um composto de coloração avermelhada, que deixa o explante totalmente escuro, inviabilizando os processos subsequentes.

A linhagem EHA105 de *A. tumefaciens*, contendo a construção pBA1 foi pré cultivada em 3 mL de meio YEB (VERVLIET et al., 1975) acrescido de $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina e $30 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina e $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina, sob agitação a 28°C durante 16 horas. Após, as células foram passadas para um volume de 50 mL com as mesmas concentrações de antibióticos e cultivados até que a densidade óptica (DO_{660}) atingisse 0,6-0,8. Os 50 mL da solução de bactérias foram transferido para um tubo de ultra centrífuga estéril e centrifugado a 5000 g por 5 minutos. O meio de cultura foi descartado e as bactérias foram ressuspensas em 50 mL de solução NaCl (0,85%) acrescido das concentrações de acetoceringona.

Os explantes foram excisados das plântulas e incubados nos tempos testados. Em seguida, cada explante foi transferido para seu respectivo meio de regeneração e mantidos a 25°C durante dois dias para a infecção (co-cultivo). Após este procedimento, os explantes foram transferidos

para novo meio suplementado por 300 mg.L⁻¹ de timentin para a supressão de *Agrobacterium* e 2,5 mg.L⁻¹ de higromicina para seleção dos transformantes.

Para o bombardeamento de micropartículas, a distância do alvo e a pressão de disparo foram utilizadas de acordo com Andrade (2001). O autor informa que não houve diferença estatística entre a distância de 9,5 e 12,5 cm do alvo e então para esse trabalho utilizamos uma de 11 cm (distância média). A pressão de disparo foi utilizada a de 1100 psi, que segundo o autor é uma das mais eficientes, gerando um total de 16 eventos de transformação para *Eucalyptus spp.*

As árvores, durante seu ciclo de vida, devem se adaptar às mudanças climáticas e a uma vasta gama de pragas e estresse abióticos. Por conseguinte, a diversidade genética desses organismos é alta, refletindo na dificuldade em manipular genótipos em cultura de tecidos e transformação genética (TZFIRA et al., 1998; GIRI et al., 2004; BUSOV et al., 2005).

Em nossas tentativas de transformação com teca, não conseguimos nenhum evento de transformação. Observamos que nove explantes regeneraram (6 via bombardeamento e 3 via *Agrobacterium*) entretanto morreram após um mês de cultura *in vitro*, sob influência de 2,5 mg.L⁻¹ de higromicina. A transformação genética de árvores vem se tornando cada vez mais eficaz (POUPIN e ARCE-JOHNSON, 2005). No entanto, sabemos que essas plantas apresentam certas barreiras que dificultam a transformação genética. Podemos citar como tais barreiras, seleção dos tecidos transgênicos, baixa frequência de transformação, especificidade das linhagens de *Agrobacterium* em infectar tecidos e dificuldade de propagar o material *in vitro* (WENCK et al., 1999; BUSOV et al., 2005; SPOKEVICIUS et al., 2005).

4.9 Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) em ínstares jovens de *Hyblaea puera* Cramer, 1777 (Lepidoptera: Hyblaeidae)

Os ínstares mais jovens de *H. puera* foram utilizados por serem mais susceptíveis as proteínas *Bt* quando comparados a outros ínstares (LOGANATHAN e DAVID 2000; SENGUTTUVAN et al., 2000; KALIA e LAL, 2000; NAIK, 2008), padronizando assim os níveis de susceptibilidade do inseto aos esporos de Btk.

Foi observada diferença estatística para acréscimo de peso (Anexo 16). A eficácia do produto comercial Dipel PM[®] e dos esporos crescidos em laboratório foram observadas após 15 horas do contato da lagarta com as folhas contendo os produtos. Após este período, apenas a concentração de 2×10^5 UFC.mL⁻¹ apresentava lagartas vivas, entretanto sem acréscimo de peso e em estágio letárgico (estas não mais se alimentavam). Após a ingestão, as proteínas são solubilizadas no intestino médio e proteoliticamente processadas para a liberação do fragmento tóxico (HÖFTE e WHITELEY, 1989), iniciando o processo de lise e consequente morte do inseto.

Entre as 24 e 36 horas todos os tratamentos com esporos apresentavam 100% de mortalidade, mostrando alta eficiência de Bt na infecção de *H. puera*. Foi observado 100% de sobrevivência e acréscimo de peso de 71% no tratamento controle (Figura 14).

Figura 14- Ação de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* no controle de *Hyblaea puera* em *Tectona grandis*. Os tratamentos referem-se às concentrações de UFC.mL⁻¹ (unidade formadora de colônias por mililitros) onde 1-controle (sem esporos), 2- 2×10^5 (Dipel); 3-2, 6×10^5 (Dipel) e 4- $3,2 \times 10^5$ (Dipel), 5- 2×10^5 (esporos crescidos em laboratório); 6- $3,2 \times 10^5$ (esporos crescidos em laboratório) e 7- $3,8 \times 10^6$ (esporos crescidos em laboratório)

Após 15 horas, as lagartas consumiram praticamente 100% da área foliar no tratamento controle. Porém, nos tratamentos com doses de Dipel PM[®] e esporos crescidos em laboratório, observou-se que o consumo foi visualmente bem menor (Figura 15), havendo uma rejeição dos insetos a fonte de alimento.

Figura 15 - Tratamentos contendo diferentes concentrações de produto comercial Dipel PM[®] e esporos de *Bacillus thuriangiensis* var. *kurstaki* crescidos em laboratório. a- Controle, 1 mL de água destilada; b – dose 1 de Dipel PM[®] contendo 2×10^5 UFC.mL⁻¹; c- dose 2 de Dipel PM[®] contendo $2,6 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹; d- dose 3 de Dipel PM[®] contendo $3,2 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹; e- Primeira dose de esporos crescidos em laboratório (2×10^5 UFC.mL⁻¹); f- Segunda dose de esporos crescidos em laboratório ($3,2 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹); g - Terceira dose de esporos crescidos em laboratório ($3,8 \times 10^6$ UFC/mL)

As lagartas, antes do contato com os esporos, apresentavam coloração marrom esverdeada com características saudáveis, ágeis e bem agressivas na alimentação. No tratamento controle essas características permaneceram até o final das 36 horas. No entanto, após a ingestão de Btk (todas as concentrações), essas lagartas apresentaram sintomas de intoxicação. Houve escurecimento do corpo, passando de verdes mais claros para verdes mais escuros (após 15 horas da ingestão de *Bt*), no mesmo tempo as lagartas apresentaram letargia e diminuição visual do tamanho. Após 24 horas elas morreram e sua coloração passou, então, para marrom escuro. Dados similares foram encontrados por Kalia e Lal (2000) quando testaram três diferentes variedades de toxinas de *Bt* para controle de *H. puera* em *T. grandis*.

