

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JUSTINA INÊS ANSELMINI

**MICROENXERTIA E POLINIZAÇÃO CONTROLADA EM *Araucaria angustifolia*
(BERT.) O. KTZE**

**CURITIBA
2008**

JUSTINA INÊS ANSELMINI

**MICROENXERTIA E POLINIZAÇÃO CONTROLADA EM *Araucaria angustifolia*
(BERT.) O. KTZE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette
Co-orientadores: Dr^a Valderês A. de Sousa
Prof^o Dr. Luiz Antonio Biasi

**CURITIBA
2008**

**Ao Domingos, que soube dar tempo ao tempo.
Aos meus irmãos, Lauri, Reni e Valmir.
Com gratidão e amor, dedico.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Flávio Zanette pela orientação, incentivo e principalmente pela oportunidade dada em 2003 a uma aluna vinda do interior sem nenhuma experiência nesta área e com apenas 2 dias para fazer um projeto.

Ao professor Luiz Antonio Biasi e a Dr^a Valderês A. de Sousa, pela co-orientação neste trabalho, pelo exemplo e pela agradável convivência.

À UFPR e ao Programa de Pós-Graduação – Produção Vegetal pela oportunidade de desenvolver este trabalho. A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

À Companhia Paranaense de Energia Elétrica (COPEL), por ceder o caminhão equipado com plataforma elevatória, equipamento fundamental para a realização deste trabalho.

Ao laboratorista Nilson Belém Filho pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.

À amiga e irmã Ade, companheira de casa e participante ativa dos meus últimos 5 anos, dividindo alegrias e apreensões, aprendemos juntas a superar dificuldades e hoje cada uma leva um pouco da outra na personalidade e nas atitudes.

Aos meus queridos amigos e “antigos maninhos” Sandra Cabel, Regina Caetano Quisen e Tássio D. Rech pelos conselhos, sugestões e principalmente pelos momentos de descontração e lazer.

Aos novos maninhos, Liege, Yohana e Antônio, pela amizade e paciência.

Aos demais amigos do Laboratório de Micropropagação e da Pós-Graduação, pelos momentos de descontração e pelas várias vezes em que contribuíram neste trabalho.

Ao Domingos, por ter sido o meu porto seguro nos últimos 8 anos.

Aos meus pais, Arlindo e Inês, e os meus irmãos Lauri, Reni e Valmir, por tudo o que sou e alcancei.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1 <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze	08
2.2 Fenologia reprodutiva.....	09
2.3 Pinhão.....	11
2.4 Polinização controlada	11
2.5 Microenxertia	12
2.6 Desinfestação de sementes	13
2.7 Referências	14
3 CAPÍTULO I - OBTENÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE <i>Araucaria angustifolia</i> IN VITRO	18
3.1 INTRODUÇÃO	19
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.2.1 Desinfestação de embriões de <i>A. angustifolia</i>	20
3.2.2 Germinação <i>in vitro</i> de embriões de <i>A. angustifolia</i>	21
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.3.1 Desinfestação de embriões de <i>A. angustifolia</i>	22
3.3.2 Germinação <i>in vitro</i> de embriões de <i>A. angustifolia</i>	24
3.4 CONCLUSÕES	29
3.5 PERSPÉCTIVAS	30
3.6 REFERÊNCIAS	30
4 CAPÍTULO II - MICROENXERTIA EM <i>Araucaria angustifolia</i>	33
4.1 INTRODUÇÃO	34
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1 Microenxertia e sua caracterização morfológica em <i>A. angustifolia</i>	35
4.2.2 Microenxertia e plagiotropismo	37
4.2.3 Efeito da BAP nas microenxertias	37
4.2.4 Aclimatização dos microenxertos	39
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.3.1 Microenxertia e sua caracterização morfológica em <i>A. angustifolia</i>	40
4.3.2 Microenxertia e plagiotropismo	45
4.3.3 Efeito da BAP nas microenxertias	46
4.3.4 Aclimatização dos microenxertos	49
4.4 CONCLUSÕES.....	50
4.5 PERSPECTIVAS	50
4.6 REFERÊNCIAS.....	50
5 CAPÍTULO III - POLINIZAÇÃO CONTROLADA EM <i>Araucaria angustifolia</i>	55
5.1 INTRODUÇÃO	56
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
5.2.1 Efeito da polinização controlada no número de pinhões produzidos por pinha.....	58
5.2.2 Efeito da quantidade de pólen utilizado nas polinizações controladas sobre o número de pinhões produzidos por pinha.....	59
5.2.3 Efeito da época de polinização e do estágio de desenvolvimento do ginostrobilo sobre o número de pinhões produzidos por pinha	60

5.2.4 Efeito de polinizações seguidas em ginostrobilos sobre o número de pinhões por pinha	61
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.3.1 Efeito da polinização controlada no número de pinhões produzidos por pinha.....	62
5.3.2 Efeito da quantidade de pólen utilizado nas polinizações controladas sobre o número de pinhões produzidos por pinha	66
5.3.3 Efeito da época de polinização e do estágio de desenvolvimento do ginostrobilo sobre o número de pinhões produzidos por pinha	68
5.3.4 Efeito de polinizações sucessivas ginostrobilos sobre o número de pinhões por pinha	71
5.4 CONCLUSÕES	72
5.5 PERSPECTIVAS	72
5.6 REFERÊNCIAS	73
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7 ANEXOS	80

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* foi, por muitas décadas, considerada um produto apenas madeirável, mas atualmente o pinhão destaca-se como uma fonte de renda, que pode ser obtida nas populações naturais e comerciais dessa espécie. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para a produção de mudas clonadas a partir da microenxertia e o aumento na produção de pinhões por polinizações suplementares ou subsídio ao melhoramento genético da espécie por meio de cruzamentos controlados. Para a produção de porta-enxertos, foram testados tratamentos de desinfestação dos embriões, com variação na concentração de hipoclorito de sódio (NaOCl) e no tempo de exposição das sementes. Depois, para a germinação *in vitro* dos embriões foram testados diferentes meios de cultura (WPM e variações do MS), dois agentes geleificantes (Phytigel e Ágar), e três concentrações de sacarose (20, 30 e 40 g L⁻¹) e a adição ou não de carvão ativado (1g L⁻¹). Para determinar um protocolo de microenxertia foram realizadas auto-enxertias em plantas germinadas *in vitro*, com 2, 6 e 12 meses de idade. Foram testados dois locais de enxertia no porta-enxerto (epicótilo e hipocótilo) e dois tipos de enxertia (garfagem de topo com e sem fenda). Depois foram realizadas microenxertias com meristemas apicais de plantas adultas. A sobrevivência dos microenxertos, o efeito da BAP no meio de cultura ou no ponto da enxertia e a presença de plagiotropismo foram avaliadas durante os experimentos. Foi desenvolvida uma metodologia de polinização controlada e avaliado os efeitos desta polinização, da quantidade de pólen aplicada, do estágio de desenvolvimento do ginostrobilo durante a polinização e de polinizações consecutivas, sobre o número de pinhões formados por pinha. Os resultados dos experimentos de desinfestação demonstraram que a utilização de NaOCl na concentração de 0,5 % por 40 minutos é eficaz na assepsia dos pinhões, e a utilização de meios de cultura com menor concentração de sais, como o WPM e MS/2, com adição de carvão ativado, favoreceram um elevado desenvolvimento de plantas a partir de embriões isolados *in vitro*. Nas autoenxertias, as maiores porcentagens de microenxertos sobreviventes foram obtidas nas microenxertias realizadas no epicótilo e o tipo de enxertia mais eficiente foi a garfagem de topo sem fenda. Nas microenxertias com meristemas apicais, a adição da BAP foi prejudicial para a sobrevivência e o plagiotropismo presente nos microenxertos impediu o desenvolvimento normal das mudas. Nos experimentos com polinização controlada, os resultados indicaram que uma única polinização resulta em baixa produção de pinhões cheios por pinha e a polinização em estádios mais avançados de desenvolvimento do ginostrobilo resulta em valores elevados de pinhões cheios por pinha. A produção de mudas a partir da microenxertia em *A. angustifolia* é viável, assim como a produção de pinhões a partir de cruzamentos controlados. Recomenda-se, na propagação por microenxertia, a enxertia de garfagem de topo sem fenda de meristemas ortotrópicos, realizada no epicótilo de plantas com dois meses após a germinação. Para aumento da produtividade, a polinização controlada deve ser realizada por duas vezes em ginostrobilos com mais de 30 mm de diâmetro.

Palavras-chave: araucária, estróbilos, polinização, propagação vegetativa.

ABSTRACT

Araucaria pines have, for many decades, been considered only as wood source. Lately, however, pine nuts, which are obtained from both naturally occurring and commercially grown araucaria pines, are also considered an income source. The goal of this work was to develop a protocol to propagate micrografted clonal plants and to enhance pine nut production through supplementary pollinations and supporting genetic breeding of the species. Embryo asepsis treatment, with varying sodium hypochlorite (NaOCl) concentrations and exposition times were used. Different cultivation media (WPM and variations of MS), two solidifying agents (Phytigel and Agar), four saccharose concentrations (20, 30 and 40 g L⁻¹) with or without activated charcoal (1g L⁻¹) were tested for embryo *in vitro* germination. In order to determine an efficient micrografting protocol, 2, 6 and 12-month-old *in vitro* germinated plants were auto-grafted. Two different grafting locations: epicotyls and hypocotyls; and two micrografting techniques: apex graft with (cleft graft) or without split, were tested. Micrografting using adult plants' apical shoot meristems was also performed. Micrografting survival, the effects of BAP concentration on the media and on the grafting junction, and plagiotropism were evaluated during the experiments. A controlled pollination methodology was developed in which pollination, amount of applied pollen, gynostrobilus development stage during pollination and sequential pollination effects on number of formed pine nuts by pine cone were observed. Results indicated that exposition of pine nuts to 0.5 % NaOCl during 40 minutes was efficient to their asepsis and that media containing less salt concentration, such as WPM and MS/2, plus activated charcoal, favored the development of plants produced from *in vitro* isolated embryos. Higher percentage of surviving micrografted plants was obtained when they were micrografted onto the epicotyls and the no-split top graft was the most efficient type. Addition of BAP to the micrografted apical meristems was prejudicial since it interfered in the graft survival. The plagiotropism present in the micrografts impeded the normal development of the plants. Through the controlled pollination experiments it was possible to conclude that sole pollination events result in low production of blank nuts per pine cone and that pollination in more advanced gynostrobilus development stages results in more elevated values of filled nuts per pine cone. *A. angustifolia*'s plant production using micrografting is feasible, as well as it is pine nut's production by controlled crossings. No-split top-grafted orthotropic meristem onto 2-year-old plants is recommended to micrograft the species and to increase productivity, controlled pollination must be performed twice in gynostrobilus presenting diameter of 30 mm or larger.

Key-words: parana-pine, strobili, pollination, vegetative propagation.

1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia*, árvore característica da Floresta com Araucária, que ocupa principalmente os Estados do Sul, estendendo-se por São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro é a gimnosperma nativa de maior importância econômica e biológica do Brasil.

Devido as suas características madeiráveis, acabou por marcar um dos grandes ciclos econômicos do nosso Estado. A sua madeira, resina e pinhões foram intensamente explorados (Mattos, 1972; Carvalho, 1994; Koch e Corrêa, 2002) o que decretou a sua quase extinção em pouco mais de 50 anos de exploração, com uma redução drástica na área de ocorrência da araucária. Nos Estados da região Sul, somando-se as reservas, compostas por fragmentos e remanescentes isolados, restam cerca de 10 % de florestas fortemente manejadas e de 1 a 2 % das suas áreas originais cobertas pela Floresta com Araucária. No Estado do Paraná, não existem mais florestas primárias ou intocadas (Castella e Brites, 2004). Estes fragmentos são de extrema importância ambiental e científica, pois representam o que resta da biodiversidade deste bioma.

Apesar da *A. angustifolia* ter sido explorada de maneira errônea, ainda tem muito a oferecer como uma planta produtora de alimento e sem a necessidade de sua derrubada. No entanto, para que isto ocorra, é necessário estudar mais esta espécie, pois ainda existem lacunas desconhecidas sobre a sua propagação, tanto sexuada quanto assexuada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para microenxertia que permita a produção de mudas clonadas, e aumentar a produção de pinhões por cruzamentos controlados.

Os experimentos com polinização controlada e clonagem de material adulto podem auxiliar na formação de pomares visando à produção de pinhões e incentivar o plantio da *A. angustifolia*. Espera-se que a possibilidade de retorno econômico, por meio da produção de pinhões, gere na população a vontade de plantar e conservar esta espécie, que tanto ajudou no desenvolvimento do nosso país, e que ainda tem muito a oferecer como alimento.

2.1 *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze

A *Araucaria angustifolia* é uma árvore de grande porte, com um tronco cilíndrico raramente ramificado e ramos dispostos em verticilos, separados e afastados uns dos outros. Na planta adulta a disposição dos verticilos na parte mais apical sugere um formato de candelabro, que ocorre devido à perda dos verticilos mais basais pelo contato com as demais plantas vizinhas. Os verticilos são formados por um número variável de ramos primários, cujo caule é cilíndrico e a gema apical é plagiotrópica, ocasionando o crescimento lateral, o mesmo ocorre com os ramos secundários, bastante ramificados e conhecidos por grimpas (Reitz *et al.*, 1979; Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994).

A *A. angustifolia* é uma planta dióica, com árvores masculinas e femininas distintas (Reitz *et al.*, 1979). As plantas femininas apresentam folhas modificadas em grandes e densos estróbilos com mais de duas centenas de unidades. O óvulo nasce na axila, protegido por uma folha modificada estéril, a escama de cobertura, que acaba envolvendo e encerrando o óvulo fecundado, fazendo com que o cone maduro contenha muitas unidades isoladas, chamadas pinhões. As plantas masculinas possuem estróbilos longos para a produção do pólen (Joly, 1983; Maas e Westra, 1998).

A formação de mudas a partir de sementes se restringe a poucos meses do ano, devido à perda da sua capacidade germinativa (Carvalho, 1994) e a dispersão natural das sementes ocorre pela queda ao chão, quando maduras, ou pela dispersão por animais (Mattos, 1972).

A *A. angustifolia* pertence à família Araucariaceae. Esta família é exclusiva do Hemisfério Sul e evoluiu na Era Mesozóica durante os períodos Jurássico e Cretáceo, há cerca de 250 milhões de anos. Apenas duas espécies ocorrem na América do Sul: a *A. angustifolia* e a *Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch, conhecida como araucaria-do-chile, de ocorrência no sul do Chile e Argentina. As demais espécies são encontradas na área do Pacífico Meridional, na Austrália, Papua Nova Guiné, Nova Caledônia e Ilha Norfolk (Joly, 1983; Koch e Corrêa, 2002).

Das espécies de Araucariaceae, a *A. angustifolia* é a que apresenta a maior distribuição geográfica, isto devido possivelmente a sua diferenciação em variedades (Koch e Corrêa, 2002). As maiores concentrações da *A. angustifolia* no Brasil, encontram-se nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A área que esta espécie ocupava primitivamente era de

73.780 Km² no Paraná (40 % da superfície), 56.693 Km² em Santa Catarina (30 %), 46.483 Km² no Rio Grande do Sul (25 %) e 5.340 Km² em São Paulo (3 %) (Machado e Siqueira, 1980; Carvalho, 1994; Koch e Corrêa, 2002). Em 2002, somando-se as reservas dos três Estados do Sul, restavam cerca de 10% de florestas fortemente manejadas e de 1 a 2 % das suas áreas originais cobertas pela Floresta com Araucária. No Paraná, as florestas primárias ou intocadas não existem mais (Castella e Britez, 2004).

Técnicas de marcadores bioquímicos e moleculares podem tornar uma importante ferramenta para a caracterização da diversidade genética nas populações restantes, demonstrando o nível de similaridade genética entre os indivíduos e o fluxo gênico dentro de populações, para futuramente possibilitar a seleção de plantas e sementes a serem utilizadas, tanto para produção de mudas, quanto para cruzamentos controlados (Stefenon e Nodari, 2003).

Com a utilização de isoenzimas, Shimizu *et al.* (2000), caracterizaram a variabilidade genética da população remanescente de *A. angustifolia* no Parque Nacional do Iguaçu – Paraná. Sousa (2000), analisando a estrutura genética de uma população de *Araucaria angustifolia*, definiu dois sistemas gel/eletrodo para identificação de polimorfismos por diferentes isoenzimas, os sistemas ASHTON e TRIS-CITRATO. Além do uso para a caracterização genética da população, as análises isoenzimáticas, que é um marcador codominante, possibilita a comprovação de paternidade em cruzamentos controlados.

2.2 Fenologia reprodutiva

A denominação ginostróbilo foi utilizada por Solórzono-Filho (2001) para definir o estróbilo feminino e androstróbilo para o estróbilo masculino. Os estróbilos desenvolvem-se na extremidade dos ramos na planta adulta, sendo que o ginostróbilo é composto por numerosas folhas carpelares (megaesporófilos) inseridas ao redor de um eixo cônico comum (Mattos, 1972). Após a polinização, o ginostróbilo passa a ser denominado pinha (Anselmini *et al.*, 2006) e é composta por sementes (pinhões cheios), escamas não fertilizadas (pinhões chochos), escamas estéreis e um eixo central (Mantovani *et al.*, 2004).

Os androstróbilos são estróbilos de menor desenvolvimento, conhecido como mingotes, possuem em torno de um eixo alongado comum muitas escamas, e em seu interior diversos sacos polínicos, onde se desenvolvem os grãos de pólen(Mattos, 1972).

A formação dos ramos reprodutivos, nas plantas femininas, ocorre geralmente no terceiro ou quarto verticilo, após a última frutificação. No verticilo reprodutivo pode-se encontrar um, dois, três ou até quatro ramos reprodutivos. As condições ambientais também podem atuar sobre a formação dos ramos reprodutivos e a presença de fatores ambientais favoráveis como temperatura e pluviosidade pode atuar na formação de um maior número de ramos reprodutivos por verticilo (Anselmini *et al.*, 2006).

Segundo Anselmini *et al.* (2006), a formação dos androstróbilos inicia em novembro, assim como a formação dos ginostrobilos. Foi observado que todos os androstróbilos presentes na planta encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento, e o ciclo reprodutivo nas plantas masculinas encerra-se antes de iniciar o próximo ciclo. O ciclo do androstróbilo na *A. angustifolia*, desde o início da formação em novembro, até a liberação do pólen em setembro e outubro do ano seguinte é de 10 a 11 meses. A formação e o desenvolvimento do ginostrobilo de *Araucaria angustifolia* ocorrem internamente, protegidos pelas folhas terminais dos ramos. A formação dos ramos reprodutivos ocorre no mês de novembro, período este caracterizado pelo aumento da temperatura média e da pluviosidade na região de Curitiba. No mês de setembro, as folhas terminais que protegem o ginostrobilo abrem-se expondo o ginostrobilo com todos os seus componentes formados, as folhas modificadas férteis e as folhas modificadas estéreis, que servirão de preenchimento na pinha.

A posição erétil dos ginostrobilos nas extremidades dos ramos permite que a polinização seja mais eficiente, pois o grão de pólen pode cair com mais facilidade entre as escamas e mais próxima da micrópila (Mantovani *et al.*, 2004). A polinização ocorre a partir de setembro até outubro, depois as pinhas iniciam o crescimento e a maturação e a queda dos pinhões ocorre cerca de 20 meses depois, de abril a setembro, para as condições de Curitiba, num ciclo total de 29 a 34 meses (Anselmini *et al.*, 2006).

O aumento da pluviosidade pode atuar também de forma negativa durante a polinização, ocasionando a queda do grão de pólen que estiver sendo liberado pelo androstróbilo e pela retirada daqueles que já estiverem depositados sobre os ginostrobilos, resultando numa baixa taxa de fecundação e menor produção de pinhões (Anselmini *et al.*, 2006). Para Sousa (2000) a sazonalidade na produção de pinhões é controlada por fatores climáticos e também pode ser resultado da formação irregular de ginostrobilos pelas plantas.

2.3 Pinhão

O pinhão, segundo Gama (2006), pode ser classificado como um alimento com alto teor de fibras e de calorias. Além do potencial já demonstrado como alimento (Cordenusi *et al.*, 2004), o pinhão é uma fonte potencial de substâncias de interesse na medicina, como componentes antiinflamatórios e antibactericidas (Santi-Gadelha *et al.*, 2006), proteínas quinases (Machado *et al.*, 2002) e a extração do amido de pinhão, pode fornecer subsídios quanto ao potencial uso do amido de pinhão modificado na tecnologia de alimentos (Stahl, 2003; Stahl *et al.*, 2007).

Conforme Anselmini *et al.* (2006), a maturação e queda dos pinhões ocorrem de abril a setembro na região de Curitiba – PR, o que restringe o consumo do pinhão a estes meses do ano. Esta sazonalidade e a associação com a sua alta perecibilidade também restringe a sua comercialização, visto que é comercializado sem nenhum grau de industrialização, sendo encontrado quase que totalmente na forma *in natura*. O baixo grau de industrialização do produto, aliado a distância entre os centros produtores e consumidores, prejudica ainda mais a comercialização e disponibilidade de produto para os consumidores, sendo necessário pesquisas sobre o desenvolvimento de técnicas de conservação e industrialização do pinhão (Santos *et al.*, 2002).

2.4 Polinização controlada

A polinização controlada é a transferência artificial do pólen de uma flor para outra, com total conhecimento dos progenitores masculino e feminino, é uma técnica bastante utilizada para produção de híbridos ou plantas melhoradas geneticamente, com o objetivo de aumentar a produtividade ou melhorar a adaptação ao ambiente (IPEF, 1977; Brigatti *et al.*, 1983).

De acordo com Martins *et al.* (1981), o ponto de maturação dos estróbilos e de coleta do pólen de *Pinus*, a avaliação da viabilidade do pólen e do seu armazenamento, aliado ao estágio de receptividade do estróbilo feminino são os cuidados mais importantes na polinização controlada.

