

TIPOS DE VEDAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO CULTIVO *in vitro* DE *Tectona grandis* L.f.

Dayane Ávila Fernandes¹, Patrícia Helena de Azevedo¹, Reginaldo Brito da Costa¹, Gilvano Ebling Brondani¹

¹Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá - MT, E-mail: dayavila1@hotmail.com; patriciaazevedo@cpd.ufmt.br; gebrondani@yahoo.com.br, diegotyszka@hotmail.com, reg.brito.costa@gmail.com

RESUMO

O presente estudo objetivou testar concentrações de sacarose e tipos de vedação dos frascos no cultivo *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x6), sendo dois tipos de vedação (tampa com filtro e tampa sem filtro) e seis concentrações de sacarose (0, 6, 12, 18, 24 e 30 mg.L⁻¹), totalizando doze tratamentos com dez repetições. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS e mantidos por 35 dias em sala de crescimento com temperatura de 30 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h. As seguintes variáveis foram determinadas: comprimento de broto (cm), número de entrenós e matéria seca dos brotos (mg). Os melhores resultados foram obtidos com o uso da tampa com filtro. Para cada variável, a melhor concentração de sacarose foi diferente. Na concentração de 17 mg.L⁻¹ de sacarose, os brotos apresentaram 4,1 cm de comprimento. Na concentração de 18 mg.L⁻¹, o número de entrenós, foi de 4,6 e para a matéria seca, a melhor concentração foi 30 mg.L⁻¹, com média de 0,0162 mg. Os melhores resultados foram obtidos com 18 mg.L⁻¹ de sacarose e a tampa plástica com filtro.

Palavras-chave: *Tectona grandis*, micropropagação, tampa, filtro

TYPES OF PACKING AND CONCENTRATION OF SUCROSE IN CULTURE *in vitro* OF *Tectona grandis* L.f.

ABSTRACT

This research was carried out to test sucrose concentrations and types of sealing bottles used for *in vitro* cultivation of teak (*Tectona grandis* L.f.). The experimental design was completely randomized in a 2 x 6 factorial, two types of seal (lid with filter and lid without filter) and six sucrose concentrations (0, 6, 12, 18, 24 and 30 mg.L⁻¹) totaling twelve treatments with ten repetitions each. The explants were cultured on MS medium and kept for 35 days in a growth chamber with a temperature of 30 ± 2 °C and 16 h photoperiod. The following variables were determined: length of shoot (cm), number of internodes and dry weight of shoots (mg). The best results were obtained with the use of the cover with filter. For each variable, the best sucrose concentration was different. At the concentration of 17 mg.L⁻¹ sucrose, sprouts showed 4.1 cm in length. At the concentration of 18 mg.L⁻¹, the number of internodes, was 4.6 and for the dry matter, the best concentration was 30 mg.L⁻¹, with an average of 0.0162 mg. The best results were obtained with 18 mg.L⁻¹ sucrose and the plastic cover with filter.

Keywords: *Tectona grandis*, micropropagation, lid, filter

INTRODUÇÃO

A teca (*Tectona grandis* L.f.) é uma espécie florestal pertencente à família Lamiaceae, que possui distribuição natural nas florestas tropicais de monção do sudeste asiático da Índia, Vietnã, Myanmar, Laos e Tailândia, sendo também encontrada em cultivo nos trópicos (FERNANDES *et al.*, 2011; KOK, 2009; PANDEY & BROWN, 2000; SHUKLA *et al.*, 2011). Trata-se de uma espécie florestal com potencial produtivo e boa adaptação em regiões tropicais, apresentando grande porte, rápido crescimento, produtora de madeira nobre, com tronco retilíneo, fácil de cultivar e pouco sujeita às pragas e doenças (BAILEY & HARJANTO, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; DIÉ *et al.*, 2012; FAVALESSA *et al.*, 2012; KHANDURI *et al.*, 2008; MACEDO *et al.*, 2005; SHUKLA *et al.*, 2011).