Naik (2008) observou que lagartas *H. puera* após 15 horas de alimentação contendo *Btk* já apresentavam sinais claros do efeito da bactéria, como parada da alimentação e letargia. Após 72 horas, houve 100% de mortalidade dos primeiros ínstaes. Observou-se mortalidade total das lagartas no tempo de 24 horas a partir do contato com as concentrações de *Btk*. Naik (2008) cita que para o produto comercial denominado de Biobit, a mortalidade total ocorreu a 72 horas, entretanto o autor não informa a concentração utilizada, sugerindo que estas deveriam ser

menores do que as testadas no presente trabalho. Kalia e Lal (2000) mostraram que a paralisia de *H. puera* por ingestão de Bt aconteceu dentro de 15 a 20 minutos após a ingestão, seguido por paralisia geral do corpo dentro 7 horas, esses resultados corroboram com os apresentados no presente estudo.

Os resultados mostraram que o *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foi eficiente em matar instares jovens de *H. puera* quando expostas a concentrações de 2×10^5 UFC.mL⁻¹ da toxina no produto comercial Dipel^{PM} e esporos crescidos em laboratório, por um período de tempo de 24 horas. Nesse bioensaio, o que se observou foi que as toxinas de *Bt* apresentam alta toxicidade ao inseto e que são eficazes no controle de instares jovens de *H. puera*. A transformação genética com genes que sintetizem proteínas inseticidas, como o gene cry1a(b), utilizado neste trabalho, pode ser uma valiosa ferramenta no incremento desse tipo de resistência na teca.

5 CONCLUSÕES

- A organogênese direta em teca ocorreu mais eficientemente em meio MS, quando comparado com os meios WPM e JADS.
- Nó cotiledonar apresentou as maiores porcentagens de regeneração que os demais explantes. A melhor combinação de biorreguladores para nó cotiledonar foi $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,5 \text{ mg.L}$ GA₃, quando germinados em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ.
- Hipocótilo foi o segundo melhor explante em porcentagem de regeneração e o mais eficiente na quantidade de brotações. A melhor combinação de biorreguladores foi $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,5 \text{ mg.L}$ GA₃, quando germinados em $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ.
- A sacarose é mais eficiente que glicose, galactose, maltose, manitol e sorbitol na organogênese *in vitro* de teca para hipocótilos, nós cotiledonares e cotilédones de teca.
- A concentração de até $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de higromicina pode ser utilizada em hipocótilos, nó cotiledonar e cotilédones como antibiótico de seleção para tecidos transgênicos de teca.
- A avaliação da influência de Timentin, cefotaxima e Carbenicilina, permitiu constatar que em teca esses antibióticos possuem diferentes efeitos. Timentin e Cefotaxima auxiliam na regeneração e aumentam o número de brotos por explante responsivo, enquanto a Carbenicilina inibe esses parâmetros.
- Ínstares jovens da lagarta *Hyblaea puera* são susceptíveis a toxinas expressas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, apresentando 100% de mortalidade em até 24 horas de exposição a esporos dessa bactéria.

Em relação à organogênese indireta, a literatura de teca é bem escassa, sendo praticamente constituída de trabalhos pouco eficientes e pouco reproduzíveis. Os resultados apresentados nesse trabalho contribuem para o ganho de informação sobre os fatores que influenciam a organogênese desta espécie, bem como, define parâmetros que possam ser utilizados em experimentos futuros visando à transformação genética da espécie.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. Anuário estatístico da Associação Brasileira dos produtores das florestas plantadas: Ano Base 2007. ABRAF: Brasília, 2007. 87p.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.177, p.6027-6032, 1995.
- AN UPDATE OF THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP CLASSIFICATION FOR THE ORDERS AND FAMILIES OF FLOWERING PLANTS: APGII. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, GB: Academic Press, v.141, n.4, p. 399-436, 2003.
- ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética do *Eucalyptus grandis* via *Agrobacterium***. 2001. 94 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- ANGELI, A. *Tectona grandis*. Disponível em:
<<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>> Acesso: 15 set.2009.
- ANON. **The Wealth of India**. New Delhi, India: CSIR, 1996. v.10.
- ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; ERECA, L.G.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.68, n.3, p.203–212, 1996.
- ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. P. Propagação in vitro de *Kielmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 25-31, jan. 1993.
- ASCOUGH, G.D., NOVÁK, O. PĚNČÍK, A. ROLČÍK, J. STRNAD, M. ERWIN, J.E. AND VAN STADEN, J. Hormonal and cell division analyses in *Watsonia lepida* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.166, p.1497-1507, 2009.
- BAGHEL, R.S.; TIWARI, S.; TRIPATHI, M.K. Comparison of morphogenic and plant regeneration ability of some explants of teak (*Tectona grandis* Linn. F). **Journal of Agricultural Technology**, Tehran, Iran, v.4, n.2, p.125-136, 2008.
- BAKSHA, M.W.; CRAWLEY, M.J. Relative preference of different host plants to teak defoliator, *Hyblaea puer*a Cram. (Hyblaeidae: Lepidoptera) in Bangladesh. **Bangladesh Journal of Forest Science**, Dhaka, n.24, p. 21-25, 1995.

BANDYOPADHYAY, T.; GANGOPADHYAY, G.; PODDAR, R.; KUKHERJEE, K.K. Trichomes: their diversity, distribution and density in acclimatization of teak (*Tectona grandis* L.) plants grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.78, p. 113-121, 2004.

BANIK, R.L. Studies on grading of teak fruits: 1. Fruit size is a factor in germination of teak seeds. **Bano Biggyan Patrika**, Bangladesh, v.6, n.1, p.1-7, 1977.

BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; IGUE, T. Concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na taxa de proliferação *in vitro* da macieira "gala". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 5, p. 747-751, maio 1990.

BARROSO, A.B. **Silvicultura especial de árboles maderables tropicales**. La Habana: Ministerio da Cultura.: Editorial Científico Técnico. 1983. p. 342-356.