O registro do cruzamento controlado entre duas espécies de araucárias, no caso *Araucaria araucana* e *Araucaria angustifolia* ocorreu em 1951 na Argentina. As 68 plantas híbridas obtidas pela polinização de 77 estróbilos femininos, apresentavam características de ambas espécies parentais e rapidez quanto ao crescimento. As plantas utilizadas neste cruzamento intraespecífico ocorrem entre regiões bem distintas, separadas por mais de 2000 Km. Devido à presença do mesmo número de cromossomos, o pesquisador concluiu que haveria a possibilidade

de ocorrer hibridação entre as duas espécies, e apesar da maturação do pólen e da receptividade do ginostróbilo serem diferentes nas duas espécies, com o armazenamento do pólen foi possível realizar a polinização cruzada entre a *A. angustifolia* e a *A. araucana*, com formação de pinhas e pinhões. O cruzamento entre estas duas espécies é viável e merece novos estudos para aperfeiçoamento da técnica (Tesdorff, 1956). Os híbridos obtidos na progênie foram plantados e os caracteres observados foram predominantemente os das suas mães.

2.5 Microenxertia

A propagação via enxertia de *A. angustifolia* é considerada viável (Carvalho, 1994). Apesar disso, as plantas apresentam dificuldades no desenvolvimento, devido ao seu plagiotropismo. Iritani (1997) realizou enxertias de gemas apicais de plantas adultas, sobre porta-enxertos de mudas, com dois a três meses de idade, provenientes da germinação de sementes, e conseguiu com esta técnica uma sobrevivência de 80 a 90 %. Durante o processo de enxertia foram detectadas três dificuldades, a primeira relacionou-se à diferença entre os diâmetros do porta-enxerto e do enxerto, a segunda, diz respeito à sensibilidade das gemas apicais em ambientes com alta umidade relativa, como o encontrado em casa-de-vegetação e a terceira refere-se à falta de mudas de tamanho adequado para o enxerto, pois mudas com 15 a 20 cm já apresentavam elevado grau de lignificação, o que muitas vezes impede a união adequada dos tecidos das plantas enxertadas.

A microenxertia consiste na enxertia de um meristema ou ápice meristemático de uma planta matriz, sobre um porta-enxerto proveniente da germinação *in vitro* de sementes. Esta técnica foi primeiramente utilizada por Navarro *et al.*, (1975), com o objetivo de propagar plantas cítricas livres de viroses. A sobrevivência das plantas microenxertadas foi de 30 a 50% e o sucesso desta técnica, para eliminar viroses, ocorreu devido à utilização de tecido meristemático no enxerto. É uma técnica que tem sido utilizada em plantas que apresentam dificuldade de regeneração a partir de meristemas, para aliar características vantajosas de porta-enxertos e copas em macieira (Abreu e Pedrotti, 2003), para a propagação e o rejuvenescimento de plantas adultas de caju (Thimmappaiah e Shirly, 2002), ou para a produção em grande escala de mudas de *Opuntia* spp (Estrada-Luna *et al.*, 2002).

Os porta-enxertos utilizados em microenxertias são provenientes da germinação *in vitro* de sementes (Paz e Pasqual, 1998). Iritani (1997) germinou embriões maduros de *A. angustifolia*

in vitro e identificou que os cotilédones e hipocótilos destes embriões não têm competência para a organogênese, não sendo responsivos a tratamentos com citocininas. Como este trabalho não teve por objetivo a germinação *in vitro* de embriões, as porcentagens de germinação e os tratamentos assépticos não foram citados, mas concluiu-se que a utilização de pinhões armazenados por longo período de tempo aumenta o grau de contaminação dos embriões *in vitro*, pois ocorre a entrada de agentes contaminantes pela micrópila, local do pinhão que está inserido no eixo central da pinha e onde o tegumento não está totalmente soldado.

2.6 Desinfestação de sementes

Segundo Couto *et al.* (2004), vários fatores podem afetar o vigor germinativo das sementes e promover a formação de plântulas anormais ou sua morte, entre eles a dormência e a presença de microrganismos, sobretudo de fungos e bactérias. Por isso, os métodos de desinfestação devem ser eficazes, para que a plântula sirva de fonte de explante livre de fungos e bactérias.

Vários protocolos eficientes de desinfestação de sementes já foram descritos para diversas espécies, como para o mogno (*Swietenia macrophylla*) (Couto *et al.*, 2004), e jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) (Picolotto *et al.*, 2007), mangabeira (*Hancornia speciosa*) (Lédo *et al.*, 2007) e urucu (*Bixa orellana*) (Lima *et al.*, 2007).

A desinfestação das sementes pode influenciar nas taxas de germinação. No caso de sementes de jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius*) o efeito do hipoclorito de sódio foi positivo sobre as porcentagens de germinação, pois o tratamento com 3 % de NaOCl promoveu maior porcentagem de germinação e menor índice de contaminação (Sabá *et al.*, 2002). Já para aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), a desinfestação acarretou na diminuição da porcentagem de germinação. Os resultados indicaram que 65 % das sementes que não passaram por qualquer tratamento envolvendo etanol germinaram e 57,5 % de germinação para sementes que foram imersas em etanol 70 % por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 1 % por 10 minutos e lavados três vezes em água destilada (Andrade *et al.*, 2000).

Conforme Lima *et al.* (2007) a presença de endosperma dificulta a entrada de água e diminui a porcentagem de germinação *in vitro*. No entanto, para as sementes de urucu sem tegumento e com endosperma ocorre maior porcentagem de germinação em relação às intactas. O mesmo ocorreu para sementes de sucupira-branca (*Pterodon pubescens*), espécie nativa do

cerrado, onde as sementes sem tegumento tiveram maior homogeneidade e rapidez de germinação *in vitro*, devido à superação de dormência (Coelho *et al.*, 2001).

A germinação *in vitro* também pode ser útil para espécies que tem a porcentagem de germinação de sementes baixa em condições de viveiro, devido às sementes serem recalcitrantes e à presença de inibidores na polpa, como a mangaba. Taxas de germinação *in vitro* acima de 95% foram obtidas provavelmente devido à remoção da polpa do fruto e à rápida inoculação das sementes, evitando a desidratação e mantendo a viabilidade da semente (Lédo *et al.*, 2007).

Na micropropagação, as soluções de sais e açúcares não exercem apenas a função de nutrição, mas interferem nas propriedades osmóticas do meio de cultura que influenciam o crescimento celular e a morfogênese (George, 1996). Por isto diversos meios de cultura básicos e variações têm sido utilizadas na germinação *in vitro*. O meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962), tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies, como por exemplo, para urucu (Lima *et al.*, 2007). No entanto, para as espécies lenhosas, composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor desempenho (Grattapaglia e Machado, 1998). Na germinação de embriões de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) em meio de cultivo WPM (Lloyd e McCown, 1981) 50 % sem sacarose obteve-se 100 % de germinação dos embriões (Nogueira *et al.*, 2004). As diluições do MS (50 %) também foram recomendadas para sementes de sucupira-branca (Coelho *et al.*, 2001) e de mangabeira (Lédo *et al.*, 2007).

2.7 Referências

- ABREU, M. F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação de macieira. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 31, p. 100-108, 2003.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.
- ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F.; BONA, C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – Pr. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.13, n.1, p. 44-52, 2006.
- BRIGATTI, R. A.; FERREIRA, M.; BEIG, O.; FREITAS, M. Polinização controlada em *Eucalyptus urophylla* – um programa desenvolvido pela Champion Papel e Celulose S. A. **Silvicultura**: São Paulo, v. 8, n. 28, p. 213-215, 1983.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.

CASTELLA, P. R.; BRITZ, R. M. A (org.). **Floresta com Araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. 233 p.

COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p. 38-48, 2001.

CORDENUNSI, B. R.; MENEZES, E. W.; GENOVESE, M. I.; COLLI, C. L.; SOUZA, A. G. A.; LAJOLO, F. M. Chemical composition and glycemic index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3412-3416, 2004.

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.

ESTRADA-LUNA, A. A.; LÓPEZ-PERALTA, C.; SORIANO-CÁRDENAS, E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp). **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v. 92, p. 317-327, 2002.

GAMA, T. M. M. T. B. **Estudo comparativo dos aspectos físicos-químicos do pinhão nativo e do pinhão proveniente de processos de polinização controlada de *Araucaria angustifolia* e da influência do tratamento térmico**. Curitiba, 2006, 86f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos) Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

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

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, v. 1, p. 183-260, 1998.

IPEF: Instituto de pesquisas e estudos florestais. Produção de híbridos de *Eucalyptus* spp através da polinização controlada. **Circular Técnica**, Piracicaba, n. 9, p. 1-4, 1977.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze**. Curitiba, 1997. 200 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 6. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1983. 777 p.

KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional**. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002, 148 p.

- LÉDO, A. S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; JUNIOR, J. F. S. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.
- LIMA, R. V.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R.; MAIA, A. R. Germinação *in vitro* de urucu. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, p.171-177, 2007.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1981.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa – SP: Editora Plantarum, 1992. 352 p.
- MAAS, P.J.M.; WESTRA, L. Y. T. **Neotropical: Plant families**. 2 ed. Alemanha: Koeltz Scientific Books, 1998. 289 p.
- MACHADO, E. L.; SILVA, A. C.; SILVA, M. J.; LEITE, A.; OTTOBONI, L. M. M. Endogenous protein phosphorylation and casein kinase activity during seed development in *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, 61, p. 835-842, 2002.
- MACHADO, S. A.; SIQUEIRA, J. D. P. **Distribuição Natural de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. KTZE**. Curitiba-Paraná: FUPEF, 1980. 9 p.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004.
- MARTINS, M. E.; PRERA, L. E. H.; KAGEYAMA, P. Y. Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. IPEF: **Circular Técnica**, n. 128, 1981. 7p.
- MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. São Paulo: Grêmio Politécnico, 1972. 629 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus free *Citrus*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 100, n. 5, 1975, p. 471-479.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.
- PAZ, O. P.; PASQUAL, M. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI, p. 147-160, 1998.

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

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil: Santa Catarina**. Florianópolis: Editora Lunardelli, 1979. 320 p.

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

SANTI-GADELHA, T.; et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SANTOS, A.J.; CORSO, N.M.; MARTINS, G.; BITTENCOURT, E. Aspectos produtivos e comerciais do pinhão no Estado do Paraná. **Floresta**, Curitiba, v.32, n.2, p.163-169, 2002.

SHIMIZU, J. Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, S. A. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 18-36, 2000.

SOLÓRZANO-FILHO, J. A. **Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP**. São Paulo, 2001, 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Gottingen, 2000, 161 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Florestais), Universidade de Goettingen.

STAHL, J. A. **Efeito da modificação por fosfatação sobre as características do amido de pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze)**. Santa Maria, 2003, 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

STAHL, J. A.; LOBATO, L. P.; BOCHI, V. C.; KUBOTA, E. H.; GUTKOSKI, L. C.; EMANUELLI, T. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. **Food Science and Technology**, 40, p. 1206-1214, 2007.

STEFENON, V. M.; NODARI, R. O. Marcadores moleculares no melhoramento genético de Araucária. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 31, p. 95-99, 2003.

TESDORFF, H. Experimentos de cruzamentos com *Araucaria araucana* (Molina) Koch e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Jornal de Genética Florestal e Melhoramento Florestal**, v. 5, p. 79-82, 1956.

TIMMAPPAAIAH, G. I.; SHIRLY, S. R. In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v. 92, n. 2, p. 177-182, 2002.

3 CAPÍTULO I – OBTENÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE *Araucaria angustifolia* IN VITRO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de desinfestação e de germinação de embriões *in vitro* de *Araucaria angustifolia* para a formação de porta-enxertos utilizados em microenxertia. Neste sentido, foi instalado um experimento com quatro tratamentos com hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0,5; 1; 2 e 6 % mais o controle com lavagem em água esterilizada. Após esta etapa, foi realizado outro experimento com variação no tempo de exposição (20, 30 e 40 min.) das sementes submetidas ao tratamento com NaOCl (6 %). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e 10 embriões por unidade experimental. Para a germinação *in vitro* dos embriões, foram testados diferentes meios de cultura (WPM e MS) dois agentes geleificantes (Phytigel e Ágar) e três concentrações de sacarose (20, 30 e 40 g L⁻¹) mais o controle sem sacarose, além da adição ou não de carvão ativado (1g L⁻¹) ao meio de cultura. Depois foram testados três meios de cultura (WPM, MS e MS/2) para a germinação *in vitro* sem ou com a adição de 20 g L⁻¹ de sacarose. O delineamento foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial, três repetições e 10 embriões por unidade experimental. A utilização de NaOCl na concentração de 0,5 % por 40 minutos é eficaz na desinfestação de sementes de *A. angustifolia*, com 67 % de sobrevivência. A utilização de meios de cultura, com menor concentração de sais, como o WPM e o MS/2, com adição de carvão ativado e Phytigel, favorecem o estabelecimento de plântulas a partir de embriões isolados *in vitro* de *A. angustifolia*. A adição de sacarose é desnecessária para o meio WPM.

Palavras-chave: pinheiro-do-paraná, micropropagação, germinação *in vitro*.

ABSTRACT

This work aimed to develop a protocol for asepsis and *in vitro* germination of *Araucaria angustifolia* embryos, for the formation of root stock that will be used of micrografting. An experiment was installed with four treatments with sodium hypochlorite (NaOCl) at concentrations of 0,5; 1; 2 e 6 % and the more control with washing in sterile water. Another experiment was conducted with time variation of exposure of seeds NaOCl (6 %). The experimental design used was complete randomized, with five repetitions and 10 embryos for experimental unit. To test the *in vitro* germination of embryos were observed different cultivation media (WPM and MS), two solidifying agents (Phytigel and Agar) and three saccharose concentrations (20, 30 and 40 g L⁻¹) and the more control and adding or not activated charcoal (1 g L⁻¹). After the wer culture (WPM, MS and MS/2) with or without the addition of 20 g L⁻¹ saccharose wen tested. The design was completely randomized, with a factorial arrangement, three repetitions and 10 embryos for experimental unit. The use of NaOCl at concentration of 0.5 % for 40 minutes was efficient to their asepsis of Araucaria seeds, with 67 % of survival. And the use of media cultivation with lower concentration of salts, such as WPM and MS/2, with the addition of activated charcoal and Phytigel, favored the development of plants produced from *in vitro* isolated embryos. The addition of saccharose is unnecessary for the WPM.

Key-words: parana-pine, micropropagation, *in vitro* germination.

A *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze, conhecida popularmente como *A. angustifolia* ou pinheiro é a única espécie do gênero de ocorrência natural no Brasil. Outra espécie da família Araucariaceae, com ocorrência na América do Sul é a *Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch, presente na Argentina e no Chile. As demais espécies do gênero são encontradas na área do Pacífico Meridional e na Austrália (Koch e Corrêa, 2002).

A família Araucariaceae caracteriza-se por apresentar plantas femininas com grandes e densos estróbilos com mais de duas centenas de folhas modificadas. O óvulo nasce na axila de algumas folhas modificadas férteis, esta folha que contém o óvulo na sua base junta-se a outra folha modificada estéril envolvendo e encerrando o óvulo fecundado, formando o pinhão (Joly, 1983). O estróbilo feminino maduro, denominado por Solórzano-Filho (2001) como ginostrobilo, apresenta três tipos de estruturas: o pinhão cheio, o pinhão chocho que não foi fecundado e as escamas de preenchimento.

A semente da *A. angustifolia* é popularmente conhecida como pinhão, sendo um alimento rico em proteínas e carboidratos e muito consumido regionalmente. O pinhão possui uma forma cônica, com seu ápice voltado para o eixo central da pinha, o embrião é longo e cilíndrico, com dois grandes cotilédones, que perfazem 80 % do tamanho final do embrião, o restante é composto pelo conjunto hipocótilo-radícula (Hertel, 1980).

Diversas técnicas de propagação vegetativa *in vitro* foram testadas no intuito de clonar plantas de *A. angustifolia*, sendo que a obstáculo mais comum é a difícil regeneração *in vitro* apresentada por esta espécie. A microenxertia é uma técnica promissora para plantas que apresentam dificuldades de regeneração e consiste na enxertia de um ápice caulinar sobre um porta-enxerto germinado *in vitro*.

O cultivo de embriões de *A. angustifolia* foi realizado por Iritani (1997), sendo que foi testado o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com reguladores vegetais. Os resultados não foram satisfatórios em relação à multiplicação dos meristemas apicais e dados sobre porcentagem de germinação *in vitro* não foram mencionados.

Para determinar um protocolo eficiente de germinação *in vitro* de uma espécie, é necessário o estabelecimento e crescimento asséptico da cultura *in vitro*. Os problemas com os contaminantes fúngicos e bacterianos presentes nos explantes oriundos de plantas adultas

dificultam o estabelecimento de protocolos de micropropagação (Ledo *et al.*, 2007), causando em alguns casos insucesso na implantação da cultura *in vitro*.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de desinfestação e de germinação *in vitro* de embriões de *A. angustifolia*, para a formação de porta-enxertos que serão utilizados em experimentos de microenxertia para a produção de mudas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Desinfestação de embriões de *A. angustifolia*

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no ano de 2006.

As sementes utilizadas foram coletadas no mês de abril de uma planta adulta com mais de 20 anos, plantada no Setor de Ciências Agrárias da UFPR. O experimento de desinfestação foi realizado no mês de abril, sem o armazenamento dos pinhões. As sementes tiveram o seu tegumento retirado com auxílio de uma faca e foram submetidas aos seguintes tratamentos de desinfestação: imersão por cinco minutos em etanol (70 %) seguido de imersão em solução de 0,5; 1; 2 ou 6 % de NaOCl, durante 30 minutos e três lavagens em água esterilizada. No tratamento controle as sementes foram lavadas em água esterilizada.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, cinco repetições e 10 sementes por unidade experimental.

Após os tratamentos, com auxílio de pinça e bisturi, os embriões foram retirados dos endospermas, em câmara de fluxo laminar, lavados em água esterilizada e secados sobre papel absorvente autoclavado. Em seguida, os embriões foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio WPM (Lloyd e McCown, 1981) acrescido de sacarose (20 gL⁻¹), ágar Vetec® (6 g L⁻¹) e carvão ativado (1 g L⁻¹). Os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento sob regime de 16 horas de fotoperíodo, em temperatura controlada de 25 ± 2° C, e radiação luminosa de 24,3 μmolm⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes de tipo “luz do dia”.

Após 10 dias, foram avaliadas as porcentagens de embriões contaminados por fungos e bactérias e a porcentagem de sobrevivência.

Após esta etapa foi realizado outro experimento de desinfestação com variação no tempo de exposição das sementes ao NaOCl (6 %). O experimento foi realizado no mês de maio, com pinhões armazenados em sacos plásticos por um mês em refrigerador (4° C). Os tratamentos testados foram imersão por cinco minutos em etanol (70 %) seguido de imersão em solução de NaOCl 6 %, durante 20, 30 ou 40 minutos e três lavagens em água esterilizada.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos, cinco repetições e 10 embriões por unidade experimental.

Após 10 dias, foi avaliada a porcentagem de contaminação por fungos e bactérias e a porcentagem de sobrevivência.

3.2.2 Germinação *in vitro* de embriões de *A. angustifolia*

No mês de julho foram isolados embriões, sem tegumento e endosperma, em diferentes meios de cultura, para determinar aquele que proporcionasse a formação de um maior número de embriões em plântulas.

Os pinhões foram coletados de três plantas localizadas no Setor de Ciências Agrárias da UFPR, nos meses de abril e junho de 2006 e armazenados dentro de sacos plásticos em refrigerador (4 °C). O tegumento foi retirado com auxílio de uma faca e os pinhões foram desinfestados com imersão por cinco min. em etanol (70 %) e 40 min. em solução de NaOCl (6 %), seguido de três lavagens em água esterilizada. Em câmara de fluxo laminar, com auxílio de bisturi e pinça, os embriões foram retirados dos endospermas, que foram lavados em água esterilizada e secados sobre papel absorvente estéril (Figura 1-A). Em seguida os embriões foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 10 ml do meio de cultura MS e WPM (Figura 1-B). Os meios de cultura testados tiveram o seu pH ajustado a 5,8 e autoclavados por 20 min. a 120° C e 1 atm.

Os tratamentos foram arranjos num fatorial de 2x4x2, com variação do tipo do agente geleificante, da concentração de sacarose e da adição ou não de carvão ativado. Foram testados dois diferentes tipos de agentes geleificantes (Phytigel Sigma® e ágar Vetec®), usados nas concentrações de 3 e 6 g L⁻¹, respectivamente, três concentrações de sacarose (20, 30 e 40 g L⁻¹) mais o controle sem a adição de sacarose e com ou sem a adição de 1 g L⁻¹ de carvão ativado, num total de 16 tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e 10 frascos por unidade experimental.

Os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento com as mesmas condições controladas e descritas nos experimentos de desinfestação.

Após 60 dias foi avaliada a porcentagem de embriões normais germinados, sendo considerada uma plântula germinada normal àquela que possuía caule e sistema radicular formados (Figura 1-C), sem presença de calos (1-D) ou estiolamento de partes da plântula (1-E).

Numa segunda etapa, foram testados os meios de cultura (WPM, MS completo e MS com metade da concentração dos sais) com a ausência ou a adição de 20 g L⁻¹ de sacarose. O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x2. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições e 10 embriões por unidade experimental. O carvão ativado foi adicionado a todos os meios de cultura testados na concentração de 1 g L⁻¹, assim como o agente geleificante utilizado foi o Phytigel (3 g L⁻¹).

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as porcentagens de embriões germinados, de embriões vivos não-germinados e de embriões mortos.

Para todos os experimentos, os dados coletados foram analisados pela análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o MSTAT.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Desinfestação de embriões de *A. angustifolia*

Todos os tratamentos com a utilização de etanol e NaOCl foram eficientes na desinfestação dos embriões de *A. angustifolia*, com uma porcentagem de sobrevivência de 60 a 67 % dos embriões. Já o tratamento testemunha, onde os pinhões foram lavados em água esterilizada, apresentaram uma porcentagem de 78 % de embriões contaminados (Tabela 1), indicando a necessidade do uso de agentes germicidas após a retirada do tegumento dos pinhões.