A propagação clonal de teca surgiu como uma estratégia que apresentou ganhos consideráveis na obtenção de mudas e homogeneidade dos plantios, principalmente ao considerar a maximização da produção em virtude da manutenção das características selecionadas, o que reduz a variabilidade genética comparada às árvores produzidas a partir de sementes (HARTMANN *et al.*, 2011; HUSEN & PAL, 2006; HUSEN & PAL, 2007; SINGH *et al.*, 2006).

Dentre as técnicas de clonagem, a micropropagação destaca-se por proporcionar avanços biotecnológicos consideráveis no setor produtivo florestal, principalmente em relação à fidelidade genética (NEHRA *et al.*, 2005; THORPE, 2007), sendo desenvolvidos protocolos para o cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* (AKRAM & AFTAB, 2009; GANGOPADHYAY *et al.*, 2003; GYVES *et al.*, 2007; KOZGAR & SHAHZAD, 2012; MUHAMMAD & FAHEEM, 2012; SHIRIN *et al.*, 2005). Apesar dos elevados custos, a técnica de micropropagação apresenta excelentes aplicações no melhoramento

florestal, justificando o uso para espécies com retorno econômico adequado (DUTRA *et al.*, 2009).

Contudo, plantas cultivadas *in vitro* não possuem controle adequado de concentrações de CO₂ e O₂, resultando em teores insuficientes de clorofila para realizar a fotossíntese de modo a sustentar seu crescimento (GEORGE *et al.*, 2008). Devido a essa baixa capacidade fotossintética, as plantas cultivadas *in vitro* apresentam caráter heterotrófico, pois as fontes de carbono, nutrientes e energia encontram-se disponíveis no meio de cultura (BRONDANI *et al.*, 2012; DUTRA *et al.*, 2009; GREENWAY *et al.*, 2012; HARTMANN *et al.*, 2011).

A sacarose é o carboidrato mais utilizado para a composição do meio de cultura na micropropagação, pois possui elevada solubilidade e rápida metabolização pela maioria dos vegetais (GEORGE *et al.*, 2008; GIRI *et al.*, 2004; MERKLEB & NAIRN, 2005; YASEEN *et al.*, 2013). A síntese de sacarose ocorre em vários órgãos e tecidos, sendo a principal fonte de carbono utilizada na maior parte dos processos biossintéticos da planta, tais como na glicólise e no ciclo de Krebs (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Outro ponto a ser considerado refere-se ao ambiente atmosférico em condições *in vitro* no qual as culturas são cultivadas por longos períodos. O microambiente no interior dos frascos é um importante fator a ser considerado no cultivo *in vitro*, pois pode interferir nas respostas morfofisiológicas das plantas (GEORGE *et al.*, 2008).

Os fatores determinantes para a qualidade do micro-ambiente são os tipos de frasco, os tipos de tampas para a vedação e o volume de meio de cultura. Tampas que vedam totalmente o frasco facilitam a prevenção de contaminações, porém não permitem trocas gasosas adequadas prejudicando o desenvolvimento da planta (MAJADA *et al.*, 1997; ROSSETTO *et al.*,

1992), principalmente devido a saturação com gases que induzem a senescência e/ou vitrificação, como o etileno e CO₂ (KEPCZYŃSKI *et al.*, 2006; KEVERS *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 1996; OGURATSUJITA & OKUBO, 2006; WOJTANIA & WEGRZYNOWICZ-LESIK *et al.*, 2012). Algumas alternativas como perfurar as tampas e preencher o espaço com algodão ou utilizar filtros com microporos para vedar os frascos podem facilitar a troca de gases favorecendo o crescimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro* sem que ocorra a contaminação por microorganismos. Novas alternativas que visem melhorar a qualidade das mudas produzidas e a redução dos custos são desejáveis, sendo importante o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de otimizar a produção de espécies florestais de importância comercial e que podem ser produzidas em escala industrial, como é o caso da cultura da teca.