BEESON, C.F.C. **The ecology and control of the forest insects of India and the neighbouring countries**. New Delhi: Govt. of India, 1941. 767p.

BEHLING, M. **Nutrição, partição de biomassa e crescimento de povoamentos de teca em Tangará da Serra-MT**. 2009. 176. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

BERLITZ, D.L.; FIUZA, L.M. *Bacillus Thuringiensis* e *Melia Azedarach*. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, n. 35, p.66-72, 2005.

BHAGWAT, B.; LANE, D. *In vitro* regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.78, p.173-181, 2004.

BHAT, K.M.; MA, H.O. *Productores de teca, uniros!* Disponível em: <http://www.itto.int/en/workshop_detail/id=33760000. Acesso em: 23 Set. 2009.

BIALECKA, B.; KEPCZYNSKI, J. Endogenous ethylene and reversing methyl jasmonate inhibition of *Amaranthus caudatus* seed germination by benzyladenine and gibberellin. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.41, p. 7-12, 2003.

BISHOP, A.H.; JOHNSON, C.; PERANI, M. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. **World Journal of microbiology & Biotechnology**, Amsterdam, v.15, p. 375-380, 1999.

BLANC, G.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; TEISSON, C.; LARDET, L.; CARRON, M.P. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.59, p. 103-112, 1999.

BOERJAN, W. Biotechnology and the domestication of forest trees. **Currents Opinion Biotechnology**, Oxford, v.16, p.159-166, 2005.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-Hospedeiro. In: _____ **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p.76-79.

BRAVO, C.D.V.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; VENCovsky, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênes de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2181-2185, 2008.

BRONDANI, G.E. **MINIESTAQUIA E MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 130p. Dissertação (Mestrado-Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2008.

BRYNDUM, K.; HEDEGART, T. Pollination of teak (*Tectona grandis* L.), **Silvae Genetica**, Frankfurt, n.18, p.77-80, 1969.

BUSOV, V.; FLADUNG, M. Groover A, Strauss S. Insertional mutagenesis in *Populus*: relevance and feasibility. **Tree Genetics and Genomes**, Berlin v.1, n.4, p. 135–142, 2005.

CALDAS, L. S; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA- CNPH. v.1 p 87-132, 1998.

CARMEN, S.J.M.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.76, p.588-595, 2001.

CARNELOSSI, M.A.G.; LAMOUNIER, L.; RANAL, M.A. Efeito da luz, hipoclorito de sódio, escarificação e estratificação na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), cv. Maioba, e Moreninha-de-Uberlândia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.6, p.779-787, 1995.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.L.R.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.F.; GOTTINARI, R.A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, fev. 1999.

CHALUPA, V. In vitro propagation of mature trees of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Journal Forest Science**, Slezská, v.46, p.537–542, 2000.

CHAMPION, H.G; BRASNETT, N.V. **Choice of tree species**. Rome: FAO, 1958. 307 p. (Forest Development Pap., 13).

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Developmental Biology**, Bethesda, v.95, p. 288-293, 1983.

CIRILLO, M.A.; FERREIRA, D.F.; LIMA, P.S.G. Uma alternativa para avaliar a eficiência de meios de cultivo *in vitro* via modelo de regressão logística. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 24, p. 101-110, 2003.

COFFIN, R.; TAPER, C. D.; CHONG, C. Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 547-551, 1976.

COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY. *Lymantria dispar* (L.), *Hyblaea puera* (Cram.). n. 26, 1981. 2 p.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.R. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *schizolobium amazonicum* huber ex ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 118-124, 2004.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de Eucalyptus spp. In vitro em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113p. Dissertação (Mestrado- Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CORREIA, D.; GRAÇA, M.E.C. In vitro propagation of black wattle (*Acácia mearsii* De Wild). **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p. 117-125, 1995.

COUTINHO, S.A. Disponível em: < <http://www.itto.int/en/tfu/id=6660000> > Acesso em : 23 set. 2009.

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, v. 28, n.5, p. 633-642, 2004.

D’ONOFRIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.107, p. 194-199, 2006.

DAH U.S., BAW U.S., Regional teak marketing and trade. In: REGIONAL SEMINAR ON TEAK, 3., 2001. Yogyakarta, Indonésia. **Proceedings ...** Yogyakarta, 2001. p. 1–14.

DEBNATH, S.C. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration from in vitro-derived lingonberry leaves: shoot induction with TDZ and shoot elongation using zeatin. **HortScience**, St. Joseph, v.40, p.189-192, 2005.

DEKLERK, G.J.; TERBRUGGE, J.; MARINOVA, S. Effectiveness of indolacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* ‘Jork 9’, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.49, n.1, p.39-44, 1997.

del POZO J.C.; LOPEZ-MATAS, M.A.; RAMIREZ-PARRA, E.; GUTIERREZ, C. Hormonal control of the plant cell cycle. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 123, p. 173-183, 2005.

EADY, C.C.; LISTER, C.E. A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo-derived cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, p.117-121, 1998.

ECHER, F.R.; FOLONI, J.S.S.; CRESTE, J.E.; BOGIANI, J.C. Fontes de potássio na adubação de cobertura do algodoeiro. i: atributos biométricos e componentes de produção. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7., 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados: **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2009. p. 1938-1943.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Enraizamento in vitro de marmeleiro C.V. MC como porta enxerto para a pereira e aclimação das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1443-1449, 2004.

FAO, 2000a. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/X4565E/x4565e03.htm>>. Acesso em: 20 Nov. 2009.

FAO, 2000b. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/X4565E/x4565e04.htm>>. Acesso em: 20 Nov. 2009.

FAO, 2001. Disponível em: <www.fao.org/forestry/foris/data/.../GlobalForestA4-SPsmall.pdf>. Acesso em: 20 Nov. 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília-DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FERRIE, A.M.R.; PALMER, C.E.; KELLER, W.A. Haploid embryogenesis. - In: THORPE, T.A. (Ed.) ***In vitro Embryogenesis in Plants***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishes, 1995. p. 309-344.

FERRY, N. EDWARDS, M.G.; GETEHOUSE, J.; CAPELL, T. CHRISTOU, P.; GETEHOUSE, A.M. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Trasgenic Research**, Madrid, v. 15, p.13-19, 2006.

FILHO, A.A.T.; SILVA, M.L.; COUTO, L.; MULLER, M.D. Análise econômica de um plantio de teca. **Revista da Madeira**, Curitiba-PR, n.106, p.90-91, 2007.