A efetividade do uso de NaOCl associado com rápidas imersões em etanol já foi demonstrada para várias espécies como mogno (*Swietenia macrophylla*) (Couto *et al.*, 2004), jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora*) (Picolotto *et al.*, 2007) e em mangabeira (*Hancornia speciosa*) (Lédo *et al.*, 2007).

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES CONTAMINADOS DE *A. angustifolia* APÓS 10 DIAS DO ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA WPM, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaOCl UTILIZADAS NOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO.

Tratamentos (Concentração de NaOCl)	Contaminação			Sobrevivência (%)
	Fúngica (%)	Bacteriana (%)	Total	
0,5%	20 b	13 n.s.	33 b	67
1%	23 b	13 n.s.	36 b	64
2%	28 b	13 n.s.	41 b	59
6%	35 b	00 n.s.	35 b	65
Testemunha	63 a	15 n.s.	78 a	22
C. V (%)	23,4	89,5	23,1	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. n.s.= não significativo.

De acordo com Picolotto *et al.* (2007), a contaminação fúngica da jabuticabeira foi inversamente proporcional a concentração do desinfestante utilizada, o que não foi observado nos resultados encontrados com *A. angustifolia*, onde mesmo na testemunha, 22% dos embriões não apresentaram contaminação (Tabela 1). Os pinhões são protegidos por um tegumento que possui apenas uma pequena abertura na sua micrópila, o que limita bastante a penetração de fungos e bactérias (Iritani, 1997). Depois da retirada do tegumento, o embrião da *A. angustifolia* ainda permanece protegido por um denso e grande endosperma, que permitiu a utilização de concentração bastante elevada de NaOCl (6 %), sem que houvesse dano ao embrião. Iritani (1997) chegou a utilizar a concentração de 15% para a desinfestação dos pinhões. Como observado nos resultados, mesmo na concentração mais baixa, o NaOCl (0,5 %) foi eficiente na desinfestação dos embriões.

Além da concentração de agente desinfestante, o tempo de exposição é importante para a eliminação de fungos e bactérias, sem, no entanto, causar danos ao material vegetal. Os períodos de tratamento de 20, 30 e 40 minutos em solução de 6% de NaOCl não diferiram estatisticamente na contaminação bacteriana. No entanto, para a contaminação fúngica, com o tempo de tratamento de 40 minutos não ocorreu contaminação e foi superior ao de 30 minutos (Tabela 2).

A desinfestação dos embriões, após a retirada do endosperma, também foi testada, mas como os embriões mostraram-se sensíveis aos tratamentos com NaOCl, essa prática não foi utilizada.

TABELA 2 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES CONTAMINADOS DE *A. angustifolia*, APÓS 10 DIAS DO ISOLAMENTO, EM MEIO DE CULTURA WPM, COM DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM NaOCl (6 %).

Tratamentos (tempo de imersão)	Sobrevivência (%)	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)
20 min.	60 a	10 ab	30 a
30 min.	60 a	20 a	20 a
40 min.	70 a	00 b	30 a
C. V (%)	17	61	34

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

A média de sobrevivência dos embriões de *A. angustifolia* nos dois experimentos ficou em torno de 60 a 70 % nos tratamentos mais efetivos, demonstrando que mesmo a utilização de pinhões recém-colhidos não impediu o aparecimento de contaminação *in vitro*. O aumento na contaminação bacteriana do primeiro para o segundo experimento pode ser resultado do armazenamento dos pinhões por cerca de um mês em geladeira dentro de sacos plásticos, onde a umidade era alta. O armazenamento dos pinhões em locais úmidos pode favorecer o aumento da contaminação no isolamento de embriões. No entanto, mesmo com o armazenamento e o aumento na contaminação bacteriana, no segundo experimento, a contaminação total não aumentou.

Uma possibilidade para diminuir ainda mais este índice de contaminação seria a colheita de pinhas ainda inteiras, no início do período de maturação, onde os pinhões ainda estão fixados ao eixo central da pinha, menos expostos ao ambiente. No entanto, deve-se ter o cuidado de não coletar pinhas imaturas, onde os pinhões ainda não estão totalmente formados, o que prejudicaria a germinação *in vitro*.

3.3.2 Germinação *in vitro* de embriões de *A. angustifolia*

Nos tratamentos com o meio de cultura MS não houve interação entre os fatores testados (agente geleificante, concentração de sacarose e presença ou não de carvão ativado). Mas isoladamente, os fatores apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a porcentagem de embriões germinados (Tabela 3).

Para o tipo de agente geleificante, o Phytigel mostrou ser mais efetivo, aumentando a germinação de embriões e diminuindo a porcentagem de embriões mortos. A concentração do agente geleificante deve ter influenciado a absorção de água pela modificação do potencial

osmótico do meio, já que o Phytigel é utilizado na concentração de 3 g L^{-1} , e o ágar numa concentração maior, de 6 g L^{-1} . Isto foi observado na germinação *in vitro* de sementes de *Arabidopsis thaliana*, onde o baixo potencial de água disponível no meio de cultura resultou em diminuição da elongação do hipocótilo (Weele *et al.*, 2000). A concentração e o tipo do agente geleificante resultam em diferentes respostas na cultura de embriões somáticos de *Pinus strobus*, onde o aumento na concentração do agente geleificante diminui o potencial de água do meio e favorece o desenvolvimento dos embriões para o estágio cotiledonar. No entanto, a maturação destes embriões é favorecida em meio de cultura com menor concentração de agente geleificante e maior disponibilidade de água (Klimaszewska *et al.*, 2000).

Outro fator que pode ser influenciado por altas concentrações do agente geleificante é a difusão dos nutrientes no meio e a absorção destes pelo explante. Além da concentração utilizada, os agentes geleificantes são diferentes quanto a sua composição, podendo ocorrer a presença de impurezas como micronutrientes que afetam o desenvolvimento da cultura.

Para a concentração de sacarose, a maior média obtida de embriões germinados *in vitro* ocorreu com a ausência de sacarose no meio de cultura. A porcentagem de embriões vivos não germinados também foi influenciada por este fator, sendo que a maior média obtida foi para o meio de cultura MS com 40 g L^{-1} de sacarose. A alta concentração de sacarose (40 g L^{-1}) pode ter aumentado o potencial osmótico do meio de cultura o que resultou em menor potencial de água livre para os embriões, limitando ou retardando o seu desenvolvimento.

A porcentagem de embriões vivos não germinados é importante, pois representa embriões que ainda podem se desenvolver em plântulas. Neste sentido, o período para a avaliação quanto ao número de plântulas formadas a partir de embriões, poderia ser maior, de 90 a 100 dias, o que permitiria observar se estes embriões, que não germinaram em 60 dias, tem potencial para formar plântulas. A porcentagem de embriões mortos foi maior para o tratamento com 20 g L^{-1} de sacarose (Tabela 3).

A resposta da concentração de sacarose no meio de cultivo é variável entre genótipos, no entanto, os embriões de *A. angustifolia* isolados estavam com os seus cotilédones intactos, sendo estes uma fonte de energia para o desenvolvimento inicial das plântulas. A concentração de sacarose deve ter atuado mais na assimilação de água e nutrientes do meio do que propriamente no fornecimento de energia durante a germinação *in vitro* destes embriões. A variação do potencial osmótico do meio de cultura através do uso de diferentes concentrações de sacarose

afetam a resposta na produção de pigmentos em suspensão de células de *Vitis vinifera* (Do e Cormier, 1990) e o crescimento de calos de *Tabacco* (Brown *et al.*, 1979), possivelmente pela alteração no turgor celular.

TABELA 3 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES GERMINADOS VIVOS, NÃO GERMINADOS E MORTOS DE *A. angustifolia*, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, EM MEIO DE CULTURA MS, COM VARIAÇÃO NO AGENTE GELEIFICANTE, CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE CARVÃO ATIVADO.

Tratamentos	Embriões (%)		
	germinados	vivos não germinados	mortos
Agente solidificante			
Phytigel	47 a	38 a	15 b
Ágar	33 b	45 a	22 a
Concentração de sacarose (g L ⁻¹)			
0	49 a	31 c	20 b
20	46 b	27 d	27 a
30	31 c	51 b	18 c
40	29 c	61 a	10 d
Carvão ativado(g L ⁻¹)			
0	29 b	47 a	24 a
1	49 a	37 a	14 b
C. V. (%)	36	45	51

Médias seguidas de mesma letra na coluna, dentro de cada tratamento, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Outro fator que foi positivo para a germinação *in vitro* dos embriões, foi a adição ao meio de 1 g L⁻¹ de carvão ativado, resultando numa maior média de embriões germinados e menor de embriões mortos. A exclusão da luz do meio de cultura favoreceu a indução e o crescimento das raízes. Além disto, Quoirin *et al.* (2001) destaca que a adição do carvão ativado ao meio de cultura evita a foto-oxidação de auxinas endógenas e adsorve compostos tóxicos liberados pelo explante.

No experimento com o meio de cultura WPM, para a porcentagem de embriões germinados, houve interação entre dois dos fatores testados: o agente geleificante e a adição ou não de carvão ativado. Para a sacarose não ocorreu interação com outros fatores e as concentrações testadas apresentaram médias de porcentagem de germinação semelhantes estatisticamente (Tabela 4).

TABELA 4 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES GERMINADOS DE *A. angustifolia* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA WPM, COM VARIAÇÃO NO TIPO DE AGENTE GELEIFICANTE, CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE CARVÃO ATIVADO.

Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	Embriões germinados (%)	
00	68 a	
20	74 a	
30	73 a	
40	64 a	
Concentração de carvão ativado (g L ⁻¹)	Agente geleificante	
	Phytigel	Ágar
0	66 A b	66 A a
1	82 A a	64 B a
C. V. (%)	17,1	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

A redução da concentração dos sais no meio de cultura WPM em relação ao MS resultou num potencial osmótico menor, mesmo com a adição de sacarose, o que favoreceu a germinação em todas as concentrações testadas. Nogueira *et al.* (2004) constataram que na ausência de sacarose no meio WPM 50 % houve maiores índices de germinação para *Byrsonima intermedia* (murici-pequeno), provavelmente pela maior disponibilização de água para o embrião. Isto também pode ser observado na Tabela 5, onde ocorreu interação entre os meios de cultura testados e as concentrações de sacarose.

Para a interação, entre o agente geleificante e o carvão ativado, observou-se que em relação ao carvão ativado, a ausência do mesmo não influenciou na porcentagem de embriões germinados no meio de cultura com ágar, o mesmo não ocorreu quando este foi adicionado ao meio com o Phytigel, apresentando maior porcentagem de germinação do que o meio sem carvão e em relação ao ágar (Tabela 4).

Para o meio MS e WPM não houve diferenças estatísticas entre as médias de embriões germinados, nas duas concentrações de sacarose testadas. Já para o meio MS/2, com metade da concentração de sais, a adição de 20 g L⁻¹ de sacarose resultou numa maior porcentagem de embriões germinados. A presença de sacarose, neste caso, pode ter compensado a diminuição de sais do meio MS/2, regulando o potencial osmótico do meio. Isto é ainda mais provável quando se observa que os valores mais elevados de germinação ocorreram nos meios com menores concentrações de sais, com ou sem a adição de sacarose (Tabela 5).

TABELA 5 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES GERMINADOS DE *A. angustifolia* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, COM VARIAÇÃO NO TIPO DE MEIO DE CULTURA E NA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE.

Meio de cultura	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20
MS	34 A b	22 A c
MS/2	60 B a	80 A a
WPM	60 A a	54 A b
C. V. (%)	18,2	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

A porcentagem de embriões vivos não-germinados foi influenciada pelo meio de cultura e pela concentração de sacarose separadamente (Tabela 6). O meio de cultura MS proporcionou uma maior porcentagem de embriões vivos não-germinados do que os meios MS/2 e WPM. O aumento do potencial osmótico no meio de cultura MS pode ter influenciado negativamente no desenvolvimento de embriões em plântulas pela diminuição de água disponível no meio de cultura e até mesmo pela retirada de água dos embriões, pois os embriões vivos não-germinados são viáveis, mas algum fator impediu a formação de plântulas a partir destes embriões.

Em relação à sacarose, sem a adição desta ao meio de cultura o número de embriões vivos não germinados aumentou. Apesar da presença dos cotilédones nos embriões isolados, a presença de uma fonte externa de energia pode ser fundamental para a formação da plântula, já que na ausência da sacarose os embriões se mantiveram vivos, mas a porcentagem de formação de plântulas foi menor.

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIVOS NÃO GERMINADOS DE *A. angustifolia* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, COM VARIAÇÃO NO MEIO DE CULTURA E NA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE.

Meio de cultura	Embriões vivos não germinados (%)
MS	37 a
MS/2	16 b
WPM	25 b
Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	Embriões vivos não germinados (%)
0	34 a
20	18 b
C. V. (%)	32,9

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Quanto à porcentagem de embriões mortos houve interação entre os dois fatores testados, sendo que para o meio de cultura MS/2, a adição ou não de sacarose, não alterou a porcentagem de embriões mortos, mas para o meio MS e WPM a adição de sacarose aumentou a mortalidade de embriões. Em relação à ausência de sacarose no meio, o meio com a maior concentração de sais (MS) foi positivo para o aumento do número de embriões mortos. No meio WPM com a adição de sacarose esta tendência se manteve, com os meios mais diluídos em sais (MS/2 e WPM) com menor mortalidade de embriões (Tabela 7), comprovando os resultados obtidos para a porcentagem de embriões germinados, onde os meios com menor potencial osmótico resultaram em maiores porcentagens de germinação e menores de mortalidade de embriões.

TABELA 7 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES MORTOS DE *A. angustifolia* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, COM VARIAÇÃO NO TIPO DE MEIO DE CULTURA E NA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE.

Meio de cultura	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	
	0	20
MS	22 B a	48 A a
MS/2	16 A ab	18 A b
WPM	6 B b	30 A b
C. V. (%)	39,6	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

3.4 CONCLUSÕES

A utilização de NaOCl na concentração de 0,5 % por 40 minutos é eficaz na desinfestação de sementes de *A. angustifolia*. A utilização de meios de cultura, com menor concentração de sais, como o WPM e MS/2, com adição de carvão ativado e Phytigel, favorecem a formação de plântulas a partir de embriões isolados *in vitro*. A adição de sacarose é desnecessária para o meio WPM, sendo uma opção para reduzir custos.

3.5 PERSPECTIVAS

A germinação *in vitro* de embriões de *A. angustifolia* obteve bons resultados, no entanto, ajustes no protocolo de produção de porta-enxertos ainda podem ser testados visando aumentar os índices de desinfestação e de germinação dos embriões.

Para o protocolo de assepsia, a utilização de pinhões de pinhas que ainda não debulharam pode aumentar a taxa de embriões desinfestados, pois evita que os pinhões tenham contato com o meio ambiente diminuindo a possibilidade de contaminação. A desinfestação dos embriões após a retirada do endosperma também pode ser uma possibilidade, no entanto, os embriões sem o endosperma mostraram uma sensibilidade grande ao uso de NaOCl (0,25%), o uso de outros agentes desinfestantes ou em concentração menores pode ser positiva.

Quando o objetivo é a produção em grande escala de porta-enxertos ou de mudas, a redução de custos é fundamental, neste sentido, a utilização de meios de cultura adaptados, com ausência de sacarose e redução da concentração de sais, pode auxiliar, já que os resultados demonstraram que com a utilização do meio de cultura WPM a sacarose é dispensável.

3.6 REFERÊNCIAS

- BROWN, D. C. W.; LEUNG, D. W. M.; THORPE, T. A. Osmotic requirement for shoot formation in *Tabacco* callus. **Physiologia Plantarum**, v. 46, n. 1, p. 36-41, 1979.
- 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.
- DO, C. B.; CORMIER, F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 3, p. 143-146, 1990.
- HERTEL, R. J. G. **Interpretação morfológica da *Araucaria angustifolia***. Curitiba, 1980. 143 f. Tese (Concurso para professor titular na área de Morfologia Vegetal) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze**. Curitiba, 1997. 200 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 6. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1983. 777 p.

KLIMASZEWSKA, K.; BERNIER-CARDOU, M.; CYR, D. R.; SUTTON, B. C. S. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, n. 4, p. 279-286, 2000.

KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional**. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002, 148 p.

LÉDO, A. S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; JUNIOR, J. F. S. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

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

QUOIRIN, M.; SILVA, M. C.; MARTINS, K. G.; OLIVEIRA, D. E. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 199-205, 2001.

SOLÓRZANO-FILHO, J. A. **Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP**. São Paulo, 2001, 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo.

WEELE, C. M.; SPOLLEN, W. G.; SHARP, R. E.; BASKIN, T. I. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 350, p. 1555-1562, 2000.

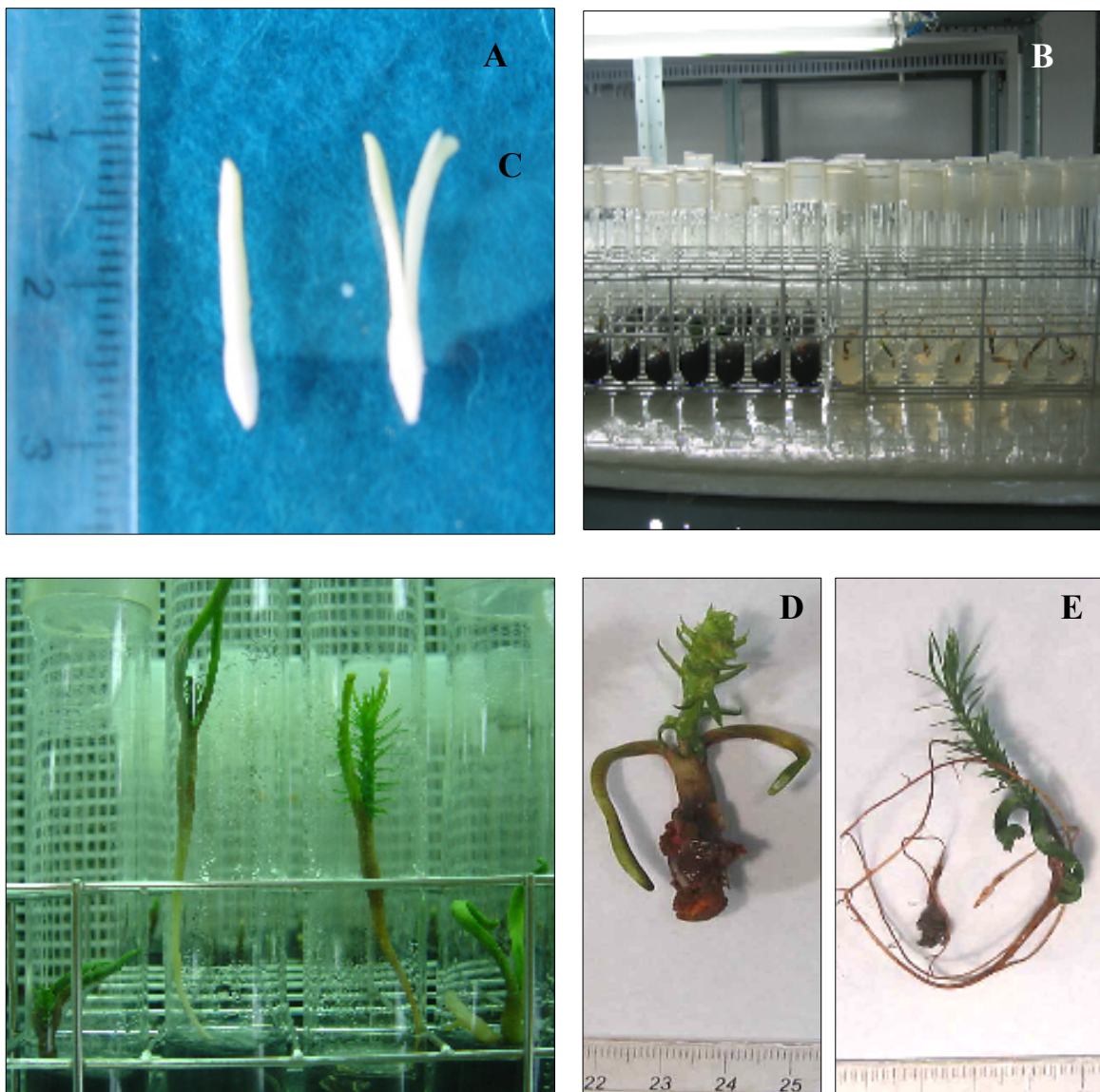


FIGURA 01 - **A)** EMBRIÕES DE *A. angustifolia* APÓS A RETIRADA DO TEGUMENTO E ENDOSPERMA; **B)** EMBRIÕES ISOLADOS EM MEIO DE CULTURA; **C)** PLANTAS NORMAIS GERMINADAS *IN VITRO* APÓS 60 DIAS DO ISOLAMENTO; **D)** PLANTAS ANORMAIS GERMINADAS *IN VITRO* COM CALO NA BASE, **E)** PLANTAS COM HIPOCÓTILO ESTIOLADO.

4 CAPÍTULO II - MICROENXERTIA EM *Araucaria angustifolia*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica para microenxertia em *Araucaria angustifolia*. Para isto, foram realizadas autoenxertias em plantas germinadas *in vitro*, com 2, 6 e 12 meses de idade. Foram testados dois locais de enxertia no porta-enxerto (epicótilo e hipocótilo) e dois tipos de enxertia (garfagem de topo com e sem fenda). Foi testada a influência da BAP aplicada no ponto da enxertia ($4,4 \mu\text{M L}^{-1}$) na sobrevivência das autoenxertias. Depois foram realizadas microenxertias com meristemas apicais de plantas adultas. Foi avaliado o efeito da BAP, aplicada no ponto da enxertia ($443,8$ e $4438,5 \mu\text{M L}^{-1}$) ou no meio de cultura ($8,8 \mu\text{M L}^{-1}$), na sobrevivência dos microenxertos de meristemas de plantas adultas. A presença de plagiotropismo nos microenxertos também foi avaliada. Nas autoenxertias a maior porcentagem de microenxertos com fenda aberta (37,89 %) ocorreu nas enxertias realizadas no hipocótilo. As maiores porcentagens de microenxertos sobreviventes foram obtidas nas microenxertias realizadas no epicótilo, e o tipo de enxertia mais eficiente foi a garfagem de topo sem fenda. O crescimento dos microenxertos indicou o restabelecimento das conexões vasculares. Nas microenxertias com meristemas apicais a adição de BAP foi prejudicial na sobrevivência e o plagiotropismo, presente nos microenxertos, impediu o desenvolvimento normal das mudas. Conclui-se que o processo de microenxertia em *Araucaria angustifolia* é eficiente e factível. Recomenda-se, para a propagação *in vitro* desta espécie, a enxertia de garfagem de topo sem fenda de meristemas ortotrópicos, realizada no epicótilo de plantas com dois meses de germinação.