Baseado no exposto, a presente pesquisa objetivou testar concentrações de sacarose e tipos de vedação dos frascos no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório Bioteca Ltda., situado no município de Várzea Grande, no estado do Mato Grosso, no período de maio a junho de 2012. Para realizar este estudo foi utilizado o clone de teca (*Tectona grandis* L.f.) estabelecido *in vitro*, denominado como clone A (oriundo da Malásia e subcultivado *in vitro* por 5 anos). Os explantes foram constituídos de segmento nodais e padronizados com 1 cm de comprimento e contendo um par de gemas axilares sem as folhas.

Os explantes do clone A foram cultivados no meio de cultura MS, formulado por Murashige & Skoog (1962) testando seis concentrações diferentes de

sacarose (0, 6, 12, 18, 24 e 30 mg.L⁻¹), e pH ajustado para 5,8 previamente a autoclavagem do meio de cultura.

Dois tipos de vedação foram utilizados, (i) uma tampa plástica comum (totalmente vedada) e (ii) uma tampa plástica com uma pequena abertura. A tampa plástica com uma pequena abertura foi caracterizada por um espaço cilíndrico central com cerca de 1,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura com uma pequena perfuração interna coberta com filtro *millipore*, preenchida com algodão e pressionadas com uma rolha de borracha (marca Samavidros[®], modelo Biosama).

O meio de cultura semi-sólido foi acrescido de 7 g.L⁻¹ de ágar e posteriormente esterilizado a uma temperatura de 120 °C ($\approx 1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$) durante 25 minutos. Os recipientes utilizados para inocular os explantes foram frascos de vidro com capacidade de 350 mL, diâmetro externo de 68 mm e altura de 128 mm (modelo NADIR FIGUEIREDO AZ-200[®]). Em cada frasco foi adicionado 40 mL do meio de cultura suplementado com as diferentes concentrações de sacarose propostas anteriormente.

Em sala de crescimento, as culturas foram mantidas em uma prateleira sob temperatura de 30 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas. A intensidade luminosa (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi proporcionada por duas lâmpadas fluorescentes, fixadas a uma distância de 31 cm acima da prateleira.

A matéria seca por plântula (mg), comprimento de broto (cm) e número de entrenós foram avaliados após 35 dias do início dos cultivos *in vitro*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x6), sendo testados dois tipos de vedação dos recipientes e seis concentrações de sacarose, totalizando doze tratamentos com dez repetições. Para realizar este experimento foram repicados 1.440 segmentos nodais do clone A e inoculados

em 120 frascos (sendo 12 explantes por frasco), distribuídos entre os tratamentos.

Os dados coletados foram submetidos aos testes de normalidade (Lilliefors, $P < 0,05$) e homogeneidade (Hartley, $P < 0,05$) e posteriormente à análise de variância ($P < 0,05$ e $P < 0,01$). De acordo com a significância as médias das características amostradas foram submetidas à análise de regressão polinomial ($P < 0,05$). Para a análise estatística utilizou-se o programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que houve interação significativa entre os fatores tipos de vedação e concentrações de sacarose apenas para o comprimento de brotos (cm) e número de entrenós (Tabela 1).

Os comprimentos estimados dos brotos não apresentaram resultados satisfatórios, com um coeficiente de determinação (R^2) moderado

(aproximadamente 0,5), resposta encontrada provavelmente devido a elevada dispersão dos valores médios (Figura 1).

O maior comprimento dos brotos foi observado no tratamento com tampa de filtro e 17 mg.L⁻¹ de sacarose, o que correspondeu a estimativa de 4,1 cm de comprimento. Para a tampa sem filtro resultou em 3,8 cm de comprimento de broto na concentração de 19 mg.L⁻¹ de sacarose. De modo geral, os maiores valores de comprimento de broto foram obtidos com a tampa contendo filtro até cerca de 24 mg.L⁻¹ de sacarose.