FOFANA, I. J.; OFORI, D.; POITEL, M.; VERHAEGEN, D. Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis* L.f) in its natural range using DNA microsatellite markers. **New Forests**, Stillwater, n. 37, p.175–195, 2009.

FURLAN, R.A.; MORI, E.S.; TAMBARUSSI, E.V.; MORAES, C.B.; JESUS, F.A; ZIMBACK, L. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* por meio de marcadores microssatélites. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n.4, p.553-563, 2007.

GARCÍA, J.L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.69, p.95-100, 2002.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. . Dordrecht, The Netherlands, 2007. v.1 504p.

GIRI, C.C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, B. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, Berlin, n.18, p.115-135, 2004.

GONÇALVES, P.S.L. **Divergência genética e efeito do nitrogênio total no crescimento *in vitro* de ipeca** (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes). 2002. 83p. Dissertação (Mestrado na área de) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

GRACE, L.J.; CHARITY, J.A.; GRESHAM, B.; KAY, N. WALTER, C. Insect-resistant transgenic *Pinus radiata*. **Plant Cell Report**, Berlin, n.24, p. 103-111, 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 175-200.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH, 1998. v.1 p.183–260.

GRATTAPAGLIA, D.; PLOMION, C.; KIRST, M.; SEDEROFF, R.R. Genomics of growth traits in forest trees. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v.12, p.148–156, 2009.

GUPTA, B.N.; KUMAR A. Estimation of potential germination of teak (*Tectona grandis* L.f.) fruits from twenty three Indian sources by cutting test. **Indian Forester**, Dehradun, n. 102, p.808-813, 1976.

GUPTA, P.K.; NADGIR, A.L.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANATHAN, V. Tissue culture of forest trees – Clonal multiplication of *Tectona grandis* (teak) by tissue culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, n. 17, p. 259-268, 1980.

HALCOMB, J. L.; BENEDICT, J. H.; COOK, B.; RING, D. R. Survival and growth of bollworm and tobacco budworm non-transgenic and transgenic cotton expressing CryI δ insecticidal protein (Lepidoptera:Noctuidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 25, n. 2, p.250-255, 1996.

HERRERO, S.; OPPERT, B. FERRÉ, J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.3, p. 1085-1089, 2001.

HOFFMANN, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Resposta *in vitro* e susceptibilidade ao *Agrobacterium* de duas cultivares de *Stylosanthes goianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p.733-742, 2000.

HIGUCHI, M.; PISCHKE, M.S.; MÄHÖNEN, A.P.; MIYAWAKI, K.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; SHINOZAKI, K.; KATO, T.; TABATA, S.; HELARIUTTA, Y.; SUSSMAN, M.R.; KAKIMOTO, T.K. In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, p. 8821-8826, 2004.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 85, n. 21, 7844–7848, 1988.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, Washington, v.53, n.2, 242–255, 1989.

HOLFORD, P.; NEWBURY, H.J. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. **Plant Cell Report**, Berlin, v.11, p.93-96, 1992.

HOWELL, S.H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, England, v.8, n.9, 2003.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v.1 p.177-227

HUMARA, J.M.; ORDÁS, R.J. The toxicity of antibiotics and herbicides on in vitro adventitious shoot formation on *Pinus Pinea* L. cotyledons. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 35, p. 339-343, 1999.

HYBLAEA, 2007,Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Hyblaea_puera>>Acesso em: 29 nov. 2009.

IBRAHIM, R.; DEBERGH, P.C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.88, p.41-57, 2001.

JAVAREGOWDA, L.; NAIK, L.K. Seasonal Incidence of Teak Defoliator, *Hyblaea puera* Cramer (Hyblaeidae: Lepidoptera) in Uttara Kannada District of Karnataka. **Karnataka Journal Agricultural Sciences**, Karnataka, v. 20, n.1, p.153-154, 2007.

JOSÉBIO, R.L.G.M.; VENTURIM, N.; GOMES, B.G.S.E. Desenvolvimento em diferentes espaçamentos. **Revista da Madeira**, Curitiba-PR, n.106, p.104-105, 2007.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science** , Limerick, v.131, p. 1–11, 1998.

KALIA,S; LAL, R.B. Efficacy of three varietals toxins of *Bacillus thuringiensis* tested against some important forest insect pests of multipurpose forest tree species. **Indian Forester**, Dehradun, v.126, p. 62-66, 2000.

KAOSA-ARD, A. **Teak, Tectona grandis Linn. f.** Virginia: Forestry Institute, Arlington, Nursery Tech Winrock International, USA, 1986. p.106-118.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, New York, v.27, p.137-138, 1965.

KASTEN, B.; RESKI, R. Beta - lactam antibiotics inhibit chloroplast division in a moss (*Physcomitrella patens*) but not in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.150, p. 137-140, 1997.

KEOGH, R. **Teak 2000**. Amsterdam, Netherlands:Amazona Teak Foundation, 1996.

KIM, K.H.; LEE, Y. H.; KIM, D.; PARK, Y. H; LEE, J.Y.; HWANG, J. S.; KIM, Y.H. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. **Plant Cell Report**, Berlin, v.23, p.386-390, 2004.

KONG, L.; DAI, D.; SHANG, M.; LI, K.; ZHANG, C.X. Thidiazuron-induced somatic embryos, their multiplication, maturation, and conversion in *Cinnamomum pauciflorum* Nees (Lauraceae). **New Forests**. Stillwater, v.38, p.131-142, 2009.

KUCHARSKA, D.; ORLIKOWSKA, T. Enhancement of in vitro organogenetic capacity of rose by preculture of donor shoots on the medium with thidiazuron. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v.31, p.495-500, 2009.

KUSHALKAR, R.; SHARON, M. Direct and indirect somatic embryogenesis in teak (*Tectona grandis* L.). **Current Science**, Bangalore, v.71, p. 712-715, 1996.

LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos Trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas - possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado**. Eachborn, 1990. 343p.

LEMOS, E.E.P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, p. 105-112, 1998.

LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.268-271, 2000a.

LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, p.63-67, 2000b.

LI, N.Z.; FANG, F.; LIU, G.F.; BAO, M.Z. Stable *Agrobacterium*-mediated genetic Transformation of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). **Plant Cell Report**, Berlin, v. 26, p.641-650, 2007.

LIN, J-J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the plant transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, Limerick, v.109, p. 171-177, 1995.