Palavras-chave: pinheiro-do-paraná, micropropagação, cultura de tecidos.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a technique of micrografting in *Araucaria angustifolia* plants. Autografting was performed onto 2, 6- and 12- month- old *in vitro* germinated plants. Two different graft types (saddle with or without slit) were performed on two different plant parts (epicotyl or hypocotyl). Was tested BAP ($4,4 \mu\text{M L}^{-1}$) influence on the survival applied at the point of grafting. Micrografting using adult plants' apical shoot meristems was also performed. The effect of the BAP concentration is tested, applied at the point of grafting ($443,8$ e $4438,5 \mu\text{M L}^{-1}$) or in the media cultivation ($8,8 \mu\text{M L}^{-1}$), the micrografting survival of meristems plant adult. Was also evaluated the presence of plagiotropic in micrografting. Higher percentage (37,89 %) of open slit micrografts was observed when micrografting was performed onto hypocotyls. Higher percentage of surviving micrografts was obtained when micrografting was performed on epicotyl; the saddle without slit technique was the most efficient. Growth of the micrograftings was an indication of vascular connection recovering. Addition of BAP to the micrografted apical meristems was prejudicial since it interfered in the graft survival. The plagiotropism in the micrografts impeded the normal development of the plants. The methodology tested herein allowed us to conclude that the micrografting process is effective and efficient and may be used for production of *Araucaria angustifolia* micrografted plants. It is recommended the grafting of

graft without slit without the orthotropic meristem in epicotyl onto 2- months- old plant of germination.

Key words: parana-pine, micropropagation, tissue culture.

4.1 INTRODUÇÃO

Dentre as várias técnicas de propagação vegetativa *in vitro* e *ex vitro*, a estaquia (Iritani, 1981), a enxertia (Iritani, 1997) e técnicas de cultura de tecidos (Zanette *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 2002) foram as mais utilizadas para a *A. angustifolia*, na tentativa de desenvolver um protocolo eficiente para a produção de mudas da espécie.

Apesar da enxertia ser considerada uma técnica de propagação vegetativa viável para a *A. angustifolia*, alguns fatores têm influenciado negativamente o seu êxito, como o plagiotropismo característico da espécie e a diferença entre os diâmetros do porta-enxerto e do enxerto, a sensibilidade das gemas às altas temperaturas e a baixa umidade relativa e o grau de lignificação das mudas (Iritani, 1997). A clonagem de material adulto com genótipos superiores, visando à formação de pomares clonais para produção de sementes de qualidade ou para reflorestamentos uniformes, não foi desenvolvida ainda para esta espécie devido às dificuldades citadas.

Neste sentido, a microenxertia é utilizada para superar dificuldades apresentadas em frutíferas e essências florestais na regeneração de ápices caulinares (Paz e Pasqual, 1998). Essa técnica foi primeiramente empregada para a propagação de mudas cítricas livres de viroses (Navarro *et al.*, 1975), possibilitando a produção de matrizes de fruteiras com alta qualidade fitossanitária e com características adultas (Paz e Pasqual, 1998; Pasqual, 2001). É uma técnica promissora para detecção precoce de reação de incompatibilidade entre as partes enxertadas (Hartmann *et al.*, 1997). Além de ser eficiente para a propagação de material adulto selecionado, como no caso de *Pinus* (Fraga *et al.*, 2002; Cortizo *et al.*, 2004).

A enxertia é a união de tecidos de um mesmo indivíduo (autoenxertia), ou de indivíduos diferentes pertencentes à mesma espécie (homoenxertia) ou não (heteroenxertia) e a primeira condição para que esta união seja satisfatória é a compatibilidade entre as partes. Os primeiros sintomas de incompatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto são a fraca união das partes, a

murcha e senescência das folhas, o colapso dos tubos crivados e a conseqüente morte do enxerto (Carvalho, 2002).

Outras causas da morte de um enxerto são a época do ano e na técnica inadequada. A perfeita união das camadas cambiais das duas partes enxertadas é uma condição fundamental para o êxito da enxertia, por isso a importância de determinar a técnica mais apropriada para a enxertia (Carvalho, 2002).

O objetivo deste trabalho foi determinar uma técnica para microenxertia em *Araucaria angustifolia*. Para tanto foi testada a influência da aplicação do regulador vegetal BAP (benzilaminopurina) no ponto da enxertia e no meio de cultura, o melhor tipo de garfo para a microenxertia (apical ou subapical) e a presença de plagiotropismo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Microenxertia e sua caracterização morfológica em *A. angustifolia*

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, nos anos de 2005 e 2006.

As sementes utilizadas foram coletadas de uma planta adulta com mais de 20 anos, do Setor de Ciências Agrárias da UFPR. A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com a imersão dos pinhões, sem o tegumento, por cinco minutos em etanol (70%), seguido de solução de hipoclorito de sódio (6%) por 40 minutos e de três lavagens em água destilada e autoclavada. Os embriões foram retirados do endosperma em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinças e bisturis, lavados em água destilada e autoclavada e secados sobre papel absorvente estéril. Em seguida, os embriões foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio WPM (Lloyd e McCown, 1981), acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), ágar Vetec[®] (6 g L⁻¹) e carvão ativado (1 g L⁻¹). Os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento sob regime de 16 horas de fotoperíodo, em temperatura controlada de 25 ± 2 °C e radiação luminosa de 24,3 μmolm⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia”.

Os porta-enxertos de *A. angustifolia* utilizados nos experimentos foram obtidos da germinação *in vitro* de embriões e mantidos por 2, 6 e 12 meses nesta condição. Para os embriões germinados e mantidos *in vitro* por mais de seis meses foi feita uma troca do meio de cultivo.

Os explantes utilizados como enxertos foram obtidos dos ápices das próprias plantas germinadas *in vitro*. A parte apical das plantas foi retirada e o tamanho do microenxerto foi padronizado em 5 mm. Portanto, os porta-enxertos foram microenxertados com seus próprios ápices (auto-enxertia). A microenxertia foi realizada com um corte em fenda simples (garfagem de topo em fenda cheia) e um corte horizontal (garfagem de topo sem fenda). Os cortes foram feitos 5 mm abaixo ou acima da região de inserção hipocótilo-epicótilo. E após a enxertia foi feita uma poda de raiz para facilitar a inoculação no novo meio de cultura.

Os microenxertos foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura WPM, contendo sacarose (20 g L^{-1}), ágar Vetec[®] (6 g L^{-1}) e carvão ativado (1 g L^{-1}) e mantidos em sala de crescimento nas condições de cultivo descritas anteriormente para a obtenção dos porta-enxertos.

Após 60 dias de cultivo, foram realizadas as seguintes avaliações: porcentagem de microenxertos com abertura da fenda, porcentagem de microenxertos sobreviventes e porcentagem de microenxertos vivos com presença de calo superficial. Após 90 dias de cultura, foi avaliado o crescimento dos microenxertos.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições e cinco microenxertias por unidade experimental. Os tratamentos foram arrançados num fatorial de $3 \times 2 \times 2$, sendo três idades de porta-enxertos (2, 6 e 12 meses), em duas regiões distintas (na base do epicótilo e no hipocótilo) e dois tipos de enxertia (garfagem de topo em fenda cheia e garfagem de topo sem fenda).

Para a caracterização morfológica dos microenxertos foi realizado um outro experimento na mesma época, onde foram utilizados os mesmos tratamentos: dois locais de enxerto (epicótilo e hipocótilo) e dois tipos de enxertia (garfagem de topo em fenda cheia e garfagem de topo sem fenda), em plantas germinadas *in vitro* com 12 meses de idade. Para cada tratamento, foram feitas nove microenxertias e a cada 30 dias foram retiradas três plantas microenxertadas, num total de três coletas.

As amostras coletadas foram fixadas imediatamente em FAA (solução de formaldeído, ácido acético glacial e etanol (50 %), nas proporções de 5:5:90), segundo Johansen (1940). Após

48 horas na solução de FAA, as amostras foram colocadas em etanol 70 % até o momento da infiltração, quando foram desidratadas em etanol e processadas segundo as técnicas de Feder e O'Brien (1968) para inclusão em meta-acrilatoglicol, segundo as recomendações do fabricante (JB4 – Poliscience®). As secções seriadas, com 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo de rotação, distendidas sobre lâminas histológicas e secadas em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas em solução aquosa de azul de toluidina (0,5 %). A montagem das lâminas foi feita com lamínulas e resina sintética (Entelan®).

4.2.2 Microenxertia e plagiotropismo

Foram realizadas microenxertias com garfos provenientes de ramos secundários formados em plantas germinadas *in vitro*, com o objetivo de determinar a influência da origem do microenxerto sobre a presença ou ausência de plagiotropismo nas mudas microenxertadas. Para tanto, foi realizado um tratamento de enxertia com garfagem em fenda cheia, com ramos plagiotrópicos que se diferenciaram de plantas germinadas *in vitro* com mais de um ano (Figura 3-D). Foram feitos 15 microenxertos.

Após a enxertia os microenxertos foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura WPM, contendo sacarose (20 g L⁻¹), ágar Vetec® (6 g L⁻¹) e carvão ativado (1 g L⁻¹) e mantidos em sala de crescimento sob regime de 16 horas de fotoperíodo, em temperatura controlada de 25 ± 2 °C, e radiação luminosa de 24,3 µmolm⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes de tipo “luz do dia”.

Após 60 dias da enxertia foram realizadas as seguintes avaliações: porcentagem de sobrevivência dos microenxertos, média de crescimento dos microenxertos e presença ou ausência de plagiotropismo.

4.2.3 Efeito da BAP nas microenxertias

Foram realizadas autoenxertias, do tipo garfagem de topo em fenda cheia, em porta-enxertos germinados *in vitro*, com seis meses de idade. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjados num fatorial 2x2, sendo dois tipos de garfo (apical e subapical), com ou sem aplicação pulso de BAP (4,4 µM L⁻¹) no local da microenxertia. Cada tratamento foi composto por três repetições e 10 microenxertias por unidade experimental. Os tratamentos foram:

1. Garfo subapical sem aplicação de BAP;
2. Garfo apical sem aplicação de BAP;
3. Garfo subapical com aplicação de BAP;
4. Garfo apical com aplicação de BAP.

A aplicação pulso foi feita com a imersão da base do microenxerto por 1 seg. na solução previamente preparada com a concentração de BAP desejada, dissolvida em 50 % do volume final da solução de etanol (70 %) e depois completado o volume com água. Após a enxertia os microenxertos foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura WPM contendo sacarose (20 g L^{-1}), ágar Vetec[®] (6 g L^{-1}) e carvão ativado (1 g L^{-1}) e mantidos em sala de crescimento com as condições sob regime de 16 horas de fotoperíodo, em temperatura controlada de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, e radiação luminosa de $24,3 \text{ } \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia”.

Após 30 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência dos microenxertos, porcentagem de calo superficial no ponto da enxertia, e após 90 dias, foi avaliado a porcentagem de microenxertos com crescimento.

Numa segunda etapa e com o objetivo de clonagem de plantas adultas foram realizados experimentos com enxertia de meristemas apicais de plantas adultas sobre porta-enxertos germinados *in vitro*. Os meristemas apicais utilizados como microenxertos foram provenientes de ramos secundários de plantas adultas situadas no Setor de Ciências Agrárias da UFPR.

Os ramos foram coletados no dia da enxertia e seus ápices foram desinfestados com etanol (70 %) por cinco minutos e depois imersão em NaOCl (2 %) por 30 min. Depois em câmara de fluxo laminar, com auxílio de bisturi e pinças foram retiradas as várias camadas de folhas que protegem o meristema apical. Este foi retirado e microenxertado sobre o porta-enxerto com 2 a 3 pares de folhas (Figura 3-EF).

No primeiro experimento foram realizadas microenxertias do tipo garfagem de topo sem fenda em porta-enxertos germinados *in vitro*, com dois meses de idade. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos. Cada tratamento foi composto por três repetições e 10 microenxertias por unidade experimental. Os tratamentos foram:

1. Aplicação de BAP ($4.438,5 \text{ } \mu\text{M L}^{-1}$) no ponto da enxertia,
2. Aplicação de BAP ($443,8 \text{ } \mu\text{M L}^{-1}$) no ponto da enxertia,
3. Adição de BAP ($8,8 \text{ } \mu\text{M L}^{-1}$) no meio de cultivo,

4. Sem aplicação de BAP no ponto da enxertia (testemunha).

A aplicação pulso foi realizada com a imersão do microenxerto por 1 seg. na solução de BAP e depois enxertada sobre o porta-enxerto.

Após a enxertia os microenxertos foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura WPM contendo sacarose (20 g L⁻¹), ágar Vetec® (6 g L⁻¹) e carvão ativado (1 g L⁻¹) e transferidas para sala de crescimento com as mesmas condições citadas anteriormente.

Após 30 dias da microenxertia foi avaliada a porcentagem de sobrevivência dos microenxertos.

Para avaliar o efeito genótipo sobre a porcentagem de sobrevivência dos microenxertos, foram feitas microenxertias com garfagem de topo sem fenda utilizando porta-enxertos germinados *in vitro* e meristemas apicais provenientes de ramos secundários de plantas adultas, uma feminina e outra masculina. Os ramos foram coletados no dia da enxertia e seus ápices foram desinfestados com etanol (70 %) por cinco minutos e depois imersão em NaOCl (2 %) por 30 min. Depois em câmara de fluxo laminar, com auxílio de bisturi e pinças foram retiradas as várias camadas de folhas que protegem o meristema apical. Este foi retirado e microenxertado sobre o porta-enxerto com 2 a 3 pares de folhas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos, sendo uma planta masculina e outra feminina, doadoras de meristemas. Cada tratamento foi composto por três repetições e 10 microenxertias por unidade experimental.

Após a enxertia os microenxertos foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura WPM contendo sacarose (20 g L⁻¹), ágar Vetec® (6 g L⁻¹) e carvão ativado (1 g L⁻¹) e transferidas para sala de crescimento com as mesmas condições citadas anteriormente.

Após 60 dias foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência e o crescimento dos microenxertos em cm.

4.2.4 Aclimatização dos microenxertos

Para a aclimatização, foram utilizadas plantas *in vitro* após seis meses de autoenxertia.

Foi realizado um tratamento de pré-aclimatização para avaliar a influência das condições de cultivo *in vitro* sobre a sobrevivência dos microenxertos em casa-de-vegetação, e durante a aclimatização foram testados dois diferentes períodos sob nebulização intermitente.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, os tratamentos com arranjo em fatorial 2x2, com a adição (20 g L⁻¹) ou ausência de sacarose no meio de cultura WPM e 2 períodos sob nebulização intermitente (15 e 30 dias). A frequência de nebulização foi de 10 segundos de nebulização a cada 20 minutos. Cada tratamento possuía três repetições e cinco microenxertos por unidade experimental.

Os microenxertos foram isolados no meio de cultura WPM, acrescido de 3 g L⁻¹ de Phytigel e 1 g L⁻¹ de carvão ativado com as duas concentrações de sacarose testadas, e permaneceram nestes meios por 30 dias. Após este período e lavagens sucessivas em água deionizada para retirada do excesso de meio de cultura, as plantas foram transferidas para a casa-de-vegetação, em bandejas de isopor de 128 células individualizadas com o substrato Plantmax HT[®] e mantidas em nebulização intermitente por 15 ou 30 dias. Após 30 dias em casa-de-vegetação com rega diária foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

Para todos os experimentos, os dados coletados foram analisados pela análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o MSTAT.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Microenxertia e sua caracterização morfológica em *A. angustifolia*

Nos tratamentos com garfagem de topo em fenda cheia, as médias obtidas para os microenxertos com fenda aberta mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre o hipocótilo e o epicótilo, com 4,44 % de microenxertos com fenda aberta no epicótilo e 37,8 % no hipocótilo dos porta-enxertos. A presença de fenda aberta está diretamente relacionada com a morte dos microenxertos, pois impedem o contato entre as duas partes e o restabelecimento da conexão dos vasos condutores (Figura 2A, 3B). A inviabilidade dos enxertos também pode ocorrer pelo deslocamento do enxerto sobre o porta-enxerto (Figura 3-A), com o desparelhamento dos tecidos vasculares entre as duas partes, também verificado por Nunes *et al.*, 2005. Outro fator que deve ser observado nas microenxertias em *A. angustifolia* é o desenvolvimento de gemas adventícias do porta-enxerto, que podem inclusive se tornar dominantes em relação ao microenxerto e devem ser retiradas (Figura 3C).

O hipocótilo foi testado como órgão para microenxertia por apresentar um diâmetro uniforme e maior do que o dos epicótilos dos porta-enxertos de *A. angustifolia* testados. O hipocótilo forma, junto com a radícula, a região abaxial do embrião da *A. angustifolia*, que se caracteriza como uma região cilíndrica e de diâmetro uniforme, onde estão inseridos os dois cotilédones (Hertel, 1980).

A maior porcentagem de microenxertos com fenda aberta no hipocótilo pode estar relacionada à sua estrutura, sendo que alguns autores não consideram que o hipocótilo possua estrutura radicular, caulinar ou de órgão composto parcialmente de raiz e caule. Para Souza e Oliveira (2004) foi adotado na descrição do hipocótilo de *Tabebuia avellanae* e *T. chrysotricha* o conceito de região de transição. Isto também é aceito por anatomistas, como Esau (1985), que ressalta que a região do hipocótilo representa uma conexão, sendo uma região intermediária entre a raiz e o caule.

A porcentagem de microenxertos sobreviventes mostrou uma interação significativa entre os fatores: idade dos porta-enxertos e tipo de enxertia e interação entre local do microenxerto e tipo de enxertia (Tabela 8). Para o fator idade dos porta-enxertos, nas plantas com 6 e 12 meses, não houve diferença significativa entre a porcentagem de microenxertos sobreviventes para os dois tipos de enxertia, mas para os porta-enxertos com dois meses a garfagem de topo sem fenda foi mais eficiente, não apresentando microenxertos mortos (Tabela 8). Em relação ao tipo de enxertia, na garfagem de topo sem fenda, os resultados foram semelhantes estatisticamente; já na garfagem de topo em fenda cheia, os porta-enxertos com 12 meses apresentaram maior porcentagem de microenxertos sobreviventes do que os porta-enxertos com dois e seis meses.

O local do microenxerto causou diferenças significativas quando realizadas no hipocótilo, com a garfagem de topo sem fenda sendo mais eficiente quanto à sobrevivência dos microenxertos (Tabela 8). A garfagem de topo sem fenda não apresentou diferenças entre o epicótilo e o hipocótilo; entretanto, para a garfagem de topo em fenda cheia, aquelas realizadas no epicótilo apresentaram maior média de microenxertos sobreviventes em relação às realizadas no hipocótilo. O valor elevado do coeficiente de variação foi resultado da utilização de um número reduzido de microenxertias por repetição.

TABELA 8 - PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE MICROENXERTIAS REALIZADAS EM DUAS REGIÕES DISTINTAS NO PORTA-ENXERTO, COM TRÊS IDADES DE PORTA-ENXERTOS E DOIS TIPOS DE ENXERTIA EM *A. angustifolia*.

Idade do porta-enxerto (meses)	Tipo de enxertia	
	Garfagem de topo em fenda cheia (%)	Garfagem de topo sem fenda (%)
2	76,7 B b	100,0 A a
6	73,4 A b	86,7 A a
12	96,7 A a	86,7 A a
Local do microenxerto	Garfagem de topo em fenda cheia (%)	Garfagem de topo sem fenda (%)
Epicótilo	93,4 A a	88,9 A a
Hipocótilo	71,1 B b	93,3 A a
C V (%)	79,1	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

As porcentagens de microenxertos sobreviventes foram boas quando comparadas com outros dados obtidos em trabalhos com macieira, nos quais Nunes *et al.* (2005) obtiveram uma porcentagem de sobrevivência de até 93 % para a cultivar ‘Gala’ microenxertada sobre ‘M9’ e de 86 % para ‘Gala’ microenxertada sobre ‘Marubakaido’. Em *Citrus*, a microenxertia com brotações regeneradas *in vitro* apresenta 100 % de sobrevivência (Silva *et al.*, 2005).

A sobrevivência dos microenxertos comprova a capacidade organogênica dos tecidos para a regeneração e indica que esta técnica é viável e que pode ser utilizada na produção de mudas microenxertadas para a espécie, abrindo perspectivas para a produção de mudas de alta qualidade a partir de microenxertias com ápices de plantas adultas.

A porcentagem de microenxertos vivos com calo aparente na região da enxertia (Figura 2-B), apresentou uma interação significativa entre os três fatores, idade dos porta-enxertos, local e tipo da enxertia (Tabela 9). Para os porta-enxertos com 2 meses, quando a microenxertia foi realizada no caule, a porcentagem de calo aparente foi maior para a garfagem de topo em fenda cheia. O inverso ocorreu para as microenxertias realizadas no hipocótilo, com 100 % dos microenxertos com calo aparente na garfagem de topo sem fenda. Quanto ao tipo de enxertia, na garfagem de topo em fenda cheia, não houve diferenças significativas entre o enxerto no epicótilo e no hipocótilo; já para a garfagem de topo sem fenda, o epicótilo apresentou uma média de microenxertos com calo inferior em relação ao hipocótilo.

Nos porta-enxertos com 6 meses de idade, não houve diferença entre os tipos de enxertias realizadas no caule; mas, para as realizadas no hipocótilo, a garfagem de topo em fenda cheia apresentou uma média significativamente superior de microenxertos com calo que a garfagem de topo sem fenda (Tabela 9).