Com relação a estes resultados pode-se justificar que o filtro proporcionou maior aeração, permitindo trocas gasosas entre o interior dos frascos e o ambiente externo (GEORGE *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2007). Estas respostas podem ser relacionadas à melhoria nas taxas de transpiração das folhas, além da redução no acúmulo de etileno, que pode ser prejudicial à multiplicação *in vitro* (KEPCZYNSKI *et al.*, 2006; KEVERS *et al.*, 2004; OGURA-TSUJITA & OKUBO, 2006).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para comprimento dos brotos (CB), número de entrenós (NE) e peso da matéria seca (PMS), de brotos de *Tectona grandis* em relação ao tipo de vedação e das concentrações de sacarose, aos 35 dias.

| Causas da Variação | Graus de Liberdade | Quadrados Médios | | |
|--------------------|--------------------|------------------|------------------------------|----------------------------------|
| | | CB (cm) | NE (explante ⁻¹) | PMS (mg explante ⁻¹) |
| Vedação | 1 | 5,2903* | 24,5218** | 6,2867* |
| Sacarose | 5 | 66,4001** | 92,7409** | 49,9629** |
| V x S | 5 | 1,09619** | 3,2872** | 1,4610 ^{ns} |
| Resíduo | 108 | 0,32971 | -0,27017 | 8,08532 |
| Média | - | 3,0 | 3,4 | 10,6 |
| CV (%) | - | 18,9 | 14,8 | 26,7 |

** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. *Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. ^{ns} Não Significativo. V= tipo de vedação e S = concentrações de sacarose.

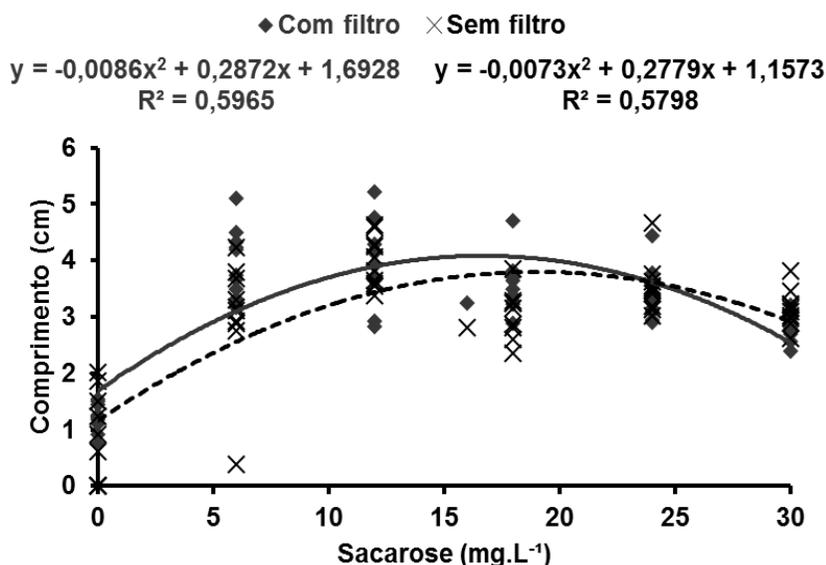


Figura 1. Comprimento dos brotos de *Tectona grandis* em relação ao tipo de vedação da tampa e das concentrações de sacarose, aos 35 dias.

O etileno é um hormônio vegetal que se apresenta em estado gasoso (DAVIES, 2004) e está ligado ao fenômeno de senescência celular (HARTMANN *et al.*, 2011). Dessa forma, o cultivo *in vitro* onde a cultura de interesse permanece em ambiente hermeticamente fechado, não é considerada uma prática adequada e recomendada (MAJADA *et al.*, 1997; ROSSETTO *et al.*, 1992), repercutindo em efeitos negativos ao crescimento e desenvolvimento.

Em um estudo com tomilho (*Thymus vulgaris*), Bandeira *et al.* (2007) verificaram a maior média para altura das plantas com 30 mg.L⁻¹ de sacarose em frascos vedados com algodão, sendo que as concentrações mais elevadas de sacarose para o mesmo sistema de vedação resultaram déficit do crescimento da parte aérea. Conforme George *et al.* (2008), o tipo de vedação utilizada tem grande influência no desenvolvimento da cultura, pois pode determinar o nível de trocas gasosas entre o interior do frasco e o ambiente externo, influenciando a taxa fotossintética.