LING, H. Q., KRISELEIT, D. AND GANAL, M.W. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Report**, Berlin, v. 17, p.843-847, 1998.

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

LOGANATHAN, J.; DAVID, P.M.M. Laboratory and Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* Berliner products against the teak defoliator *Hyblaea puera* Cramer. **Insect Science and its Application**, Nairobi, v. 20, p. 61-65, 2000.

LORENCE, A.; DARSZON, A.; DI´AZ, C.; LIE´BANO, A.; QUINTERO, R.; BRAVO, A. δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. **FEBS Letter**, Oxford, v.360, p.217-222, 1995.

LOWE A.; DAVIES, S.; VOLKAERT, H. Teakdiv—Developing know-how for the improvement and sustainable management of teak genetic resources. **Proceedings of the international conference on quality timber products of teak from sustainable forest management**, Peechi, Índia, v. 2/5, p. 361–365, 2003.

MÄHÖNEN, A.P.; BONKE, M.; KAUPINNEN, L.; RIIKONEN, M.; BENFEY, P.N.; HELARIUTTA, Y. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. **Genes & Development**, New York, v.14, p. 2938-2943, 2000.

MAMIDALA, P.; NANNA, R.S. Efficient *in vitro* plant regeneration, flowering and fruiting of dwarf Tomato cv. Micro-Msk. **Plant Omics Journal**, Lindfield, v.2, p.98-102, 2009.

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, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MASCARENHAS, A. F., MURALIDHARAN, E.M. Clonal forestry with tropical hardwoods. In: _____ **Clonal forestry II, conservation and application**. Germany: Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1993. p.169-187.

MASCARENHAS, A.F.; KENDURKAR, S.V.; GUPTA, P.K.; KHUSPE, S.S.; AGRAWAL, D.C. Teak. In: _____ **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 3, Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ, 1987. p.300-315.

MAZIER, M.; PANNETIER, C.; TOURNEUR, J.; JOUANIN, L.; GIBAND, M. The expression of *Bacillus thuringiensis* toxin genes in plant cells. **Biotechnology Annual Review**, Tromso, v.3, p.313–347, 1997.

MELLO, O.M.; DIAS, C.T.S.D.; AMARAL, A.F.C.; MELO M. Growth of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. cell suspension culture with carbon sources. **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 1-11, Sept. 2001.

MENDES, A.F.S.; CIDADE, L.C.; de OLIVEIRA, M.L.P.; OTONI, W.C.; SOARES-FILHO, W. S.; COSTA, M.G.C. Evaluation of novel beta-lactam antibiotics in comparison to cefotaxime on plant regeneration of *Citrus sinensis* L. Osb. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.97, p.331–336, 2009.

MERCÚRIO, 2009. Disponível em: < <http://www.areaseg.com/toxicos/mercurio.html> >. Acesso em: 20 nov. 2009.

MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood Tree Biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, n.41, p.602-619, 2005.

MILBORROW, B.V.; PURSE, J.G.; WIGHTMAN, F. On the auxin activity of phenylacetic acid. **Annals of Botany**, London, n.39, p.1143-1146, 1975.

MIRANDA, J.; KONSCHUH, M.N.; YEUNG, E.C.; CHINNAPPA, C.C. In vitro plantlet regeneration from hypocotyls explants of *Stellaria longipes* (Caryophyllaceae). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, n. 2, p.318–322, 1999.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36/37, p. 5-10, 2000.

MORI, E. S. **Variabilidade genética de uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção.** 1993. 119p. Tese (Doutorado- Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

MUMINOVA, M.; NASRETDINOVA, M.; JATAEV, S. D.; ABDUKARIMOV, A. Somatic embryogenesis from callus cultures of Teak (*Tectona grandis* L. f.) derived from leaf explants. **Asian Journal of Plants Sciences**, Faisalabad, Pakistan, n.2, p. 184-187, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Copenhagen, n.15, p.473-497, 1962.

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

NAIK, J.L.K. Efficacy of Biobit Against Teak Defoliator, *Hyblaea puera* Cramer. **Karnataka Journal Agricultural Sciences**, Karnataka, v 21, n.1, p.134-136, 2008.

NAIR, K.S.S.; SUDHEENDRAKUMAR, V.V.; VARMA, R.V.; CHACKO, K.C. **Studies on the seasonal incidence of defoliators and the effect of defoliation on volume increment of teak.** Kerala Forest Research Institute, Vazhuthacaud, Índia, 1985. 78p. (KFRI Research Report, 30.)

NAIR, V.R.K. Utilization aspects of Teak. **Proceedings of the Intitute Teak Symposium.** Thiruvananthapuram, Índia, p. 179-184, 1997.

NASCIMENTO, P.K.V.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G.; Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.

NAUERBEY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, Limerick, v.123, p.169-177, 1997.

NEHRA NS, BECWAR MR, ROTTMANN WH, PEARSON L, CHOWDHURY K, CHANG SJ, WILDE HD, KODRZYCKI RJ, ZHANG CS, GAUSE KC, PARKS DW, HINCHEE MA. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, Columbia, v.41, v.701–717, 2005.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomertata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.

NICOLOSO, F.T; ERIG, A.C.RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras. V.27, n.1, p.84-90, jan./fev., 2003.

- NORWATI, A.; ABDULLAH, R.; MOHD ROSLI, H. NORLIA, B. Genetic transformation of cry1A (b) gene into teak. **Molecular Plant Breeding**, Haixiu Dadao, Haikou City, n.1, p.53-57, 2003.
- NORWATI, A.; ABDULLAH, R.; MUHAMMAD, N.; BASHERUDIN, N. A biolistic approach for the transfer and expression of uidA gene in nodal segments of teak (*Tectona grandis*). **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, Kuala Lumpur, v. 15, n.3, p.115-120, 2007.
- NOTÍCIAS, 2007, Disponível em: <<http://www.madeiratotal.com.br/noticia.php?id=70563>> Acesso em : 11 nov. 2009.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Leipzig, v.59, p. 368-373, 1965.
- OLIVEIRA, L.C. Teca é a nova opção na indústria mundial. **Revista da Madeira**. Curitiba, n. 106, p.81-86, 2007.
- OLIVEIRA, L.C.; ANGELI, A.; STAPE, J.L. Teca é nova opção na indústria mundial. **Revista da madeira**, Curitiba-PR, v.106, p.81-86, 2007.
- PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 159-167, 2003.
- PAIVA, R. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=489>>. Acesso em: 30 nov.2009.
- PASQUAL, M.; BARROS, I de. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos in vitro em barbatimão (*Struphnodendron adstringens* (Mart.) coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 27, n. 7, p. 1017-1019, jul. 1992.
- PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.15, p. 173-177, 1997.
- PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E.; Ocorrência de *Hyblaea puera* (Cramer, 1777) (*Lepidoptera Hyblaeidae*) em teca no Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n.1, p. 59-60, 2002.
- PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; PETERSEN, L.J.; PARKER, G.B.; MCPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISCHHOFF, D.A. Genetically improved potato protection from damage by Colorado potato beetle. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.22, p.313-321, 1993.
- PIJUT, P.M.; WOESTE, K.E.; VENGADESAN, G.; MICHLER, C.H. Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 43, n. 4, p. 283-303, 2007.

- POCTRYCUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 205-225, 1991.
- POLANCZYK, R.A.; ALVES, S.B. **Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)**, 2005, n.74. p.24 -33.
- POUPIN, M.J.; ARCE-JOHNSON, P. Transgenic Trees for a New Era. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, n.41, p.91-101, 2005.
- PRATHANTURARUG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHUAKUL, W.; PHAIDEE, Y.; SARALAMP, P. High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron. **Plant Cell Report**, Berlin, v.21, p.1054–1059, 2003.
- PRATHANTURARUG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHUAKUL, W.; PHAIDEE, Y.; SARALAMP, P. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants precultured in thidiazuron supplemented liquid medium. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 80, p.347-351, 2005.
- QUISEN, R.C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 146p. Tese (Doutorado- Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.
- RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v.38, p.116-124, 2002.
- RAMESH, M., UMATE, P., VENUGOPAL RAO, K. AND SADANANDAM, A. Micropropagation of *Terminalia bellirica* roxb. - A sericulture and medicinal plant. **Asian Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, Pakistan, v.2, p.184-187, 2003.
- RANJEKAR, P. K.; PATANKAR A.; GUPTA V.; BHATNAGAR R.; BENTUR J.; ANANDA KUMAR, P. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, Bangalore, v. 84, n. 3, p. 321-329, 2003.
- RAO, R.N.; ALLEN, N.E.; HOBBS, J.N.; ALBORN, W.E.; KIRST, H.A.; PASCHAL, J.W. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington DC, v. 24, n. 5, p. 689-695, 1983.
- RAWAT, M.S.; UNİYAL, D.P.; SHARMA, S.L. Identification of provenances based on leaf morphology in *Tectona grandis*. **Indian Forester**, Dehradun, n.124, p.248-251, 1998.
- RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; LLING, T.S. Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism. **The Plant Cell**, v.18, p.40-54, 2006.
- ROBERT, M.L.; FLORES, M.R.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Growth promoting activity of certain penicillins on cultivated cells of *Bouvardia ternifolia*. **Phytochemistry**, New York, v. 28, p. 2659-2662, 1989.

ROCHA, M.P. da; TRUGILHO, P.F. Qualidade de madeira serrada de *Eucalyptus dunnii* em função do método de desdobro e condição de umidade. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 314-321, 2006.

RODRIGUES, M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; MARTINOTTO, C.; JÚNIOR, J.M.S. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.1, p.21-26, 2009.

ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 293-296, 2003.

ROMEIS, J.; MEISSE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, n. 24, p.63–71, 2006.

RONDON NETO, R.M.; MACEDO, R.L.G.; TSUKAMOTO FILHO, A.A. Formação de povoamentos florestais com *Tectona grandis* L. f. (Teca). **Boletim Técnico - Série Extensão**, Lavras, v. 7, n. 33, p. 1-29, 1998.

RUAUD Y. J. N. ; PEPPER S. ; POTTS B. M. ; BORRALHO N. M. G. Genetic variation of *in vitro* rooting ability with time in *Eucalyptus globulus*. **Silvae Genética**, Frankfurt, v.48, p.4-7, 1999.

SACCHI, V.F.; PARENTI, P.; HANOZET, G.M.; GIORDANA, B.; LÜTHY, P.; WOLFERSBERGER, M.G. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. **FEBS Lett.** Oxford, n.204, p.213–218, 1986.

SAMPAIO, A.J. A Teca na Índia e no Brasil. **Revista Florestal**. Rio de Janeiro, v.1, n.9, p.7-10, 1930.

SAMPAIO, P.T.B.; RESENDE, M.D.V.; ARAÚJO, A.J. Estimativas de parâmetros genéticos e métodos de seleção para o melhoramento genético de *Pinus Caribaea* var. *Hondurensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2243-2253, 2000.

SAN-JOSE, C.M.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. **Journal Horticulture Science and Biotechnology**, United Kingdom, v.76, p.588-595, 2001.

SANTHAKUMARAN, L.N.; RAO, K.S.; SRINIVASAN, V.V. Performance of Teak in marine exposure trials in Indian waters and some aspects of its utilization. **Proceedings International Teak Symposium**, Thiruvananthapuram, India, 1997. p. 185-190.

SCHLEDER, C. **Floresteca**: uma década de teca. Indaiatuba: Floresteca, 2004. 97p.

SCHUBERT, T.H. *Tectona grandis*, teak. In: SCHOPMEYER C.S.(Coord.) **Seeds of woody plants in the United States**. Washington, DC: USDA Forest Service, 1974. p. 803-804. (Agricultural Handbook, 450)

SENGUTTUVAN, T., CHINNIAH, C., VARMA, R.V.; NAIR, K.S.S. Knock Down toxicity of insecticides and B.t. formulations of larvae of teak defoliator, *Hyblaea puera* **Indian Journal Forestry**, Dehradun, v.23, p.160-163, 2000.

SHAN, Z.; RAEMAKERS, K.; TZITZIKAS, E.N.; MA, Z.; VISSER, R.G.F. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). **Plant Cell Report**, Berlin, v.24, p. 507–512, 2005.

SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K. In vitro clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal Forest Research**, Tokyo, v.10, n.6, p.465–469, 2005.

SIEBERER, T.; HAUSER, M.T.; SEIFERT, G.J.; LUSCHNIG, C. PROPORZ1, a Putative *Arabidopsis* Transcriptional Adaptor protein, Mediates Auxin and Cytokinin Signals in the Control of Cell Proliferation. **Current Biology**, United Kingdom, n. 13, p.837–842, 2003.