TABELA 9 - PORCENTAGEM DOS MICROENXERTOS COM CALO SUPERFICIAL NA REGIÃO DA ENXERTIA, EM MICROENXERTIAS REALIZADAS EM DUAS REGIÕES DISTINTAS NO PORTA-ENXERTO (EPICÓTILO E HIPOCÓTILO), COM TRÊS IDADES DE PORTA-ENXERTOS E DOIS TIPOS DE ENXERTIA EM *A. angustifolia*.

Idade do porta-enxerto (meses)	Local do microenxerto	Tipo de enxertia	
		Garfagem de topo em fenda cheia	Garfagem de topo sem fenda
2	epicótilo	46,6 A a	6,6 B b
	hipocótilo	53,3 B a	100,0 A a
6	epicótilo	0,0 A b	13,3 A a
	hipocótilo	40,0 A a	6,6 B a
12	epicótilo	40,0 A a	6,6 B b
	hipocótilo	66,6 A a	60,0 A a
C V (%)		37,5	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

Nos porta-enxertos com 12 meses, não houve diferença entre os dois tipos de enxertia quando realizadas no hipocótilo; no entanto, no epicótilo, a enxertia por garfagem de topo sem fenda apresentou menor porcentagem de calo. Para o tipo de enxertia, apenas a garfagem de topo sem fenda apresentou diferenças significativas, com maior porcentagem de calo nos microenxertos realizados no hipocótilo.

Os dados permitem visualizar que, de um modo geral, a porcentagem de calo superficial formado foi maior nas microenxertias realizadas no hipocótilo, indicando uma diferença na sua estrutura, que, conforme Pilati e Souza (2006), mesmo em fase mais adiantada de crescimento secundário uma medula parenquimática é mantida.

A formação de calo indica a proliferação celular, com potencialidade para gerar novos elementos vasculares, que possibilitam a conexão vascular entre o enxerto e o porta-enxerto. Nunes *et al.* (2005) também constataram a formação de calo em microenxertias realizadas com variedades de porta-enxerto e copa de macieira.

Após a microenxertia, ocorreu a formação de camadas de células parenquimáticas que preencheram o local do microenxerto (Figura 2C) e a diferenciação de algumas destas células em novas células cambiais, que restabeleceram a conexão cambial entre os tecidos (Figura 2D). Estas observações estão de acordo com as de Abreu e Pedrotti (2003), que observaram em macieira o restabelecimento das conexões cambiais e o conseqüente crescimento do enxerto 30 dias após a microenxertia. Abreu *et al.* (2003) observaram na mesma espécie, 30 dias após a microenxertia, células meristemáticas cambiais na copa próximas à interface do enxerto, penetrando no porta-enxerto. Algumas destas células ainda eram indiferenciadas e outras já se caracterizavam como parenquimáticas ou vasculares jovens.

O crescimento do enxerto indica o sucesso da enxertia. A primeira evidência da proliferação celular é o início do crescimento do enxerto, pois indica o restabelecimento das conexões vasculares entre os tecidos (Nunes *et al.*, 2005). De acordo com Abreu e Pedrotti (2003), para viabilizar a microenxertia é necessário que as células da base do microenxerto entrem novamente em divisão e se desdiferenciem, induzindo novas competências, como a de se diferenciar para formar novos tecidos estruturais e condutores.

Após 90 dias da microenxertia, a diferença entre os tamanhos dos microenxertos foi significativa com relação à idade dos porta-enxertos, ao local do microenxerto e ao tipo de enxertia (Tabela 10).

TABELA 10 - TAMANHO MÉDIO DOS MICROENXERTOS APÓS 90 DIAS DA MICROENXERTIA, COM VARIAÇÃO NA IDADE DO PORTA-ENXERTO, NO LOCAL DA ENXERTIA E NO TIPO DE ENXERTIA EM *A. angustifolia*.

Idade do porta-enxerto (meses)	Crescimento dos microenxertos (cm)
2	0,47 c
6	0,92 a
12	0,60 b
Local do microenxerto	Crescimento dos microenxertos (cm)
Epicótilo	0,81 a
Hipocótilo	0,51 b
Tipo de enxertia	Crescimento dos microenxertos (cm)
Garfagem de topo em fenda cheia	0,87 a
Garfagem de topo sem fenda	0,45 b
C V (%)	60,8

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

Os porta-enxertos com 6 meses de idade apresentaram o maior crescimento dos microenxertos e o menor foi observado em porta-enxertos com 2 meses. Isso confirma as observações de Paz e Pasqual (1998) que mostraram que a idade do microporta-enxerto é um fator que influencia o sucesso da enxertia.

Quanto ao local da enxertia, o maior crescimento foi obtido para as microenxertias realizadas no epicótilo, o que provavelmente foi devido à maior semelhança entre os tecidos enxertados. A garfagem de topo em fenda cheia apresentou o maior crescimento dos microenxertos após 90 dias, sendo atribuída a este tipo de enxertia um maior contato entre as partes enxertadas, o que pode ter favorecido o restabelecimento precoce das conexões vasculares e a sobrevivência dos microenxertos.

4. 3.2 Microenxertia e plagiotropismo

Ocorreu a presença de plagiotropismo em todos os microenxertos (Figura 3-H) feitos com garfos de ramos secundários, em contraste com as autoenxertias realizadas no início do trabalho (Figura 3-G), que não apresentaram plagiotropismo devido aos microenxertos serem provenientes de plantas germinadas *in vitro* sem ramos secundários diferenciados. A porcentagem de sobrevivência média foi de 65 % dos microenxertos e o crescimento médio dos microenxertos foi de 0,7 cm aos 90 dias.

O plagiotropismo é uma característica própria da araucária, e segundo Hertel (1980) todas as gemas do caule principal são ortotrópicas, com exceção daquelas que originam os ramos dos verticilos que apresentam crescimento horizontal. Os ramos secundários provenientes dos verticilos já diferenciados apresentam todas as suas gemas axilares plagiotrópicas. Apenas o ápice de plantas germinadas *in vitro* que ainda não tiveram verticilos diferenciados são ortotrópicos, assim como as gemas do caule principal, sendo este o material propício para enxertia, pois resultam em plantas com desenvolvimento ortotrópico normal. A determinação para o plagiotropismo das gemas axilares na *A. angustifolia* já foi citada por Hertel (1980), sendo que apenas a gema apical e as situadas na base das folhas do caule são ortotrópicas. Iritani *et al.* (1992) também obtiveram brotações ortotrópicas normais quando cultivaram *in vitro* segmentos caulinares de mudas de *A. angustifolia* com 30 a 60 dias, ainda sem a presença dos verticilos, comprovando a presença de meristemas axilares ortotrópicos no caule.

Este fato dificulta e restringe a disponibilidade de material apropriado para a microenxertia com plantas adultas, pois por planta adulta obteríamos apenas uma gema ortotrópica. No entanto, o corte do ápice nas plantas adultas pode ser uma alternativa estimulando a formação de brotações ortotrópicas que poderiam ser utilizadas para microenxertias ou outros processos de propagação vegetativa.

4.3.3 Efeito da BAP nas microenxertias

Nos experimentos com autoenxertias e aplicação de BAP no ponto da microenxertia, os resultados quanto à porcentagem de sobrevivência, porcentagem de calo superficial e crescimento dos microenxertos após 90 dias da enxertia não apresentaram interação entre os dois fatores testados, tipo de garfo e tratamento sem ou com BAP ($4,4 \mu\text{M L}^{-1}$) no ponto da enxertia. Apenas o tipo de garfo utilizado na enxertia resultou em diferenças estatisticamente significativas para a porcentagem de calo superficial e crescimento após 90 dias, sendo que a maior porcentagem de calo foi obtido para garfos subapicais e maior crescimento em garfos apicais (Tabela 11).

A presença de mais calo superficial nas microenxertias com garfos subapicais pode ser resultado do tecido mais lignificado do garfo utilizado, já que na *A. angustifolia* a lignificação dos tecidos é citada como uma das dificuldades para a enxertia (Iritani, 1997). Nos garfos apicais o grau de lignificação é menor e com menor diferenciação dos tecidos.

O menor crescimento nos microenxertos com garfos subapicais é resultado da necessidade de diferenciação de gemas axilares, já que o meristema apical foi retirado. Como na *A. angustifolia* não ocorre a presença de uma gema axilar completa na base das folhas, mas apenas um grupo de células meristemáticas, que livres da dominância apical podem se desenvolver em gemas axilares (Iritani *et al.*, 1992) há um período maior até que gema axilar se desenvolva e inicie o seu crescimento, resultando em microenxertos menores.

A aplicação de BAP no ponto da enxertia resultou em médias semelhantes para sobrevivência, calo superficial e crescimento (Tabela 11), não sendo necessária a aplicação de regulador vegetal no ponto da enxertia. No entanto, Nunes *et al.* (2005) testaram BAP e AIB tanto adicionados ao meio de cultura como aplicados no ponto da enxertia, para microenxertos em macieira, não encontrando diferenças significativas quanto à sobrevivência, mas indicaram a utilização de BAP no ponto da enxertia para aumento do número de folhas formadas e altura da copa.

TABELA 11 - PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA E DE CALO SUPERFICIAL APÓS 60 DIAS DA MICROENXERTIA E CRESCIMENTO DOS MICROENXERTOS, COM E SEM APLICAÇÃO DE BAP NO PONTO DA ENXERTIA E COM DOIS TIPOS DE GARFOS PARA A ENXERTIA EM *A. angustifolia*.

Tipo de garfo	Sobrevivência (%)	Calo superficial (%)	Crecimento após 90 dias (mm)
Apical	93,3 a	3,3 b	14,3 a
Subapical	88,3 a	10,0 a	6,7 b
Concentração da BAP			
0 $\mu\text{M L}^{-1}$	91,7 a	6,7 a	10,3 a
4,4 $\mu\text{M L}^{-1}$	90,0 a	6,7 a	10,7 a
C. V. (%)	7,8	61,2	41,8

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

Já para porcentagem de microenxertos com crescimento após 60 dias da microenxertia, houve interação entre os dois fatores testados. Mas apenas houve diferenças entre garfos apicais e subapicais na ausência de tratamento pulso no local da enxertia, com elevado crescimento nos microenxertos com garfos apicais (Tabela 12). Como citado por Nunes *et al.* (2005), a aplicação de reguladores vegetais no ponto da enxertia pode aumentar a capacidade regenerativa dos tecidos, facilitando o restabelecimento dos vasos condutores. Isso não ocorreu no presente trabalho, demonstrando que a aplicação de reguladores vegetais não é necessária para aumentar a sobrevivência dos microenxertos de *A. angustifolia*.

TABELA 12 - PORCENTAGEM DE MICROENXERTOS COM CRESCIMENTO APÓS 60 DIAS DA MICROENXERTIA, EM *A. angustifolia*, COM OU SEM TRATAMENTO PULSO DE BAP NO LOCAL DA ENXERTIA E DOIS TIPOS DE GARFO.

Tipo de garfo	Concentração de BAP	
	0 $\mu\text{M L}^{-1}$	4,4 $\mu\text{M L}^{-1}$
Apical	60,0 A a	36,7 A a
Subapical	6,7 A b	16,7 A a
C. V. (%)	33,3	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

Nas enxertias com meristemas apicais, a aplicação dos tratamentos com BAP resultou em porcentagens de sobrevivência diferentes. A aplicação de BAP no ponto da enxertia ou no meio de cultura diminuiu a porcentagem de sobrevivência dos microenxertos em relação ao tratamento testemunha (Tabela 13). No tratamento com a aplicação de BAP 4.438,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ no ponto da

enxertia a dosagem de BAP foi muito forte e causou a oxidação e morte de todos os microenxertos.

Outro efeito prejudicial que pode ser induzido pela aplicação de BAP, é a estimulação de gemas adventícias no porta-enxerto, no entanto, isto não foi verificado nos microenxertos. Às dificuldades de regeneração *in vitro* já citada por muitos autores para a *A. angustifolia*, mesmo com material juvenil induziu a utilização de BAP no meio de cultivo e/ou no ponto da enxertia, no intuito de aumentar a proliferação celular e facilitar a conexão entre os tecidos do porta-enxerto juvenil e o meristema apical da planta adulta. No entanto, o caráter meristemático dos meristemas apicais microenxertados para a formação de novos tecidos foi favorável, resultando em ótimos índices de sobrevivência obtidos nas microenxertias realizadas com duas plantas distintas (uma masculina e outra feminina), com 100 % de sobrevivência dos microenxertos, e crescimento médio de 0,75 cm dos microenxertos após 60 dias da enxertia. Estes dados demonstram a capacidade regenerativa de meristemas apicais de plantas adultas quando microenxertados e a compatibilidade dos tecidos de diferentes plantas utilizados nas microenxertias, possibilitando o sucesso desta técnica para a produção de mudas clonadas, mesmo para plantas masculinas ou femininas.

TABELA 13 - PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE MICROENXERTOS COM MERISTEMAS DE PLANTA ADULTA SOBRE PORTA-ENXERTOS GERMINADOS *IN VITRO* DE *A. angustifolia*, COM OU SEM APLICAÇÃO DE BAP NO PONTO DE ENXERTIA OU NO MEIO DE CULTURA, APÓS 30 DIAS DA MICROENXERTIA.

Tratamento	Sobrevivência (%)
Aplicação de BAP (4.438,5 $\mu\text{M L}^{-1}$) no ponto da enxertia	0 c
Aplicação de BAP (443,8 $\mu\text{M L}^{-1}$) no ponto da enxertia	27 b
Adição de BAP (8,8 $\mu\text{M L}^{-1}$) no meio de cultivo	27 b
Sem aplicação de BAP no ponto da enxertia (testemunha)	67 a
C. V. (%)	33,3

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

Todos os microenxertos apresentaram plagiotropismo, devido à utilização de meristemas apicais de ramos secundários. Novos trabalhos devem ser realizados no sentido de evitar ou reverter o plagiotropismo encontrado nos microenxertos oriundos de meristemas apicais de plantas adultas, sendo que a utilização de meristemas de brotações ortotrópicos induzidas pela

poda de ápices pode ser uma saída para a produção de mudas clonadas com desenvolvimento normal.

4.3.4 Aclimatização dos microenxertos

Em relação à porcentagem de sobrevivência, não houve interação e nem efeito individual dos fatores testados, pré-aclimatização e tempo de nebulização (Tabela 14). A adição de sacarose ao meio de cultura é necessária para fornecer carbono para a planta, que em condições *in vitro*, é heterotrófica. A pré-aclimatização com presença de sacarose no meio de cultura aumentaria a reserva de carboidratos nas plantas, disponibilizando mais energia durante o processo de aclimatização. Entretanto, a necessidade de sacarose vem sendo discutida por alguns autores. De acordo com Kozai (1991), na presença de açúcar, as plantas não desenvolvem capacidade fotoautotrófica, podendo causar crescimento reduzido e morte de mudas durante a fase de aclimatização. Entretanto, para uma planta ser completamente autotrófica *in vitro* é necessário fornecer condições com elevada intensidade luminosa e trocas gasosas.

TABELA 14 - PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE MICROENXERTOS DE *A. angustifolia*, APÓS 30 DIAS DE PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO *IN VITRO* E ACLIAMATIZAÇÃO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO, COM VARIAÇÃO NO PERÍODO DE NEBULIZAÇÃO INTERMITENTE.

Tratamento de pré-aclimatização	Sobrevivência (%)
Sem sacarose	50 a
20 g L ⁻¹ de sacarose	67 a
Aclimatização sob nebulização intermitente	
15 dias	60 a
30 dias	57 a
C. V. (%)	24,2

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

A eficiência na sobrevivência das plantas durante a aclimatização também está ligada às características de cada espécie, sendo que no caso da *A. angustifolia*, a complementação com sacarose na fase de pré-aclimatização não elevou os valores de sobrevivência. O período sob nebulização intermitente reduzido (15 dias) pode ter resultado em valores semelhantes ao outro tratamento devido ao excesso de água acumulado no substrato com 30 dias e que conforme as características da espécie não é uma das condições ideais para o seu desenvolvimento.

4.4 CONCLUSÕES

As metodologias desenvolvidas permitem concluir que o processo de microenxertia em *Araucaria angustifolia* é eficiente e factível para plantas jovens e ramos plagiotrópicos. Recomenda-se na propagação *in vitro* de *A. angustifolia* a enxertia de garfagem de topo sem fenda de meristemas ortotrópicos, realizada no epicótilo de plantas com dois meses de germinação.

4.5 PERSPECTIVAS

A utilização da microenxertia para a propagação vegetativa da *A. angustifolia* mostrou ser eficiente para plantas jovens. Em experimentos, conduzidos pela equipe de pesquisa em *A. angustifolia* da Pós-Graduação em Produção Vegetal, a estaquia e a enxertia também mostram resultados satisfatórios na produção de mudas para a araucaria. No entanto, todas estas técnicas encontraram uma dificuldade que é própria da espécie, a carência de ramos e gemas vegetativas ortotrópicas, o que limita a utilização destas técnicas para a produção de mudas em larga escala. Neste sentido, os trabalhos com propagação vegetativa desta espécie devem prever esta barreira e tentar superá-la, com a utilização de técnicas mais elaboradas de propagação vegetativa ou a utilização de material vegetativo ortotrópico, proveniente da gema apical ou de rebrotas desta.

4.6 REFERÊNCIAS

- ABREU, M. F. *et al.* Estudos histológicos preliminares da microenxertia de plantas micropropagadas de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 195-196, 2003.
- ABREU, M. F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação de macieira. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 31, p. 100-108, 2003.
- CARVALHO, R. I. N. Fisiologia de produção de espécies frutíferas. In: WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002, p. 135-182.

CORTIZO, M.; ALONSO, P.; FERNÁNDEZ, B.; RODRIGUEZ, A.; CENTENO, M. L.; ORDÁS, R. Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. **Annals of Forest Science**, v. 61, p. 843-845, 2004.

ESAU, K. **Anatomia vegetal**. 3.ed. Barcelona: Omega, 1985. 780 p.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p.123-142, 1968.

FRAGA, M. F.; CANAL, M. J.; ARAGONES, A.; RODRIGUEZ, R. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. **Annals of Forest Science**, v. 59, p. 155-161, 2002.

HARTMANN, H. T. et al. Principles of tissue culture for micropropagation. In: _____. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p. 549-589.

HERTEL, R. J. G. **Interpretação morfológica da *Araucaria angustifolia***. 1980. 143f. Tese (Concurso para professor titular na área de Morfologia Vegetal) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

IRITANI, C. **Ação de reguladores de crescimento na propagação vegetativa por estaquia de *Ilex paraguariensis* Saint Hilare e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. 1981. 163 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. 1997. 200 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I: Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, 21 (1, 2), p. 57-76, 1992.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book. 1940. 523 p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**., v. 3, p. 421-427, 1980.

KOZAI, T. **Micropropagation under photoautotrophic conditions**. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (eds). Micropropagation – technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991, p. 447-469.

NUNES, J. C. O. *et al.* Caracterização morfológica de microenxertia em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 80-83, 2005.

PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologias e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 p.

PAZ, O. P.; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998, v. 1, p. 147-160.

PILATI, R.; SOUZA, L. A. Morfoanatomia da plântula de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. (Ulmaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2006.

SANTOS, A. L. *et al.* Somatic embryogenesis in Parana pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 01, p. 97-104, 2002.

SILVA, R. P. *et al.* Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n.12, p.1153-1159, 2005.

SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, J. H. G. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb e *T. chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. (Bignoniaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 217-226, 2004.

ZANETTE, F. IRITANI, C.; CISLINSKI, J. Aspectos básicos da cultura *in vitro* de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 9, p 7-13, 1987.

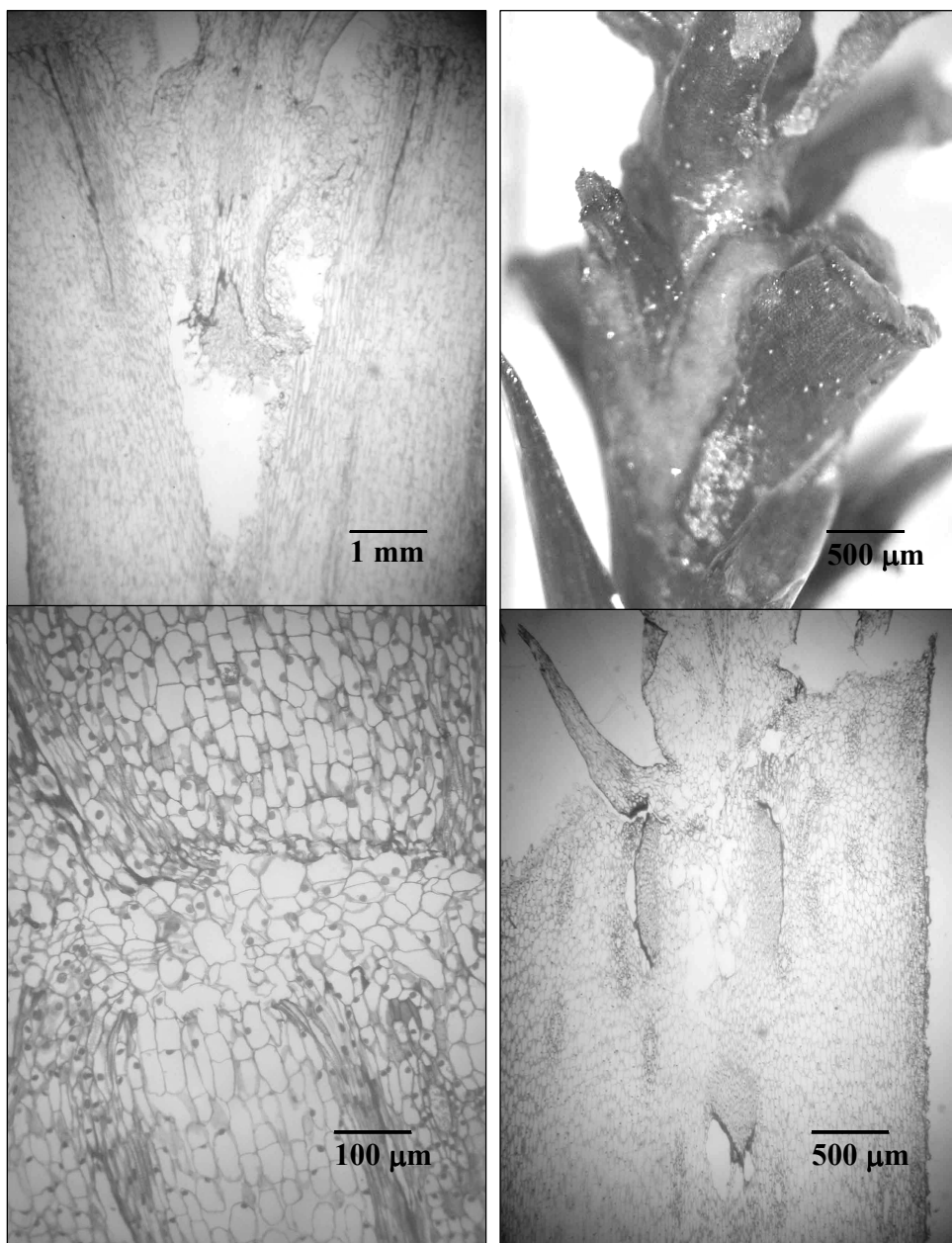


FIGURA 02 - MICROENXERTIAS EM *A. angustifolia*; **A)** GARFAGEM DE TOPO NO HIPOCÓTILO, 30 DIAS APÓS A MICROENXERTIA; **B)** GARFAGEM DE TOPO EM FENDA CHEIA NO CAULE, PRESENÇA DE CALO INDICANDO A SOLDADURA ENTRE AS PARTES ENXERTADAS, 60 DIAS APÓS A MICROENXERTIA; **C)** INTERFACE MICROENXERTO E PORTA-ENXERTO, GARFAGEM DE TOPO SEM FENDA, 30 DIAS APÓS A MICROENXERTIA; **D)** GARFAGEM DE TOPO EM FENDA CHEIA NO HIPOCÓTILO, COM A PROLIFERAÇÃO DO TECIDO CAMBIAL DO MICROENXERTO, 90 DIAS APÓS A MICROENXERTIA.