Para o número de entrenós houve interação significativa entre as tampas (sem filtro e com filtro) com as concentrações de

sacarose. Neste caso, os resultados foram satisfatórios com valores para os coeficientes de determinação R^2 relativamente elevados (aproximadamente 0,7), denotando adequado ajuste do modelo matemático para estimar os pontos médios, com valores médios mais concentrados ao longo da curva de regressão (Figura 2).

Com relação ao número de entrenós dos brotos, o melhor resultado foi obtido com uso da tampa com filtro e 18 mg.L⁻¹ de sacarose, com média de 4,6 entrenós (Figura 2). Na tampa sem filtro o melhor resultado foi para 21 mg.L⁻¹ de sacarose, com cerca de 4,1 entrenós (Figura 2).

Após a concentração de 24 mg.L⁻¹ para ambas as tampas observou-se redução dos valores analisados para a variável número de entrenós. O acúmulo de gases, tais como o etileno, é promovido pela vedação utilizada nos recipientes, que não permitem trocas gasosas com o meio externo (KUMAR *et al.*, 1996; NEPOMUCENO *et al.*, 2009; WOJTANIA & WEGRZYNOWICZ-LESLIAK *et al.*, 2012). Em termos fisiológicos, o etileno provoca redução do alongamento celular (DAVIES, 2004), ocorrendo um acréscimo no número

médio de gemas e de folhas e, dessa forma, o aumento do número de entrenós. O número de entrenós por plântula é considerado um importante parâmetro de crescimento (GEORGE *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2011), que se reflete na taxa de multiplicação de gemas, que constitui um

fator significativo para produção de mudas em larga escala.

As estimativas para a matéria seca dos brotos apresentaram coeficiente de determinação (R^2) satisfatório (aproximadamente 0,6), denotando adequado ajuste do modelo matemático para estimar os pontos médios (Figura 3).

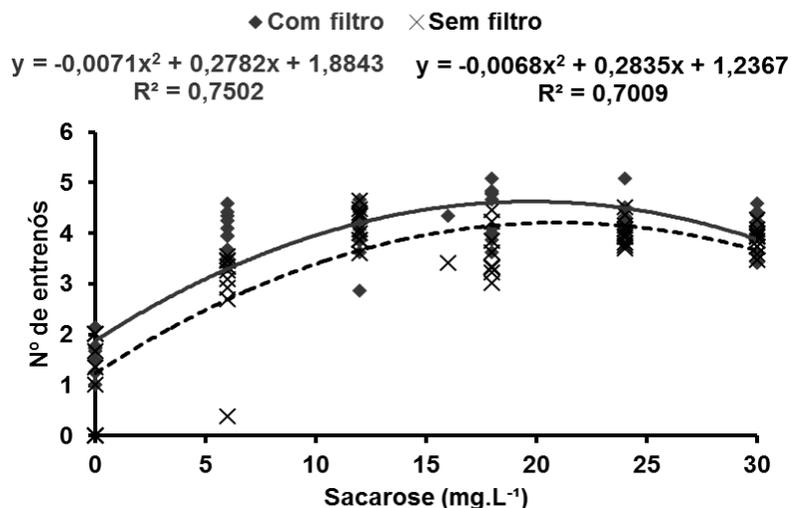


Figura 2. Número de entrenós dos brotos de *Tectona grandis* em relação ao tipo de vedação da tampa e das concentrações de sacarose, aos 35 dias.