SIEGEL, J.P. The mamalian safety of *Bacillus thuringiensis* – based inseticicides. **Journal of Vertebrate Pathology**, New York, v. 77, p.13-21, 2001.

SILVA, E.R.L. **Técnicas para avaliação *in vitro* de produtos fitossanitários em *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***. 2006. 125p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2006.

SILVER, W.L.; KUEPPERS, L.M.; LUGO, A.E.; OSTERTAG, R.; MATZEK, V. Carbon sequestration and plant community dynamics following reforestation of tropical pasture. **Ecological Applications**, Washington, v.14, n.4, p. 1115–1127, 2004.

SINGH, A.K.; CHAND, S.; PATTNAIK, S.; CHAND, P.K. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber yielding tree legume. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, p.203-209, 2002.

SINGH, S.; SAWHNEY, V.K. Endogenous hormones in seeds, germination behaviour and early seedling characteristics in a normal and ogura cytoplasmic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p.1497-1505, 1992.

SOBROSA, R. de C.; CORDER, M.P.M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.10, p.58-68, 2003.

SOFIATTI, V.; ARAUJO, E.F.; ARAUJO, R.F.; REIS, M.S.; SILVA, L.V.B.D.; CARGNIN, A. Uso do hipoclorito de sódio para degradação do endocarpo de sementes de cafeeiro com diferentes graus de umidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 30, n. 1, p.150-160, 2008.

SOUSA, P. B. L.; SANTANA, J. R. F.; CREPALDI, I. C.; LIMA, A. R. Germination *in vitro* of seeds of a threatened arboreal specie in the municipal district of Abaíra (BA). **Sitientibus**, Feira de Santana, v.20, p.89-99, 1999.

SPOKEVICIUS AV, VAN BEVEREN K, LEITCH MA, BOSSINGER G. Agrobacterium-mediated in vitro transformation of wood-producing stem segments in eucalypts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 617-624, 2005.

SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.1-11, 1998.

SWARTZ, H.J.; BORS, R.; MOHAMED, F.; NAESS, S.K. The effect of in vitro pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, p.179-184, 1990.

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v.26, n.2, p. 199-202, 2008.

TAKAHASHI, N.; YAMAGUCHI, I.; YAMANE, H. Gibberellins. In: TAKAHASHI, N. (Ed.) **Chemistry of plant hormones**. Boca Raton: CRC Press, 1988. cap. 3 p.57-151.

TECA. Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Teak>>. Acesso em: 25 set . 2009.

TERESO, S.; MIGUEL, C.; MAROCO, J.; OLIVEIRA, M.M. Susceptibility of embryogenic and organogenic tissues of maritime pine (*Pinus pinaster*) to antibiotics used in Agrobacterium-mediated genetic transformation. **Plant Cell Tissue and Organe Culture**, Dordrecht, v.87, p.33-40, 2006.

THOMAS, T.D. Pretreatment in thidiazuron improves the in vitro shoot induction from leaves in *Curculigo orchoides* Gaertn., an endangered medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 29, p.455-461, 2007.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

TIWARI, S.K., TIWARI, K.P. AND SIRIL, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Gordrecht, n.71, p.1-6, 2002.

TROUP, R.S. **The silviculture of Indian trees**. Dehradum: 2006. v.2 1196p.

TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMANN, A. Forestry biotechnology: genetic transformation and its application to future forest. **Trends Biotechnology**, London, v.16, p. 439-446, 1998.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, n.5, 1378–1385, 1990.

VERGAUWE, A.; VAN GELDRE, E.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN DEN EECKHOUT, E. The use of amoxicillin and ticarcillin in combination with a β -lactamase inhibitor as decontaminating agents in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v.52, p. 89-95, 1996.

VERVLIET, G.; HOLSTERS, M.; TEUCHY, H.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*. **Journal of General Virology**, London, v.26, p.33-48, 1975.

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

WEAVER, P.L. *Tectona grandis* L.f. **Teak**. New Orleans, LA: US. Departamento f Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1993. 18p.

WENCK, A.R.; QUINN, M.; WHETTEN, R.W.; PULLMAN, G.; SEDEROFF, R. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.39, p.407-416, 1999.

WIGHTMAN, F.; LIGHTY, D.L. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.55, p.17-24, 1982.

WILHELM, E. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v.57, p.57-60, 1999

XIA, D.; XIAO-YANG, C.; ZHI-YAN, L.W.D. Effects of antibiotics on plantlet regeneration via organogenesis in *Populus euphratica*. **Forestry Studies in China**, Beijing, v.8, n.1, p.27-31, 2006.

ZHI-NENG, L.; GUO-FENG, L.; FANG, F.; MAN-ZHU, B. Adventitious shoot regeneration of *Platanus acerifolia* Willd. facilitated by Timentin, an antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. **Forestry Studies in China**, Beijing, v.9, p.14-18, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1- Resumo da análise de variância para a porcentagem de contaminação (PE) e germinação (GE) de sementes de *T. grandis* em função do tempo de exposição e concentração de cloro ativo

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		PE ⁽¹⁾	GE ⁽¹⁾
TEM	3	0,0500 ^{ns}	0,1994 ^{ns}
COM	3	1,7285 ^{**}	1,2806 ^{**}
TEM * CON	9	0,0116 ^{ns}	0,0839 ^{ns}
Resíduo	45	0,0238	0,0990
Média	—	37,70	52,44
CV _{exp.} (%)	—	28,43	50,65

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $((n+0,5)/100)^{0,5}$ pelo teste de Hartley, ao nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 2- Resumo da análise de variância para alturas de plântulas de *T. grandis*, cultivadas em diferentes concentrações salinas (MS, WPM e JADS)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Altura das plântulas <i>in vitro</i>
Altura	2	29.6810 ^{**}
Resíduo	117	0.6863
Média	—	0.6863
CV _{exp.} (%)	—	12.17602

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 3- Resumo da análise de variância para números de gemas axilares de plântulas de *T. grandis* cultivadas em diferentes concentrações salinas (MS, WPM e JADS)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Número de gemas de plântulas <i>in vitro</i>
Número de gemas	2	11.4333**
Resíduo	117	0.1111
Média	—	11.4333
CV _{exp.} (%)	—	9.4339