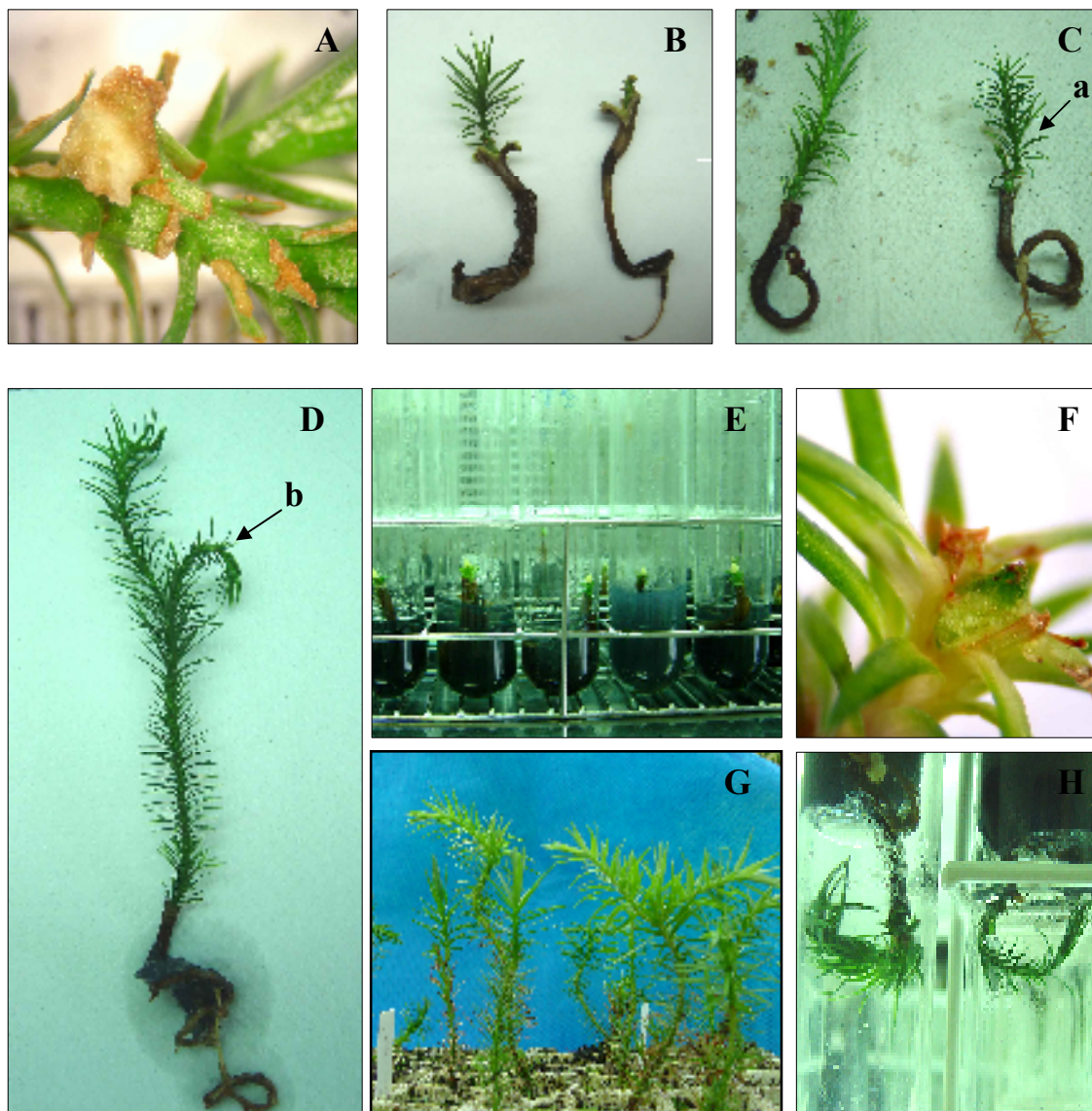


FIGURA 03 - MICROENXERTIAS EM *A. angustifolia*; **A)** DESLOCAMENTO DO GARFO MICROENXERTADO; **B)** FENDA ABERTA NO HIPOCÓTILO; **C)** MICROENXERTIAS COM **a)** CRESCIMENTO DE GEMA LATERAL NO PORTA-ENXERTO E DOMINANTE EM RELAÇÃO AO MICROENXERTO; **D)** PLANTA GERMINADA *IN VITRO* COM **b)** RAMO SECUNDÁRIO PLAGIOTRÓPICO; **E** E **F)** MICROENXERTIAS COM MERISTEMAS DE PLANTAS ADULTAS E **G)** CRESCIMENTO ORTOTRÓPICO E **H)** PLAGIOTRÓPICO DO MICROENXERTO.

5 CAPÍTULO III - POLINIZAÇÃO CONTROLADA EM *Araucaria angustifolia*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar uma metodologia para polinização controlada em *Araucaria angustifolia*, visando o melhoramento genético da espécie e o aumento da produção de pinhões por meio do manejo com polinizações suplementares. Para tanto foi desenvolvida uma metodologia de polinização controlada por meio de vários experimentos realizados entre 2003 e 2005. Foram avaliados os efeitos da polinização controlada, da quantidade de pólen aplicada por ginostrobilo, a época de polinização e o estágio de desenvolvimento do ginostrobilo durante a polinização sobre o número de pinhões produzidos por pinha. Uma única polinização controlada resulta em baixa produção de pinhões cheios e a polinização em estádios mais avançados de desenvolvimento do ginostrobilo resulta em valores elevados de pinhões cheios por pinha. A polinização controlada em *A. angustifolia* é efetiva para a produção de pinhões e a sua aplicação em cruzamentos dirigidos, permitirá que cruzamentos, hoje impossíveis na natureza pela grande distância entre os pais, possam ocorrer. A polinização controlada realizada duas vezes nos ginostrobilos com mais de 30 mm de diâmetro aumenta a produção de pinhões por pinha.

Palavras-chave: pólen, ginostrobilos, pinhões, pinhas.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine a methodology for controlled pollination in *Araucaria angustifolia*, targeting the breeding of species and increasing production of pine nuts through pollen handling with suplementar pollination. A methodology was developed for controlled pollination and experiments were carried out from 2003 to 2005. The effects of controlled pollination, the amount of applied pollen by ginostrobili (female strobili), and the time of pollination and development stage of ginostrobilus during pollination upon the number of pine nuts produced by each pine cones. The results indicated that a single controlled pollination leads to low seed production and also that the pollination of pine nuts carried out in ginostrobili with more advanced development stages results in high pine nuts filled by pine cones. A controlled pollination in *A. Angustifolia* is effective in the production of pine nuts and their application will allow crossings between individuals so distant in the nature that today is impossible to happen naturally. The controlled pollination should be done twice in ginostrobili over 30 mm diameter to increase productivity.

Key words: pollen, ginostrobili, pine nuts, pine cones.

5.1 INTRODUÇÃO

A exploração tradicional da *A. angustifolia*, principalmente para a produção de madeira, destruiu grande parte da Floresta com Araucária. Do imenso território ocupado por este tipo de vegetação restam, atualmente, pequenos remanescentes isolados geograficamente. Grande parte da variabilidade genética desta espécie foi perdida e devido à distância entre os remanescentes o fluxo gênico foi interrompido ou severamente limitado.

A atual legislação impede a exploração da *A. angustifolia* no intuito de impedir a derrubada das árvores. A comercialização dos pinhões pode ser uma alternativa para aqueles que plantaram ou possuem áreas com araucária e que hoje consideram esta espécie um entrave ao desenvolvimento da sua propriedade. A utilização de práticas de manejo na *A. angustifolia*, visando o aumento na produção de pinhas, pode tornar o pinhão uma fonte de renda anual, com retorno econômico para as áreas plantadas com araucária.

Um anseio da sociedade é a manutenção da Floresta com Araucária, pois a exploração do pinhão pode impedir a regeneração natural da floresta. Para tanto, existe a necessidade de orientação e de normatização da exploração do pinhão, com uma estrutura física e humana comprometida em realizar um trabalho sério e efetivo e que possa resultar em retorno econômico para aqueles que plantam esta espécie com o propósito de produção de pinhões e impedir a exploração extrativista nas populações naturais. O desenvolvimento de um sistema de certificação sócio-ambiental do pinhão pode também contribuir para valorizá-lo como produto especializado para mercados mais valorizados. Além da inclusão do pinhão nos programas de combate a fome, para valorização da cultura (Floriani, 2007).

O consumo do pinhão e a expansão deste mercado, ainda são muito afetados pela sazonalidade da sua produção, que se restringe a alguns meses do ano. O pinhão, como alimento, não possui estudos suficientes que possibilitem a sua industrialização e a sua comercialização é feita de maneira desorganizada impedindo a sua disponibilidade nas regiões não produtoras de pinhão.

De acordo com Pires (2003), em Estados tipicamente agrícolas como o Paraná, medidas de incentivo à recuperação de áreas florestais são mais eficientes quando refletem sobre a

economia do agricultor, assim a conservação das Florestas com Araucária deve estar apoiada na preservação integral e no uso sustentável da área de preservação.

O conhecimento da biologia reprodutiva é fundamental para garantir a produção de semente melhorada nos pomares de semente, que constituem parte fundamental de programas de melhoramento genético de espécies florestais e promover por técnicas de propagação vegetativa a precocidade de produção nas mudas.

Em populações de campo, com baixa densidade de plantas, a produção de estróbilos por planta é maior do que nos remanescentes florestais (Mantovani *et al.*, 2004), possivelmente pela menor disputa por luz e nutrientes do solo. À distância entre as plantas também favorece a permanência dos verticilos basais por mais tempo na planta, pois não há o atrito e choques mecânicos com galhos das plantas vizinhas como ocorre na floresta fechada. Neste sentido, a produção de pinhões pode ser aumentada com práticas de manejo simples, pois o controle do ambiente é um fator primordial para que a árvore cresça e produza de maneira desejada. Desta forma o manejo que se deseja difundir para os plantios de *A. angustifolia* que visam à produção de pinhões é o maior espaçamento entre as árvores e manutenção do maior número de verticilos vegetativos por árvore, sem desbaste de ramos, visando aumentar a capacidade reprodutiva. Como há um forte controle ambiental da floração (Powell, 1977), a manipulação florestal com manutenção de menor número de árvores por hectare pode tornar-se dispendiosa em grandes plantios, no entanto, pode ser justificada economicamente em pomares produtores de sementes.

A polinização controlada pode ser uma importante ferramenta no melhoramento genético (IPEF, 1977), pois os pinhões formados podem apresentar elevado grau de heterose, o que favorece a identificação e seleção de progênies que possuam características de importância como alta produtividade e maior capacidade de adaptação a condições ambientais distintas (Brigatti *et al.*, 1983).

Neste sentido o objetivo deste trabalho foi determinar uma metodologia de polinização controlada em *A. angustifolia*, visando dar subsídios a trabalhos futuros de melhoramento genético da espécie e o aumento da produção de pinhões pelo manejo com polinizações suplementares.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

No ano de 2003 foram iniciados os experimentos com polinização controlada em *A. angustifolia*. Foram utilizadas plantas adultas em fase reprodutiva, todas identificadas e localizadas no Campus do Setor de Ciências Agrárias da UFPR.

5.2.1 Efeito da polinização controlada no número de pinhões produzidos por pinha

Para este propósito foram selecionadas 3 plantas femininas e 1 masculina. O delineamento foi o inteiramente casualizado com os tratamentos em arranjo fatorial 3x2, sendo três plantas matrizes e dois tratamentos de polinização (testemunhas com polinização aberta e polinizadas artificialmente). Cada tratamento foi composto por quatro repetições, com uma pinha por unidade experimental.

No mês de agosto, com auxílio de caminhão equipado com plataforma elevatória, foram isolados com sacos plásticos, ginostrobilos, ainda fechados, nas plantas femininas selecionadas. O isolamento foi realizado para evitar a contaminação com pólen de outras plantas e retirado somente após o término do período de polinização (Figura 4).

O pólen utilizado foi coletado dos androstróbilos no dia de cada polinização. O pólen foi retirado, peneirado e depositado em pissete com bico para aspersão sobre o ginostrobilo.

No período de polinização, setembro e outubro, quando os ginostrobilos estavam abertos, o isolamento foi retirado e feita uma polinização manual com o pólen retirado do macho selecionado. As pinhas testemunhas não sofreram este tratamento, sendo apenas identificadas com etiquetas.

As pinhas polinizadas e as testemunhas foram colhidas de abril a julho de 2005.

No mês de janeiro, foram selecionados 10 ramos de cada matriz, sendo cinco ramos com pinhas tratadas e 5 com pinhas testemunhas. Nestes ramos foi realizada uma contagem do número de pinhas necrosadas em relação ao número de pinhas sadias. Foram utilizadas quatro matrizes que sofreram os tratamentos de polinização controlada. Os dados foram transformados em porcentagem de pinhas necrosadas para pinhas tratadas e testemunhas nas quatro matrizes.

Em 2005, durante a colheita das pinhas tratadas no ano de 2003, foram selecionadas duas pinhas identificadas e polinizadas artificialmente em 2 das matrizes selecionadas. Os pinhões foram retirados e armazenados em “freezer” para congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior extração

de enzimas e confirmação da paternidade através do método de eletroforese de gel de amido horizontal.

As enzimas foram extraídas dos embriões pela metodologia desenvolvida por Sousa (2000) através de um tampão contendo 0,5 % de sacarose, 9,7 mM de DDT (ditiotreitól), 3 % de PVP-15 (polivinilpirrolidona), 1,3 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e 14,9 mM de soro albumina bovina, dissolvida em tampão 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,5. Para a identificação dos parentais, foram utilizados brotos apicais retirados no dia, e as enzimas foram extraídas com um tampão de extração adaptado por Shimizu *et al.* (2000). Papéis absorventes foram embebidos nas amostras de enzima e colocadas na linha de origem de migração, nos géis de amido (2,5 % de penetrose e 3,5 % de sacarose), para a separação das isoenzimas por eletroforese. Nesse procedimento utilizou-se dois sistemas gel/eletrodo: lítio–borato modificado de Ashton e Braden (1961) e o sistema Tris-citrato. As enzimas retiradas dos parentais foram dispostas no início dos géis e seguidos por 10 amostras de diferentes embriões da mesma pinha que permaneceram correndo em condições especiais por um determinado período. O lítio-borato correu por 5 horas a corrente máxima de 80 mA e potência de 30 V/cm. Já o tris-citrato correu por 5 horas e meia à corrente máxima de 180 mA e potência de 20 V/cm. As bandas de atividade enzimática nos géis foram reveladas com tampões específicos para as enzimas GOT (glutamato oxaloacetato transaminase – E.C. 2.6.1.1) e MDH (malato desidrogenase - 1.1.1.37), que apresentaram um maior polimorfismo do que outras isoenzimas em análises anteriores (Sousa, 2000), e por isso foram escolhidas.

5.2.2 Efeito da quantidade de pólen utilizado na polinização controlada sobre o número de pinhões produzidos por pinha

Para esse propósito foram realizados nos anos de 2003 e 2004 experimentos com variação na quantidade de pólen aspergido sobre as pinhas isoladas. O isolamento ocorreu no mês de agosto e setembro e a polinização foi realizada no mês de outubro.

O experimento foi realizado em apenas uma planta matriz, com delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x4, sendo dois anos de polinização (2003 e 2004) e quatro tratamentos:

1. Testemunhas (não isoladas e sujeitas à polinização aberta),
2. Pinhas isoladas seguidas de uma única polinização (1,1 g de pólen),

3. Pinhas isoladas seguidas de uma única polinização com excesso de pólen (3,3 g de pólen),
4. Pinhas isoladas sem polinização.

Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com uma pinha por unidade experimental. Nas pinhas polinizadas artificialmente foram realizados os mesmos processos de isolamento e polinização descritos no item anterior 5.2.1.

As pinhas polinizadas e as testemunhas foram colhidas em abril de 2005 e 2006.

5.2.3 Efeito da época de polinização e do estágio de desenvolvimento do ginostrobilo sobre o número de pinhões produzidos por pinha

No ano de 2003, foi realizado um experimento para avaliar a influência do estágio de desenvolvimento do ginostrobilo durante a polinização na produção de pinhões.

Para isto, foram isolados ginostrobilos fechados no mês de setembro em duas plantas selecionadas e durante o período de polinização (setembro e outubro) foram realizadas polinizações controladas em diferentes estágios de desenvolvimento do ginostrobilo.

O experimento foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2x4, sendo duas plantas matrizes e 4 tratamentos:

1. Ginostrobilos sem isolamento e polinização aberta (testemunhas),
2. Ginostrobilos fechados e polinizados com o corte das folhas de proteção (forçado),
3. Ginostrobilos abrindo com menos de 30 mm de diâmetro,
4. Ginostrobilos abertos com mais de 30 mm de diâmetro.

Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com uma pinha por unidade experimental. O tratamento que consistiu na polinização forçada de ginostrobilos ainda fechados resultou na morte de todas as pinhas que foram tratadas, por isto este tratamento não foi avaliado e descartado nos demais experimentos.

Nas pinhas polinizadas artificialmente foram realizados os mesmos processos de isolamento e polinização descritos no item 5.2.1. A polinização foi única e de acordo com o estágio de desenvolvimento do ginostrobilo que se desejava testar (Figura 5-ABCD).

As pinhas polinizadas e as testemunhas foram colhidas de abril a junho de 2005.

No ano de 2004, realizou-se novamente um experimento para avaliar o estágio de desenvolvimento do ginostrobilo durante a polinização controlada, com o objetivo de determinar

o estádio mais apropriado para a polinização controlada e com maior produção de pinhões por pinha.

Para isto, foram isolados ginostrobilos fechados no mês de agosto numa planta selecionada, e durante o período de polinização (setembro e outubro) foram realizadas polinizações controladas em diferentes estádios de desenvolvimento do ginostrobilo.

O experimento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos:

1. Testemunhas sem isolamento e polinização aberta;
2. Ginostrobilos abrindo (menos de 30 mm de diâmetro);
3. Ginostrobilos abertos (de 30 a 40 mm de diâmetro);
4. Ginostrobilos abertos (mais de 40 mm de diâmetro).

Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com uma pinha por unidade experimental.

Nas pinhas polinizadas artificialmente foram realizados os mesmos processos de isolamento e polinização descritos no item 5.2.1. A polinização foi única e de acordo com o estádio do ginostrobilo que se desejava testar.

As pinhas polinizadas e as testemunhas foram colhidas em abril de 2006.

5.2.4 Efeito de polinizações seguidas em ginostrobilos sobre o número de pinhões por pinha

Como foi observado que nos anos anteriores, as pinhas que sofreram polinização controlada tiveram uma redução no número de pinhões por pinha, houve a necessidade de melhorar a técnica, para aumentar a produtividade. Para isto, no ano de 2005, foi realizado um experimento com polinizações consecutivas.

O experimento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3, sendo duas plantas matrizes e 3 tratamentos (1 polinização, 2 polinizações e 3 polinizações semanais consecutivas). Na primeira semana todos os ginostrobilos foram polinizados, na segunda semana apenas os do 2º e 3º tratamentos e na terceira semana apenas os do 3º tratamento. Cada tratamento constou de cinco repetições com uma pinha por unidade experimental.

As pinhas produzidas foram colhidas em abril e maio de 2007.

Para todos os experimentos, após a colheita das pinhas foram avaliados o número total de pinhões (cheios + chochos) e a porcentagem de pinhões cheios em relação aos chochos. Os dados

coletados foram analisados pela análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o MSTAT.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Efeito da polinização controlada no número de pinhões produzidos por pinha

Observou-se uma variação no número total de pinhões (cheios + chochos) entre as plantas matrizes avaliadas, indicando que a capacidade produtiva das pinhas é variável com relação à planta mãe (Tabela 15). Diferenças na massa das sementes e no número de sementes por pinha também foram descritas por Mantovani *et al.* (2004), indicando o efeito da planta sobre estas características, no entanto, a massa das sementes e o número de sementes por pinha são homogêneos dentro da planta. De acordo com Carvalho (1994), os ginostrobilos podem variar quanto à quantidade de sementes, de 5 a 150 sementes produzidas por pinha, sendo que a massa pode chegar a 4,7 Kg cada pinha.