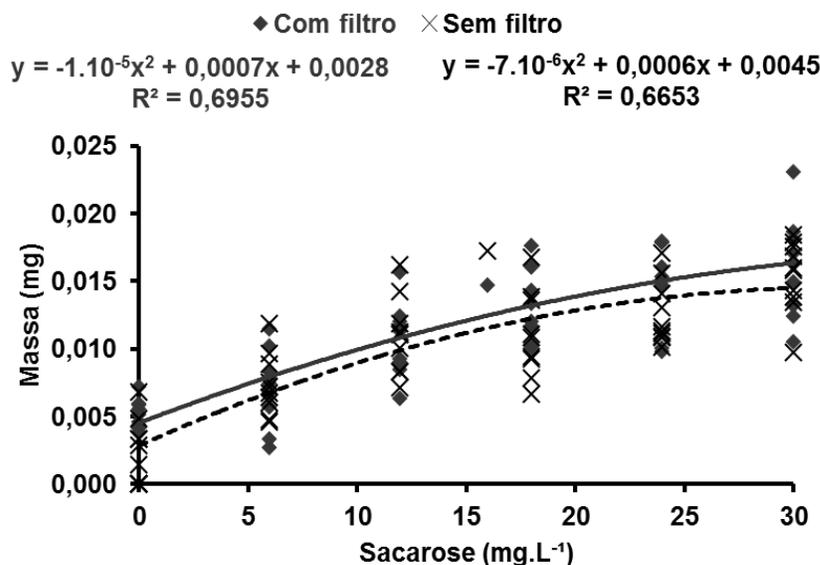


Figura 3. Matéria seca dos brotos de *Tectona grandis* em relação ao tipo de vedação da tampa e das concentrações de sacarose, aos 35 dias.

Para as duas tampas observou-se que o melhor resultado para a variável matéria seca foi obtido na concentração de 30 mg.L⁻¹ de sacarose. Quando foi utilizada a tampa com filtro, o valor obtido foi de 0,0162 mg e ao utilizar a tampa sem filtro, o valor para esta variável foi de 0,0148 mg de matéria seca. Calvete *et al.* (2002) observaram o aumento da matéria seca no cultivo de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) com o incremento da concentração de sacarose de 30 g.L⁻¹ utilizada convencionalmente para 60 g.L⁻¹. Nesse caso, o maior conteúdo de sacarose no meio de cultivo correspondeu a um aumento do teor de carboidratos nos tecidos foliares. Segundo os autores, esse fato pode ter influenciado a redução da abscisão foliar das plântulas de morangueiro favorecendo o vigor vegetativo.

As exigências nutricionais requeridas para o crescimento e desenvolvimento dos tecidos cultivados *in vitro* variam de espécie para espécie, dentre as variedades e até mesmo dentro da própria planta (GREENWAY *et al.*, 2012), mostrando a necessidade de se otimizar os meios de cultura para cada caso específico (GUIMARÃES *et al.*, 1999; NAGAO *et al.*, 1994). Os tratamentos com a ausência de sacarose para as três variáveis analisadas (comprimento de broto, número de entrenós, e matéria seca dos brotos) apresentaram crescimento e desenvolvimento inferiores das plântulas em comparação aos demais tratamentos. Esse resultado pode estar associado à dependência gerada pela condição mixotrófica na qual a cultura está adaptada (GROUT, 1998).

Rodrigues *et al.* (2006) verificaram que a ausência de sacarose na micropropagação de macieira (*Malus domestica* Borkh.) ocasionou aumento de mortalidade ou desenvolvimento anormal dos brotos (atrofiamento). É importante salientar que em culturas adaptadas a altas concentrações de sacarose deve-se realizar

uma redução gradativa ao longo de sucessivos subcultivos, aliada ao fornecimento de carbono atmosférico por meio de adaptações na vedação dos frascos e melhoria nas condições de luminosidade para a efetiva realização de fotossíntese (GEORGE *et al.*, 2008; KANECHI & OCHI, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2007). Esse comportamento pode ser atribuído à inibição de algum mecanismo enzimático envolvido na assimilação de carboidratos ou do aparato fotossintético ineficiente, característico do hábito heterotrófico das plântulas micropropagadas (INOUE *et al.*, 1998; MERKLE & NAIRN, 2005; YASEEN *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES