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 4- Resumo da análise de variância para a porcentagem de regeneração de *T. grandis* em meio MS suplementado com eficientes concentrações de BAP, ANA e tipo de explante (TE)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Porcentagem ⁽¹⁾
BAP	6	0,0198**
ANA	5	0,1020**
TE	4	0,0287**
BAP * ANA	30	0,0178**
BAP * TE	24	0,0166**
ANA * TE	20	0,0333**
BAP * ANA * TE	120	0,0169**
Resíduo	840	0,0023
Média	—	0,79
CV _{exp.} (%)	—	58,96

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $((n+0,5)/10)^{0,5}$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 5 - Resumo da análise de variância para o número de brotos (NB) e altura (ALT) de explantes de *T. grandis* em meio MS suplementado com eficientes concentrações de BAP, ANA e tipo de explante (TE)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		NB	ALT
BAP	6	0,1064**	0,0171**
ANA	5	0,5469**	0,1012**
TE	4	0,1664**	0,0282**
BAP * ANA	30	0,1157**	0,0147**
BAP * TE	24	0,0971**	0,0124**
ANA * TE	20	0,2026**	0,0327**
BAP * ANA * TE	120	0,0932**	0,0128**
Resíduo	840	0,0118	0,0031
Média	—	0,07	0,02
CV _{exp.} (%)	—	14,81	7,85

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $(n+0,5)^{0,5}$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 6 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de *T. grandis* em meio MS suplementado com TDZ e BAP (0,0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
Tratamento	4	723,13**
Resíduo	45	70,92
Média	—	41,44
CV _{exp.} (%)	—	20,32

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 7 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de regeneração de explantes de *T. grandis* em função do meio de germinação (MG), tipo de explante (TE) e meios de regeneração (MR)

Causas da Variação	GL	Porcentagem de Regeneração ⁽¹⁾
		(%)
MG	4	1,1598 ^{**}
TE	2	2,9194 ^{**}
MR	15	0,3365 ^{**}
MG * TE	8	0,2383 ^{**}
MG * MR	60	0,0979 ^{**}
TE * MR	30	0,1121 ^{**}
MG * TE * MR	120	0,0634 ^{**}
Resíduo	960	0,0367
Média	—	9,02
CV _{exp.} (%)	—	99,14

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $((n+0,5)/100)^{0,5}$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 8 - Resumo da análise de variância para o número de brotos de explantes de *T. grandis* em função do meio de germinação (MG), tipo de explante (TE) e meios de regeneração (MR)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Número de Brotos ⁽¹⁾
		(%)
MG	4	0,7294**
TE	2	3,9510**
MR	15	0,2960**
MG * TE	8	0,1629**
MG * MR	60	0,0704**
TE * MR	30	0,1645**
MG * TE * MR	119	0,0611**
Resíduo	726	0,0039
Média	—	0,98
CV _{exp.} (%)	—	15,15

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $\log(n+2)$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 9 - Resumo da análise de variância para altura explantes de *T. grandis* em função do meio de germinação (MG), tipo de explante (TE) e meios de regeneração (MR)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Altura ⁽¹⁾ (cm explante ⁻¹)
MG	4	0,3552**
TE	2	0,5472**
MR	15	0,0725**
MG * TE	7	0,0518**
MG * MR	60	0,0186**
TE * MR	30	0,0369**
MG * TE * MR	104	0,0181**
Resíduo	690	0,0006
Média	—	0,38
CV _{exp.} (%)	—	6,78

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $\log(n+2)$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 10 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de regeneração de *T. grandis* em função do tipo de explante (EXP) e fonte de carbono (FON)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Porcentagem de Explantes ⁽¹⁾
EXP	2	0,1032 ^{ns}
FON	5	0,2456 ^{**}
EXP * FON	10	0,0483 ^{ns}
Resíduo	54	0,0425
Média	—	10,5
CV _{exp.} (%)	—	90,52

^{ns} valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $((n+0,5)/100)^{0,5}$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 11 - Resumo da análise de variância para os explantes de *T. grandis* em função do tipo de explante (EXP) e concentração de higromicina (CON)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Explantes Resp.
EXP	2	0,0790 [*]
COM	8	0,3895 ^{**}
EXP * COM	16	0,0106 ^{ns}
Resíduo	51	0,0196
Média	—	9,73
CV _{exp.} (%)	—	65,81

^{ns} valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

^{*} e ^{**} valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $((n+0,5)/100)^{0,5}$ pelo teste de Hartley, ao nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 12 - Resumo da análise de variância para porcentagem de regeneração de *T. grandis* em função da concentração de antibiótico (CA) e tipo de explante (TE)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Porcentagem de Regeneração (%)
CA	9	6.090,30 ^{**}
TE	2	9.825,50 ^{**}
CA * TE	18	374,02 ^{**}
Resíduo	120	239,58
Média	—	30,60
CV _{exp.} (%)	—	50,58

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 13 - Resumo da análise de variância para o número de brotos de *T. grandis* em função da concentração de antibiótico (CA) e tipo de explante (TE)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Número de Brotos (explante ⁻¹)
CA	9	20,69 ^{**}
TE	2	0,10 ^{ns}
CA * TE	18	1,01 ^{**}
Resíduo	107	0,39
Média	—	1,74
CV _{exp.} (%)	—	36,06

^{ns} valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 14 - Resumo da análise de variância para altura de brotos de *T. grandis* em função da concentração de antibiótico (CA) e tipo de explante (TE)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Altura (cm explante ⁻¹)
CA	9	11,21 ^{**}
TE	2	3,04 ^{**}
CA * TE	18	0,91 ^{**}
Resíduo	120	0,14
Média	—	1,29
CV _{exp.} (%)	—	29,46

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 15- Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento (PR) e número de raízes (NR) de explantes de *T. grandis* em função de ANA e AIB

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		PR ⁽¹⁾	NR ⁽²⁾
Tratamento	6	0,1998 ^{**}	0,5312 ^{ns}
Resíduo	29	0,0528	0,2272
Média	—	47,24	3,19
CV _{exp.} (%)	—	36,27	25,77

^{**} valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ e ⁽²⁾ dados transformados por $((n+0,5)/100)^{0,5}$ e $(n+0,5)^{0,5}$, respectivamente pelo teste de Hartley, ao nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

ANEXO 16 - Resumo da análise de variância para peso de lagartas de *H. puera*, inoculadas em esporos de *B. thuringiensis* após 24 horas

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		Peso
Peso	6	0.1242**
Resíduo	42	0.0044
Média	—	0.125
CV _{exp.} (%)	—	102.7202

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.