Algumas plantas apresentam pinhas nos ramos primários e secundários (Anselmini *et al.*, 2006), o que pode aumentar a capacidade produtiva destas plantas por conter um elevado número de pinhas por ramo. No entanto, as pinhas dos ramos secundários são menores que as dos ramos primários, e isto pode refletir na capacidade produtiva da pinha, com um número de óvulos disponíveis para fecundação menor do que nas pinhas de ramos primários. A matriz 3 utilizada é um exemplo de planta com grande produtividade por apresentar pinhas nos dois tipos de ramos, mas a capacidade de produção de pinhões por pinha foi menor do que nas duas outras plantas testadas, que não possuíam pinhas nos ramos secundários.

TABELA 15 - NÚMERO TOTAL DE PINHÕES (CHEIOS + CHOCHOS) DE PINHAS PROVENIENTES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA E ABERTA, COLHIDAS EM 2005, EM TRÊS MATRIZES DE *A. angustifolia*.

Matrizes	Nº total de pinhões (cheios + chochos)
1	147,3 a
2	157,7 a
3	104,7 b
Tipo de polinização	
Aberta	141,0 a
Controlada	132,0 a
C V (%)	16,1

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação ao número total de pinhões produzidos por pinhas polinizadas artificialmente e testemunhas, as médias foram estatisticamente semelhantes, o que demonstra que a capacidade produtiva máxima das pinhas é um fator determinado pela planta mãe (genético ou fisiológico), mesmo com disponibilidade de pólen. O número de folhas modificadas com óvulos na sua base é determinado no início da formação da pinha, antes do período de polinização, o que pode variar posteriormente é o número de pinhões cheios, que foram fecundados e o número de pinhões chochos que não foram fecundados. A distância entre as plantas masculinas e femininas esta diretamente relacionada ao número de pinhões cheios por pinha, quanto maior a proximidade entre essas plantas maior a disponibilidade de pólen para os ginostrobilos. Outro fator que pode influenciar na disponibilidade de pólen é a precocidade de abertura do ginostrobilo. Como já descrito por Anselmini *et al.* (2006), algumas plantas apresentam abertura do ginostrobilo precoce, logo no início do período de polinização e outras mais tardia. As plantas femininas que apresentam abertura do ginostrobilo precoce, logo no início do período de polinização, mas estão próximas a plantas masculinas que tem liberação do pólen tardia, terão menor disponibilidade de pólen e conseqüente menor número de pinhões cheios.

Já para Kramer e Kozlowski (1979), o padrão de floração e frutificação em espécies florestais é muito irregular e imprevisível. A produção de frutos e sementes varia não apenas entre as espécies, mas também entre as árvores da mesma espécie e de ano para ano na mesma árvore.

A partir do ano de 2003, início dos experimentos com polinização controlada, foi observada a necrose de uma porcentagem significativa das pinhas, tanto tratadas como testemunhas, que ocorre de um a dois meses após a polinização (Figura 5-EF), com uma perda significativa de pinhas, após este período crítico, no entanto, não se observa mais a ocorrência da necrose nas pinhas restantes.

A necrose das pinhas variou entre plantas e entre os dois tratamentos, mas nas pinhas polinizadas artificialmente a média de necrose foi igual ou inferior ao das pinhas testemunhas (Figura 6). A média geral de necrose nas pinhas polinizadas artificialmente foi de 36 % e nas testemunhas 42 %. A utilização de isolamento plástico, nas pinhas tratadas poderia aumentar a umidade e a temperatura no local da pinha favorecendo a proliferação de fungos ou outros patógenos. No entanto, os dados comprovam que o tratamento com polinização controlada não interferiu aumentando a média de necrose.

A causa da necrose das pinhas não foi identificada, podendo ser resultado da presença de patógenos ou de fatores biológicos da própria planta, como disponibilidade de nutrientes e de fatores ambientais, como pluviosidade e temperatura. Conforme Smith e Hinckley (1995), as estruturas reprodutivas são responsáveis pelo consumo de 6 a 10 % do produto fotossintético produzido e muitas espécies produzem mais estruturas reprodutivas do que chegam a maturação. O aborto de flores ou estróbilos é resultado da presença de condições ambientais adversas que restringem a assimilação de carbono, ou como sugerido por Powell (1977), uma grande produção de pinhas reduz a produção do ano seguinte porque há um grande consumo de carbono pelas pinhas em desenvolvimento que inibe a indução de verticilos laterais e o seu crescimento.

De acordo com Mantovani *et al.* (2004), nas plantas femininas foram encontradas diferenças significativas entre os anos no número de ginostrobilos produzidos por planta. A sazonalidade de produção de pinhões entre anos, já citada por outros autores (Sousa, 2000; Mantovani *et al.*, 2004), pode ser resultante de um maior ou menor índice de pinhas necrosadas nos diferentes anos, por polinização deficiente ou por clima desfavorável (chuvas intermitentes).

Em relação à porcentagem de pinhões cheios e chochos por pinhas, houve interação entre os dois fatores testados, matrizes e tipo de polinização. Em relação ao número de pinhões cheios, tanto a matriz 1 como a 2 apresentaram maior número de pinhões cheios na polinização aberta, já a matriz 3 não apresentou diferença entre as duas médias (Tabela 16). Na polinização aberta, as matrizes diferiram entre si, com maior média na matriz 1. Na polinização controlada, as matrizes 1 e 2 também apresentaram maior número de pinhões cheios do que na matriz 3.

TABELA 16 - PORCENTAGEM DE PINHÕES CHEIOS E CHOCHOS DE PINHAS PROVENIENTES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA E ABERTA, EM TRÊS MATRIZES DE *A. angustifolia*, COLHIDAS EM 2005.

Matrizes	Pinhões cheios (%)		Pinhões chochos (%)	
	Tipo de polinização		Tipo de polinização	
	aberta	controlada	aberta	controlada
1	72,5 A a	35,5 B a	27,5 B c	64,5 A b
2	47,2 A b	32,0 B a	52,7 B b	68,0 A b
3	9,5 A c	7,5 A b	90,5 A a	92,2 A a
C V (%)	16,5		9,50	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

O resultado obtido nas pinhas testemunhas está relacionado à disponibilidade de pólen vindo de machos próximos. Neste sentido pode-se concluir que a matriz 1 e 2, além de possuírem pinhas com capacidade produtiva maior, estão localizadas próximas a plantas masculinas com maior disponibilidade de pólen, o que possibilitou a produção de maior número de pinhões cheios e menor número de pinhões chochos.

Na polinização controlada, tanto para pinhões cheios e chochos, as pinhas das matrizes 1 e 2 apresentaram médias elevadas em relação a matriz 3. Além da capacidade produtiva das pinhas, a disponibilidade de pólen vai influenciar no número final de pinhões cheios. Nas pinhas polinizadas artificialmente, apesar da quantidade de pólen aplicada por pinha ter sido muito maior do que ocorreria naturalmente, o pólen foi aplicado uma única vez, enquanto que nas pinhas testemunhas a disponibilidade de pólen pode ter sido diária e por um período de quase dois meses, correspondente ao período de polinização, e que pode ter resultado numa produção maior.

O menor número de pinhões cheios obtidos das pinhas provenientes de polinização artificial demonstra que a técnica ainda não está adequada, necessitando de ajuste como a identificação do melhor período para a polinização ou polinizações consecutivas.

Não há trabalhos registrados de polinização controlada dentro da espécie, mas Tesdorff (1956) obteve híbridos interespecíficos em *A. angustifolia*, polinizada com pólen de *Araucaria araucana* e obteve pinhas com média de 2 a 3 pinhões. O autor sugere a diminuição da capacidade germinativa do pólen armazenado por mais de 10 meses como o fator causador desta baixa produtividade. O que não foi o caso em nossos experimentos, pois o pólen utilizado foi colhido no mesmo dia da aplicação.

Os zimogramas avaliados para MDH (Figura 7) e GOT foram totalmente fixados, tanto para os pais como progênies permitindo concluir que não houve a presença de alelos externos aos indivíduos envolvidos nos cruzamentos, dando o indício que os cruzamentos foram efetivos. Assim, o isolamento com sacos plásticos foi efetivo. Todavia o fato de todos os indivíduos envolvidos terem sido homozigotos, resultado provavelmente do nível de parentesco entre os indivíduos testados, dificulta essa certeza.

5.3.2 Efeito da quantidade de pólen utilizado na polinização controlada sobre o número de pinhões produzidos por pinha

Em relação ao número total de pinhões, não ocorreu interação entre os dois fatores testados. No entanto, houve diferenças estatísticas significativas entre os dois anos avaliados, com maior número de pinhões para o ano de 2003 (Tabela 17). Isto indica que a capacidade produtiva das pinhas é variável entre plantas, mas também pode variar entre safras numa mesma planta. A formação das pinhas, que inicia nove meses antes da polinização (Anselmini *et al.*, 2006), pode ser afetada por fatores ambientais e nutricionais da planta podendo resultar em maior ou menor número de óvulos formados.

O número total de pinhões por pinhas também foi variável entre os 4 tratamentos testados (Tabela 17). As testemunhas com maior número de pinhões (cheios + chochos) por pinha diferiram das polinizadas artificialmente com única polinização. Esta diferença observada foi resultado da utilização de pinhas de ramos primários e secundários nos diferentes tratamentos, que possuem capacidade produtiva diferente. O tratamento com polinização controlada com única polinização, pode ter sido aplicado em mais pinhas de ramos secundários do que pinhas de ramos primários, diminuindo a sua média total de pinhões.

TABELA 17 - NÚMERO TOTAL DE PINHÕES (CHEIOS + CHOCHOS), DE PINHAS PROVENIENTES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA E ABERTA, COM VARIAÇÃO NA QUANTIDADE DE PÓLEN APLICADO, COLHIDAS EM 2005 E 2006, EM *A. angustifolia*.

Ano da polinização	Nº total de pinhões (cheios + chochos)
2003	142,1 a
2004	106,5 b
Tratamento	
Polinização aberta (testemunhas)	142,1 a
Polinização controlada com única polinização	104,6 b
Polinização controlada com excesso de pólen	126,1 ab
Pinhas isoladas sem polinização	124,4 ab
C. V. (%)	21,9

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 1 % de probabilidade de erro.

O efeito dos tratamentos é mais bem visualizado quando se compara o número de pinhões cheios em relação ao número de pinhões chochos. Neste caso houve interação dos dois fatores testados, ano de polinização e tratamentos de polinização (Tabela 18).

TABELA 18 - PORCENTAGEM DE PINHÕES, CHEIOS E CHOCHOS, DE PINHAS DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA E ABERTA COM VARIAÇÃO NA QUANTIDADE DE PÓLEN APLICADO, COLHIDAS EM 2005 E 2006, EM *A. angustifolia*.

Tratamentos	Pinhões cheios (%)		Pinhões chochos (%)	
	Ano da polinização		Ano da polinização	
	2003	2004	2003	2004
Polinização aberta (testemunhas)	42,7 A a	31,0 A ab	52,8 B c	69,4 A b
Polinização controlada com única polinização	36,0 A b	27,6 B b	64,0 B b	72,4 A b
Polinização controlada com excesso de pólen	36,2 A b	36,4 A a	63,8 A b	64,8 A b
Pinhas isoladas sem polinização	0,0 A c	0,0 A c	100,0 A a	100,0 A a
C V (%)	18,4		6,6	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 1 % de probabilidade de erro.

A porcentagem de pinhões cheios com relação ao tratamento de polinização resultou em diferenças entre os anos apenas para o tratamento com polinização controlada com uma única polinização, sendo maior para o ano de 2003. No ano de 2003, a maior produtividade foi obtida nas pinhas testemunhas, seguida pelos tratamentos de polinização controlada com ou sem excesso de pólen, já no ano de 2004 as pinhas testemunhas não diferiram do tratamento com excesso de pólen.

A polinização controlada com excesso de pólen somente foi positiva em relação ao número de pinhões produzidos em 2004, sendo que em 2003 a utilização deste tratamento foi semelhante à polinização controlada sem excesso de pólen.

A possibilidade de aumento na produtividade deve estar mais relacionada ao momento da polinização (receptividade do ginostrobilo) e as condições ambientais do que propriamente na quantidade de pólen disponível, pois o ginostrobilo produz um número definido de óvulos que limita a produção de sementes.

A porcentagem de pinhões chochos indicou diferenças estatisticamente significativas entre os anos para as testemunhas e para as pinhas de polinização controlada com única polinização, com maior número de pinhões chochos no ano de 2004 (Tabela 18). Vários fatores podem ter contribuído para que tanto pinhas testemunhas como tratadas apresentassem mais pinhões chochos em 2004 do que em 2003, como condições ambientais adversas nos meses de polinização e a capacidade produtiva menor das pinhas em 2004.

O tratamento com pinhas isoladas sem polinização foi conduzido para indicar se o isolamento utilizado nas polinizações controladas era adequado, os resultados demonstram a efetividade do isolamento plástico para impedir a entrada de pólen, com 100 % de pinhões chochos.

Os valores de pinhões chochos estão bem acima daqueles citados por Mantovani *et al.* (2004), com uma porcentagem de 1,6 % de pinhões chochos para pinhas que se encontravam numa população natural preservada há mais de 45 anos. Resultado da menor disponibilidade de pólen nas pinhas testemunhas e tratadas.

5.3.3 Efeito da época de polinização e do estágio de desenvolvimento do ginostrobilo sobre o número de pinhões produzidos por pinha

O número total de pinhões por pinha indica semelhança na capacidade produtiva entre as plantas matrizes (Tabela 19), mas diferenças entre as pinhas utilizadas nos diferentes tratamentos. A utilização de pinhas de ramos secundários novamente pode ter causado esta diferença, já que a capacidade produtiva total da pinha não foi afetada pelos tratamentos de polinização, como discutido anteriormente.

TABELA 19 - NÚMERO TOTAL DE PINHÕES (CHEIOS + CHOCHOS), DE PINHAS PROVENIENTES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA E ABERTA EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO GINOSTRÓBILO, EM DUAS MATRIZES DE *A. angustifolia*, COLHIDAS EM 2005.

Matriz	Nº total de pinhões (cheios + chochos)
1	141,0 a
2	140,2 a
Tratamento	
Polinização aberta (testemunhas)	154,4 a
Ginostrobilo abrindo (- 30 mm de diâmetro)	118,4 b
Ginostrobilo aberto (+ 30 mm de diâmetro)	149,1 a
C V (%)	16,5

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 1 % de probabilidade de erro.

Interação estatisticamente significativa foi observada para as porcentagens de pinhões cheios e chochos, entre a matriz e os tratamentos com polinização. Para a porcentagem de pinhões cheios, ocorreu diferenças entre as matrizes apenas para a testemunhas, possivelmente decorrente da presença de plantas masculinas mais próximas ou em maior número próximas a matriz 2

(Tabela 20). Considerando o tratamento matriz, observou-se que para a matriz 1, tanto as pinhas testemunhas como aquelas do tratamento com o ginostrobilo aberto (+ de 30 mm), foram semelhantes entre si e maiores do que as do tratamento com o ginostrobilo abrindo (- 30 mm). Para a matriz 2, as testemunhas apresentaram a maior média, seguida pelo tratamento com o ginostrobilo aberto (+ 30 mm) e com menor média para os ginostrobilos abrindo (- 30 mm).

Para a porcentagem de pinhões chochos, novamente os valores mais positivos, ou seja, com menor porcentagem de pinhões chochos, ocorreu no tratamento com os ginostrobilos abertos (+ 30mm) e nas pinhas testemunhas (Tabela 20).

TABELA 20 - PORCENTAGEM DE PINHÕES, CHEIOS E CHOCHOS, DE PINHAS DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA E ABERTA EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO GINOSTRÓBILO, EM DUAS MATRIZES DE *A. angustifolia*, COLHIDAS EM 2005.

Tratamentos	Pinhões cheios (%)		Pinhões chochos (%)	
	Matriz		Matriz	
	1	2	1	2
Polinização aberta (testemunhas)	46,8 B a	73,2 A a	53,2 A b	26,8 B c
Ginostrobilo abrindo (< 30 mm)	5,0 A b	7,4 A c	95,0 A a	92,6 A a
Ginostrobilo aberto (> 30 mm)	43,0 A a	37,4 A b	57,0 A b	62,6 A b
C V (%)	18,5		10,2	

Médias não seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 1 % de probabilidade de erro.

Para o ano de 2004, os resultados com polinizações em diferentes estádios de desenvolvimento do ginostrobilo, demonstraram que o número total de pinhões por pinha foi semelhante nas pinhas utilizadas nos quatro tratamentos. Houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para a porcentagem de pinhões cheios, com maior média no tratamento com o ginostrobilo aberto (> de 40 mm de diâmetro) e menor no tratamento com o ginostrobilo abrindo (30-40 mm de diâmetro). Para a porcentagem de pinhões chochos, o tratamento com os ginostrobilos abertos (> 40 mm de diâmetro), apresentaram menor média de pinhões chochos (Tabela 21).

Os resultados obtidos nos anos de 2005 e 2006, em diferentes estádios de desenvolvimento do ginostrobilo indicam estádios mais tardios de desenvolvimento (ginostrobilo com + de 30 mm de diâmetro) como o período mais adequado para a polinização controlada com uma única aplicação de pólen. A maior produtividade neste estágio pode ser devida ao maior

tamanho das folhas modificadas que facilitam a permanência dos grãos de pólen no local e a entrada do tubo polínico entre as folhas do ginostrobilo e a fatores fisiológicos como a receptividade do ginostrobilo, aumentando a sua aptidão para a produção de sementes.

De acordo com Martins *et al.* (1981), a determinação do estágio adequado do ginostrobilo, para o isolamento e receptividade para a polinização, são os pontos críticos que devem ser considerados na polinização suplementar.

TABELA 21 - NÚMERO TOTAL DE PINHÕES (CHEIOS + CHOCHOS), E PORCENTAGEM DE PINHÕES CHEIOS EM RELAÇÃO AOS CHOCHOS DE PINHAS PROVENIENTES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA E ABERTA EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO GINOSTRÓBILO, EM *A. angustifolia*, COLHIDAS EM 2006.

Tratamento (estádio do ginostrobilo)	Nº total de pinhões (cheios + chochos)	Pinhões cheios (%)	Pinhões chochos (%)
Testemunhas	131,0 a	30,6 ab	69,4 ab
Abrindo (< 30 mm de diâmetro)	87,2 a	20,8 ab	79,2 ab
Aberto (30 a 40 mm de diâmetro)	92,2 a	7,6 b	92,4 a
Aberto (> 40 mm de diâmetro)	114,0 a	41,4 a	58,6 b
C V (%)	30,7	69,9	23,4

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

A maior receptividade dos ginostrobilos em estádios mais avançados pode afetar a produtividade entre os anos, pois variações no período de polinização, com a liberação de pólen mais concentrada no início do período de polinização, quando os ginostrobilos ainda estão pequenos podem afetar negativamente a produtividade, no entanto, pode favorecer aquelas plantas femininas que apresentam precocidade na abertura dos ginostrobilos.

Há variação na dispersão do pólen entre os anos, sendo que a mesma esta relacionada com as condições de pluviosidade e umidade. Nos anos mais secos, a dispersão tende a ser mais rápida, diminuindo o período de polinização e concentrando a disponibilidade de pólen em poucas semanas, e em anos mais úmidos a tendência é de um período de polinização mais longo, podendo chegar até a três meses (Sousa, 2000).

A umidade é outro fator fundamental para a abertura dos microesporângios e a liberação do pólen. Observa-se que em dias de sol e com vento ocorre uma nuvem de pólen, nos dias chuvosos a alta umidade e a falta de altas temperaturas impedem a abertura dos microesporângios e a liberação do pólen. Assim, a ocorrência de dias quentes e secos pode alterar a disponibilidade

de pólen durante a época de polinização, causando diferenças na produtividade entre plantas femininas precoces e tardias, favorecendo aquelas que estiverem com os ginostrobilos em estádios mais avançados de desenvolvimento quando ocorrer uma maior concentração de pólen disponível.

5.3.4 Efeito de polinizações sucessivas em ginostrobilos sobre o número de pinhões por pinha

O número total de pinhões foi semelhante nas pinhas avaliadas. Não houve interação para a porcentagem de pinhões cheios e chochos, mas os mesmos influenciaram os resultados separadamente. A matriz 2 apresentou maior produtividade em relação a matriz 1, com maior média de pinhões cheios e menor de pinhões chochos (Tabela 22). Como as matrizes foram polinizadas no mesmo período, a característica de precocidade na abertura do ginostrobilo pode ter influenciado na diferença de produtividade, já que os tratamentos foram semelhantes entre as plantas, mas o estágio de desenvolvimento dos ginostrobilos polinizados pode ter variado.

Nos tratamentos com polinizações sucessivas, o tratamento 2 (duas polinizações consecutivas), resultou na maior média de pinhões cheios por pinha e na menor média de pinhões chochos (Tabela 22).

TABELA 22 - PORCENTAGEM DE PINHÕES CHEIOS EM RELAÇÃO AOS CHOCHOS DE PINHAS PROVENIENTES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA ÚNICA, DUPLA OU TRIPLA, COLHIDAS EM 2005, EM DUAS MATRIZES DE *A. angustifolia*.

Matriz	Total de pinhões (cheios + chochos)	Pinhões cheios (%)	Pinhões chochos (%)
1	108 b	8,1 b	91,9 a
2	126 a	22,3 a	77,6 b
Tratamento		Pinhões cheios (%)	Pinhões chochos (%)
Polinização única	122 a	8,3 b	91,7 a
Polinização dupla	120 a	23,3 a	76,7 b
Polinização tripla	107 b	14,0 b	86,0 a
C V (%)		38,5	6,9

Médias não seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro.

A aplicação única de pólen, durante todo o período de polinização pode ser insuficiente para a produção de pinhões, pois vários fatores como chuva ou calor excessivo podem prejudicar a capacidade de germinação do pólen. Além disso, se o pólen não for colocado em ginostrobilos

receptivos na ocasião da polinização, haverá uma queda na formação de sementes. Na polinização aberta o ginostrobilo fica exposto ao pólen que vem transportado pelo vento por um período de dois meses, assim se ocorrer uma chuva forte que retire todo o pólen armazenado sobre o ginostrobilo ainda há possibilidade de receber mais pólen durante o restante do período de polinização. A maturação dos androstróbilos nas plantas masculinas também é variável, ocorrendo plantas mais precoces, que liberam o pólen no início da época de polinização, e algumas plantas mais tardias que vão liberar o pólen mais tardiamente, isto também favorece a polinização por diferentes pais nas pinhas produzidas por polinização aberta.