O melhor resultado para o cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* foi verificado na concentração de 18 mg.L⁻¹ de sacarose e com o uso da tampa plástica contendo filtro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Floresteca S/A pelo financiamento do projeto e ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKRAM, M.; AFTAB, F. 2009. An efficient method for clonal propagation and *in vitro* establishment of softwood shoots from epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.). **Forestry Studies in China**, Beijing, v.11, n.2, p.105-110,
- BAILEY, J.D.; HARJANTO, N.A. 2005. Teak (*Tectona grandis* L.) tree growth, stem quality and health in coppiced plantations in Java, Indonesia. **New Forests**, Dordrecht, v.30, n.1, p.55-65
- BANDEIRA, J.M.; LIMA, C.S.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; FALQUETO, A.R.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B.

2007. Diferentes tipos de vedação dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.472-474
- BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. 2012. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.48, n.5, p.478-487
- CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; SUZIN, M. 2002. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.186-191
- CONCEIÇÃO, F.X.; DRESCHER, R.; PELISSARI, A.L.; LANSSANOVA, L.R.; FAVALESSA, C.M.C.; ROQUETTE, J.G. 2012. Capacidade produtiva local de *Tectona grandis* em Monte Dourado, Estado do Pará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.822-827
- DAVIES, P.J. 2004. The plant hormones: their nature, occurrence and function. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** 3rd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.1-15
- DIÉ, A.; KITIN, P.; KOUAMÉ, F.N.G.; BULCKE, J.V.; ACKER, J.V.; BEECKMAN, H. 2012. Fluctuations of cambial activity in relation to precipitation result in annual rings and intra-annual growth zones of xylem and phloem in teak (*Tectona grandis*) in Ivory Coast. **Annals of Botany**, London, v.110, n.4, p.861-873
- DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. 2009. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p.49-59
- FAVALESSA, C.M.C.; UBIALLI, J.A.; CALDEIRA, S.F.; DRESCHER, R.; ACOSTA, F.C. 2012. Equações de sortimentos para *Tectona grandis* na região centro-sul de Mato Grosso. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.32, n.72, p.389-399
- FERNANDES, D.A.; SOUZA, R.S.; COSTA, R.B. 2011. Cultivo *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.): uma revisão. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.86, n.1, p.32-46
- FERREIRA, D.F. 2000. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, p.255-258
- GANGOPADHYAY, G.; GANGOPADHYAY, S.B.; PODDAR, R.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, K.K. 2003. Micropropagation of *Tectona grandis*: assessment of genetic fidelity. **Biologia Plantarum**, Praha, v.46, n.3, p.459-461
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; De KLERK, G.J. 2008. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Netherlands: Springer, v.1. 501p.
- GIRI, C.C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. 2004. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, Berlin, v.18, n.2, p.115-135
- GREENWAY, M.B.; PHILLIPS, I.C.; LLOYD, M.N.; HUBSTENBERGER, J.F.; PHILLIPS, G.C. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.48, n.4, p.403-410
- GROUT, B.W.W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and stress

- of transplanting. **Acta Horticulturae**, The Hagu, n.230, p.129-135
- GUIMARÃES, P.T.C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A.M.P. 1999. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação *in vitro* de samambaia-espada [*Nepholepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.309-316
- GYVES, E.M.; ROYANI, J.I.; RUGINI, E. 2007. Efficient method of micropropagation and *in vitro* rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v.64, n.1, p.73-78
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. 2011. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. São Paulo: Prentice-Hall, 915p.
- HUSEN, A.; PAL, M. 2007. Effect of branch position and auxin treatment on clonal propagation of *Tectona grandis* L.f. **New Forests**, Dordrecht, v.34, n.3, p.223-233
- HUSEN, A.; PAL, M. 2006. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **New Forests**, Dordrecht, v.31, n.1, p.57-73
- INOUE, M.T.; GRAÇA, M.E.C.; CORREA, G. 1998. Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.36, p.71-77
- KANECHI, M.; OCHI, M. 1998. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.123, n.2, p.176-181
- KEPCZYNSKI, J.; NEMOYKINA, A.; KEPCZYŃSKA, E. 2006. Ethylene and *in vitro* rooting of rose shoots. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.50, n.1, p.23-28
- KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R.J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.77, n.2, p.181-191
- KHANDURI, V.P.; LALNUNDANGA; VANLALREMKIMI, J. 2008. Growing stock variation in different teak (*Tectona grandis*) forest stands of Mizoram, India. **Journal of Forestry Research**, Beijing, v.19, n.3, p.204-208
- KOK, R. 2009. **Tectona grandis (teak)**. Kew: royal botanic gardens
- KOZGAR, M.I.; SHAHZAD, A. 2012. An improved protocol for micropropagation of teak tree (*Tectona grandis* L.). **Rendiconti Lincei**, Milano, v.23, n.2, p.195-202
- KUMAR, P.P.; RAO, C.D.; GOH, C.J. 1996. Ethylene and CO₂ affect direct shoot regeneration from the petiolar ends of *Paulownia kawakamii* leaves cultured *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.20, n.3, p.237-243
- MACEDO, R.L.G.; GOMES, J.E.; VENTURIN, N.; SALGADO, B.G. 2005. Desenvolvimento inicial de *Tectona grandis* L. F. (Teca) em diferentes espaçamentos no município de Paracatu, MG. **Cerne**, Lavras, v.11, n.1, p.61-69
- MAJADA, J.P.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 1997. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.33, n.1, p.62-69

- MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. 2005. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.41, n.5, p.602-619
- MUHAMMAD, A.; FAHEEM, A. 2012. Effect of auxins on axillary and *denovo* shoot regeneration from *in vitro* shoot cultures derived from forced epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.). **Forestry Studies in China**, Beijing, v.14, n.3, p.180-186
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497
- NAGAO, E.O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. 1994. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.25-31
- NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.; HINCHEE, M.A. 2005. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.41, n.6, p.701-717
- NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A.P.S.; QUEIROZ, S.R.O.D.; PELACANI, C.R.; SANTANA, J.R.F. 2009. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33 n.3, p.481-490
- OGURA-TSUJITA, Y.; OKUBO, H. 2006. Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.42, n.6, p.614-616
- PANDEY, D.; BROWN, C. 2000. Teak: a global overview. **Unasylva**, Roma, v.51, n.2, p.3-12
- RIBEIRO, M.V.; LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. 2007. Concentrações de Sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.843-845
- RODRIGUES, M.M.; MELO, M.D.; ALOUFA, M.A.I. 2006. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.171-173
- ROSSETTO, M.; DIXON, K.W.; BUNN, E. 1992. Aeration: a simple method to control vitrification and improve *in vitro* culture of rare australian plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.28, n.4, p.192-196
- SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K. 2005. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal of Forest Research**, Tokyo, v.10, n.6, p.465-469
- SHUKLA, S.R.; RAO, R.V.; SHASHIKALA, S.; KUMAR, P.; SHARMA, S.K. 2011. Wood quality variation in *Tectona grandis* (teak) clones from CSO raised at Maredumilli (Rajahmundry), Andhra Pradesh. **Journal of the Indian Academy of Wood Science**, Bangalore, v.8, n.2, p.116-119
- SINGH, S.; BHANDARI, A.S.; ANSARI, S.A. 2006. Stockplant management for optimized rhizogenesis in *Tectona grandis* stem cuttings. **New Forests**, Dordrecht, v.31, n.1, p.91-96

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. **Fisiologia vegetal**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 848 p.
- THORPE, T.A. 2007. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.37, n.2, p.169-180
- WOJTANIA, A.; WĘGRZYNOWICZ-LESIAK, E. 2012. Ethylene and cytokinin interaction in the morphogenesis of *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poznan, v.34, n.6, p.2407-2412
- YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I.A. 2013. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.40, n.4, p.2837-2849

Recebido em: 14/08/2013

Aceito para publicação em: 27/11/2013