5.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a polinização controlada em *Araucaria angustifolia* confirmam a possibilidade da aplicação imediata da metodologia em cruzamentos controlados, permitindo que cruzamentos, hoje impossíveis na natureza pela grande distância entre os pais, possam ocorrer.

Duas polinizações consecutivas em 2 semanas, em ginostrobilos com mais de 30 mm de diâmetro, aumenta o número de pinhões cheios por pinha.

5.5 PERSPECTIVAS

A presença de necrose nas pinhas, após a época de polinização, pode ser considerada mais um fator que atua sobre a variação na produção de pinhas e pinhões entre os anos. O estudo da causa desta necrose torna-se importante quando o objetivo é a produção de pinhões, pois controlar ou diminuir a ocorrência de necrose pode resultar numa maior produção de pinhões no ano. Fatores fisiológicos da planta mãe interferem na ocorrência de necrose, como foi observado em nosso trabalho, no entanto, pode ocorrer pela presença de patógenos, como por exemplo, fungos. Neste sentido avaliar a ocorrência da necrose junto com as condições ambientais de cada ano pode ser fundamental, pois as variações na pluviosidade e na temperatura, entre os meses de outubro e dezembro, podem interferir na proliferação destes patógenos.

A metodologia desenvolvida para cruzamentos controlados mostrou-se eficiente, no entanto, a baixa produção de pinhões ainda é um fator limitante quando o objetivo é o aumento na produção de pinhões. A utilização de um maior número de polinizações sucessivas, com diferentes períodos entre as aplicações devem ser testadas em diferentes anos. A capacidade

produtiva da planta mãe também é um fator determinante na produção de pinhões, a presença de pinhas com número variável de pinhões viáveis foi observado entre as plantas matrizes utilizadas nos experimentos.

5.6 REFERÊNCIAS

- ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F.; BONA, C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – Pr. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.13, n.1, p. 44-52, 2006.
- ASHTON, G. C.; BRADEN, A. W. Serum beta-globulin polymorphism in mice. *Australian Journal of Biology Science*, v. 14, p. 48-254, 1961.
- BRIGATTI, R. A.; FERREIRA, M.; BEIG, O.; FREITAS, M. Polinização controlada em *Eucalyptus urophylla* – um programa desenvolvido pela Champion Papel e Celulose S. A. **Silvicultura**: São Paulo, v. 8, n. 28, p. 213-215, 1983.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. EMBRAPA- CNPFlorestas, Colombo. 639 p.
- FLORIANI, G. S. Debulhando pinha, semeando pinhão: propostas de uso e conservação para a araucária. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n.1, p. 1803-1806, 2007.
- IPEF: Instituto de pesquisas e estudos florestais. Produção de híbridos de *Eucalyptus* spp através da polinização controlada. **Circular Técnica**, Piracicaba, n. 9, p. 1-4, 1977.
- KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Physiology of woody plants**. New York: Academic Press, 1979. 811 p.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004.
- MARTINS, M. E.; PRERA, L. E. H.; KAGEYAMA, P. Y. Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. IPEF: **Circular Técnica**, n. 128, 1981. 7p.
- PIRES, P. T. L. **Alternativas políticas e jurídicas para a gestão das florestas de araucária no Estado do Paraná**. Tese, 207 f. (Doutorado em Ciências Florestais - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal) Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- SMITH, W. K.; HINCKLEY, T. M. **Resource physiology of conifers: acquisition, allocation and utilization**. Academic Press: San Diego, 1995. 397p.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Gottingen, 2000, 161 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Florestais), Universidade de Goettingen.

TESDORFF, H. Experimentos de cruzamentos com *Araucaria araucana* (Molina) Koch e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Jornal de Genética Florestal e Melhoramento Florestal**, v. 5, p. 79-82, 1956.

POWELL, G. R. Initiation and development of subterminal buds in *Abies balsamea*. **Canadian Journal of Forest Research**, 7, p. 258-262, 1977.

SHIMIZU, J. Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, S. A. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 18-36, 2000.



FIGURA 04 - METODOLOGIA DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA EM *A. angustifolia*; **A)** BOTÃO REPRODUTIVO FECHADO; **B)** RETIRADA DAS ACÍCULAS QUE CIRCUNDAM O BOTÃO REPRODUTIVO; **C)** ISOLAMENTO DO BOTÃO FECHADO COM SACO PLÁSTICO; **D)** BOTÃO REPRODUTIVO ISOLADO EM AGOSTO; **E)** COLETA DE PÓLEN EM PLANTAS MASCULINAS DURANTE A ÉPOCA DE POLINIZAÇÃO, SETEMBRO E OUTUBRO; **F)** POLINIZAÇÃO SOBRE GINOSTRÓBILO ABERTO E **G)** GINOSTRÓBILO ISOLADO APÓS A POLINIZAÇÃO CONTROLADA.



FIGURA 05 - ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO GINOSTRÓBILO EM *A. angustifolia*; **A)** BOTÃO REPRODUTIVO FECHADO; **B)** BOTÃO REPRODUTIVO ABRINDO COM EXPOSIÇÃO DO GINOSTRÓBILO; **C)** GINOSTRÓBILO COM 1 SEMANA DE ABERTURA, DIÂMETRO MENOR DE 30 MM; **D)** GINOSTRÓBILO ABERTO A 2 SEMANAS, COM MAIS DE 30 MM DE DIÂMETRO; **E)** INÍCIO DA NECROSE EM PINHAS E **F)** ASPECTO DAS PINHAS APÓS A NECROSE COMPLETA, NO MÊS DE JANEIRO.

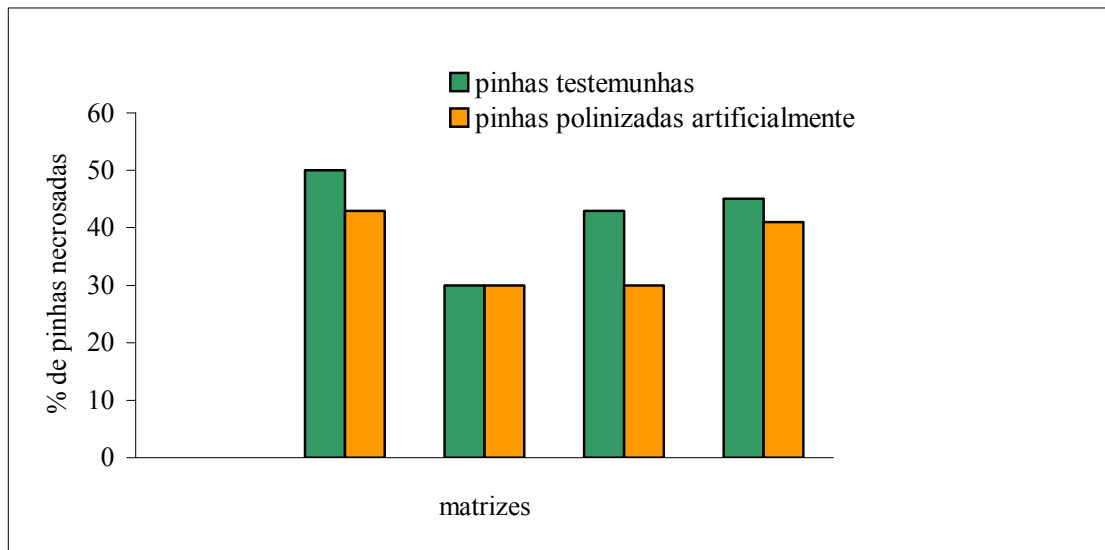


FIGURA 06 - PORCENTAGEM DE NECROSE EM PINHAS DE POLINIZAÇÃO ARTIFICIAL E ABERTA, EM 4 MATRIZES DE *A. angustifolia*, JANEIRO DE 2004.

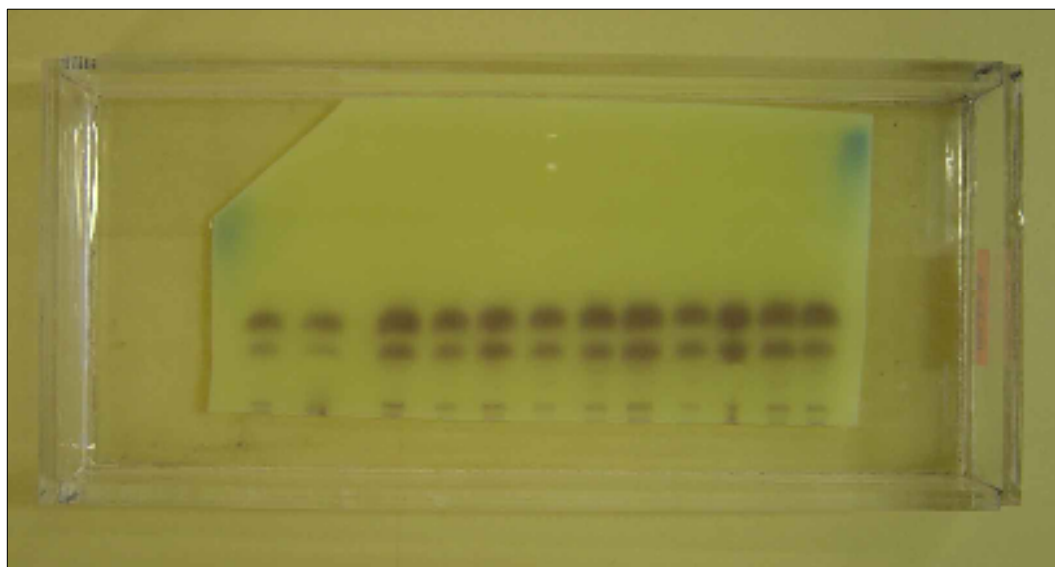


FIGURA 07 - GEL DE REVELAÇÃO PARA A ENZIMA MDH (MALATO DESIDROGENASE) PARA RAMOS E EMBRIÕES DE *A. angustifolia*; **a)** MÃE, **B)** PAI, **C1-C10)** 10 PINHÕES RETIRADOS DA MESMA PINHA.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Araucaria angustifolia* é uma planta que desperta o interesse de pesquisadores há muitos anos, pela sua importância econômica e social. Foi objeto de vários estudos e neste sentido é surpreendente como ainda restam dúvidas e informações contraditórias acerca desta espécie.

A fenologia reprodutiva já foi descrita por vários autores, em diferentes regiões do Brasil, mas alguns pontos, como a fecundação e a fertilização, são ainda deficientes de dados. O período longo desde a polinização até a formação de embrião, a demora na germinação do tubo polínico, aliado ao fato de que pode ocorrer na *A. angustifolia* um embrião líquido, dificulta a coleta e a descrição anatômica e cronológica da penetração do tubo polínico e da consequente fecundação. No entanto, estas dificuldades encontradas podem nortear futuros trabalhos com a descrição da fecundação nesta espécie.

A utilização da microenxertia para a propagação vegetativa da *A. angustifolia* mostrou ser eficiente para plantas jovens. Em experimentos, conduzidos pela equipe de pesquisa em *A. angustifolia* da Pós-Graduação em Produção Vegetal, a estaquia e a enxertia também mostram resultados satisfatórios na produção de mudas para a araucaria. No entanto, todas estas técnicas encontraram uma dificuldade que é própria da espécie, a carência de ramos e gemas vegetativas ortotrópicas na planta adulta, o que limita a utilização destas técnicas para a produção de mudas em larga escala e com crescimento normal. Neste sentido, os trabalhos com propagação vegetativa desta espécie devem prever esta barreira e tentar superá-la, com a utilização de técnicas mais elaboradas de propagação vegetativa ou a utilização de material vegetativo ortotrópico, proveniente da gema apical ou de rebrotas desta.

A metodologia desenvolvida para cruzamentos controlados mostrou-se eficiente, no entanto, a baixa produção de pinhões ainda é um fator limitante quando o objetivo é o aumento na produção de pinhões. A utilização de um maior número de polinizações sucessivas, com diferentes períodos entre as aplicações devem ser testadas em diferentes anos. A capacidade produtiva da planta mãe também é um fator determinante na produção de pinhões, a presença de pinhas com número variável de pinhões viáveis foi observado entre as plantas matrizes utilizadas nos experimentos.

As dificuldades impostas por esta espécie, tanto na descrição de seus processos reprodutivos como na sua propagação vegetativa, atuaram de maneira a criar várias hipóteses e contradições, mas também devem servir de estímulo para os demais pesquisadores como um desafio a ser vencido.

7 ANEXOS

Anexo 1 - Análise de variância do experimento de desinfestação das sementes de *A. angustifolia*, com variação na concentração do NaOCl, para as variáveis: contaminação bacteriana, fúngica e total.

	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Contaminação bacteriana	Contaminação fúngica	Contaminação total
Tratamentos	4	142,500 ^{ns}	1182,500 ^{**}	1432,500 ^{**}
Erro	15	88,333	61,667	103,333
Coefficiente de variação		89,51	23,44	23,10

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 2 - Análise de variância do experimento de desinfestação das sementes de *A. angustifolia*, com variação no tempo de imersão das sementes no NaOCl 6%, para as variáveis: contaminação bacteriana, fúngica e sobrevivência.

	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Contaminação bacteriana	Contaminação fúngica	Sobrevivência
Tratamentos	2	0,778 ^{ns}	3,111 [*]	1,444 ^{ns}
Erro	6	0,778	0,556	1,111
Coefficiente de variação		34,51	60,98	16,94

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 3 - Análise de variância do experimento de germinação *in vitro* das sementes de *A. angustifolia*, com variação no agente geleificante, na concentração de sacarose e na adição ou não de carvão ativado, no meio de cultura MS, para as variáveis: embriões germinados, vivos não-germinados e mortos.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Germinados	Vivos não-germinados	Mortos
Fator A (agente geleificante)	1	13,021 **	10,083 ^{ns}	6,012 **
Fator B (concentração de sacarose)	3	18,965 **	14,139 **	5,910 **
AB	3	2,410 ^{ns}	6,139 ^{ns}	1,243 ^{ns}
Fator C (adição ou ausência de carvão ativado)	1	35,021 **	8,333 ^{ns}	11,021 **
AC		2,521 ^{ns}	3,000 ^{ns}	0,187 ^{ns}
BC	1	2,188 ^{ns}	1,167 ^{ns}	1,021 ^{ns}
ABC	3	0,687 ^{ns}	4,056 ^{ns}	0,188 ^{ns}
Erro	3	1,646	2,813	0,750
Coefficiente de variação		36,44	45,22	51,32

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 4 - Análise de variância do experimento de germinação *in vitro* das sementes de *A. angustifolia*, com variação no agente geleificante, na concentração de sacarose e na adição ou não de carvão ativado, no meio de cultura WPM, para a porcentagem de embriões germinados.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios
		Embriões germinados
Fator A (agente geleificante)	1	10,083 *
Fator B (concentração de sacarose)	3	2,611 ^{ns}
AB	3	2,028 ^{ns}
Fator C (adição ou ausência de carvão ativado)	1	5,333 ^{ns}
AC	1	10,083 *
BC	3	0,944 ^{ns}
ABC	3	2,583 ^{ns}
Erro	32	1,438
Coefficiente de variação		17,13

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 5 - Análise de variância do experimento de germinação *in vitro* das sementes de *A. angustifolia*, com variação no meio de cultura e na concentração de sacarose, para a porcentagem de embriões germinados.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Embriões germinados	Embriões vivos não-germinados	Embriões mortos
Fator A (meio de cultura)	2	4623,333 **	1110,000 **	1243,333 **
Fator B (concentração de sacarose)	1	3,333 ns	1920,000 **	1763,333 **
AB	2	723,333 **	10,000 ns	703,333 *
Erro	24	88,333	73,333	78,333
Coeficiente de variação		18,19	32,94	39,63

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ns não significativo.

Anexo 6 - Análise de variância do experimento de autoenxertia *in vitro* de *A. angustifolia*, com variação na idade dos porta-enxertos, no local da enxertia e no tipo da enxertia, para as variáveis: porcentagem de sobrevivência, de microenxertos com calo superficial e crescimento médio dos microenxertos após 90 dias da enxertia.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Sobrevivência	Calo superficial	Crescimento
Fator A (idade do porta-enxerto)	2	433,333 ns	4433,333 **	0,650 *
Fator B (local do enxerto)	1	711,111 *	11377,778 **	0,783 *
AB	2	411,111 ns	877,778 **	0,069 ns
Fator C (tipo de enxertia)	1	711,111 *	711,111 ns	1,567 **
AC	2	877,778 **	411,111 ns	0,006 ns
BC	1	1600,000 **	1111,111 *	0,063 ns
ABC	2	100,000 ns	3344,444 **	0,015 ns
Erro	12	111,111	188,889	0,0160
Coeficiente de variação		79,06	37,48	60,80

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ns não significativo.

Anexo 7 - Análise de variância do experimento de autoenxertia *in vitro* de *A. angustifolia*, com variação no tipo de garfo utilizado na microenxertia, com ou sem aplicação de BAP no ponto da enxertia, para as variáveis: porcentagem de sobrevivência, de microenxertos com calo superficial e porcentagem de microenxertos com crescimento e crescimento médio após 60 dias da autoenxertia.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios			
		Sobrevivência	Calo superficial	Crescimento médio dos microenxertos	Microenxertos com crescimento
Fator A (tipo de garfo)	1	75,000 ^{ns}	133,333 [*]	176,333 [*]	4033,333 [*]
Fator B (aplicação de BAP)	1	8,333 ^{ns}	0,000 ^{ns}	0,333 ^{ns}	133,333 ^{ns}
AB	1	8,333 ^{ns}	0,000 ^{ns}	8,333 ^{ns}	833,333 [*]
Erro	8	50,000	16,667	19,250	100,000
Coefficiente de variação		7,78	61,24	41,79	33,33

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 8 - Análise de variância do experimento de microenxertia com meristemas de planta adulta sobre porta-enxertos germinados *in vitro* de *A. angustifolia*, com ou sem aplicação de BAP no ponto de enxertia ou no meio de cultura, para a porcentagem de sobrevivência após 30 dias da microenxertia.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios
		Sobrevivência dos microenxertos
	3	2266,667 ^{**}
Erro	8	100,000
Coefficiente de variação		33,33

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 9 - Análise de variância do experimento de aclimatização de autoenxertos de *A. angustifolia*, após 30 dias de pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização em casa-de-vegetação, com variação no período de nebulização intermitente, para a porcentagem de sobrevivência.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios
		Sobrevivência dos microenxertos
Fator A (pré-aclimatização)	2	833,333 ^{ns}
Fator B (período na nebulização intermitente)	1	33,333 ^{ns}
AB	2	300,000 ^{ns}
Erro	24	200,000
Coeficiente de variação		24,24

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 10 - Análise de variância do experimento com polinização controlada e aberta, em três matrizes de *A. angustifolia*, nas pinhas colhidas em 2005, para as variáveis: número total de pinhões (cheios + chochos) e porcentagem de pinhões cheios e chochos das pinhas.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Total de pinhões	Pinhões cheios	Pinhões chochos
Fator A (matriz)	2	6311,375 ^{**}	4302,042 ^{**}	4302,042 ^{**}
Fator B (tipo de polinização)	1	459,375 ^{ns}	1944,000 ^{**}	1944,000 ^{**}
AB	2	1594,125 ^{ns}	632,625 ^{**}	632,625 ^{**}
Erro	18	483,403	31,472	39,250
Coeficiente de variação		16,09	16,46	9,50

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Anexo 11 - Análise de variância do experimento com polinização controlada e aberta, com variação na quantidade de pólen aplicado, nas pinhas colhidas em 2005 e 2006, em *A. angustifolia*, para as variáveis: número total de pinhões e porcentagem de pinhões cheios e chochos das pinhas.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Total de pinhões	Pinhões cheios	Pinhões chochos
Fator A (ano)	1	12673,600 **	372,100 **	422,500 **
Fator B (quantidade de pólen aplicada)	3	2360,600 **	3282,600 **	3229,000 **
AB	3	251,000 ns	153,500 **	148,433 **
Erro	32	742,938	24,312	23,650
Coeficiente de variação		21,93	18,4	6,63

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ns não significativo.

Anexo 12 - Análise de variância do experimento com polinização controlada e aberta, em diferentes estádios de desenvolvimento do ginostrobilo, em duas matrizes de *A. angustifolia*, nas pinhas colhidas em 2005, para as variáveis: número total de pinhões e porcentagem de pinhões cheios e chochos.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Total de pinhões	Pinhões cheios	Pinhões chochos
Fator A (matriz)	1	5,633 ns	448,533 *	448,533 *
Fator B (estádio do ginostrobilo)	2	3777,633 **	7404,133 **	7404,133 **
AB	2	255,233 ns	693,333 **	693,333 **
Erro	24	537,567	43,250	43,250
Coeficiente de variação		16,49	18,54	10,19

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ns não significativo.

Anexo 13 - Análise de variância do experimento com polinização controlada e aberta, em diferentes estádios de desenvolvimento do ginostrobilo de *A. angustifolia*, nas pinhas colhidas em 2006, para as variáveis: número total de pinhões e porcentagem de pinhões cheios e chochos.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Total de pinhões	Pinhões cheios	Pinhões chochos
	4	973,325 ns	98,800 *	101,950 *
Erro	15	1065,633	310,000	306,533
Coeficiente de variação		30,77	69,87	23,38

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ns não significativo.

Anexo 14 - Análise de variância do experimento com polinização aberta e polinização controlada consecutiva (única, dupla e tripla), em duas matrizes de *A. angustifolia*, nas pinhas colhidas em 2007, para as variáveis: número total de pinhões e porcentagem de pinhões cheios e chochos.

Tratamentos	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Total de pinhões	Pinhões cheios	Pinhões chochos
Fator A (matriz)	1	2412,033 *	1526,533 **	1526,533 **
Fator B (polinizações consecutivas)	2	650,433 *	573,300 **	573,300 **
AB	2	1510,833 ^{ns}	27,033 ^{ns}	27,033 ^{ns}
Erro	24	189,367	34,233	34,233
Coefficiente de variação		11,81	38,49	6,90

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.