

CECÍLIA IRITANI

ASPECTOS MÚLTIPLOS DA CULTURA *In Vitro* DA
Araucaria angustifolia (BERT) O. KTZE.

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor do Curso de
Pós-Graduação em Engenharia Florestal,
Setor de Ciências Agrárias da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette.

CURITIBA

1997



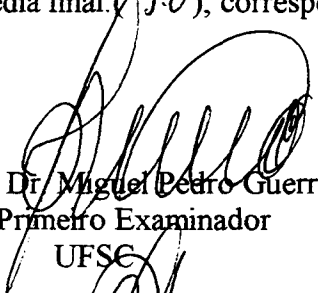
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA FLORESTAL

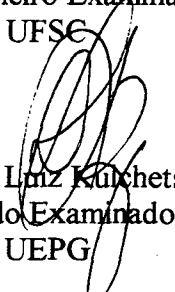
P A R E C E R


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO**, apresentada pela candidata **CECÍLIA IRITANI**, sob o título " **ASPECTOS MÚLTIPLOS DA CULTURA *In Vitro* da *Araucaria angustifolia* (BERT) O. Ktze**", para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Florestais, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Área de Concentração **SILVICULTURA**.

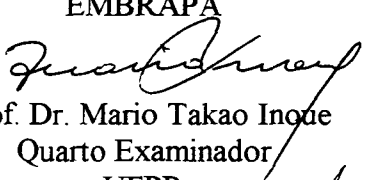
Após haver analisado o referido trabalho e argüido o Candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese, com média final: (*9,0*), correspondente ao conceito: (*A*).

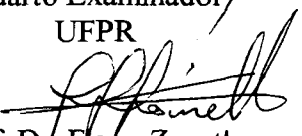
Curitiba, 14 de março de 1997


Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Primeiro Examinador
UFSC


Prof. Dr. Luiz Kulchetski
Segundo Examinador
UEPG


Pesq. Dra. Maria Elisa Cortezzi Graça
Terceira Examinadora
EMBRAPA


Prof. Dr. Mario Takao Inoue
Quarto Examinador
UFPR


Prof. Dr. Flavo Zanette
Orientador e Presidente da Banca
UFPR

AGRADECIMENTOS

À este Curso de Pós-Graduação pela oportunidade do aperfeiçoamento científico e tecnológico e progressão profissional.

Ao Professor Dr. Flávio Zanette pela orientação e compreensão demonstrada nos vários momentos difíceis durante o desenvolvimento da pesquisa, e pela oportunidade de iniciação e trabalho na área, desde 1986.

Aos Professores, Dr. Ronaldo Viana Soares e Dr. Mário Takao Inoue pela valiosa co-orientação e compreensão demonstradas quanto ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Dr. Sylvio Péllico Netto pela valiosa colaboração e atenção demonstrada quanto ao primeiro projeto desta pesquisa, como Secretário Executivo do Conselho Estadual de Ciência e Tecnologia (1987).

Aos Chefes do Departamento de Botânica, Professores Luiz Carlos Schmelpfeng e Mousinho Toniolo Coelho pelo atendimento às várias solicitações, e aos colegas que colaboraram através da redução dos meus encargos didáticos:- Professores Desanka Martinic Sá, Joana Pederneiras, Regina Rosa Fernandes, Maria Eliza Giacomazzi, Maria Regina T. Boerger, Sandro Menezes, Márcia Cristina Mendes Marques e Gedir de Oliveira.

À Professora Aracely Vidal Gomes pela orientação na utilização do fotomicroscópio do Departamento de Anatomia da Madeira, do Curso de Engenharia Florestal.

Ao Professor Dr. Yves Sbalqueiro pela orientação na utilização do fotomicroscópio do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas.

À empresa GIACOMET-MARODIN, INDÚSTRIA DE MADEIRAS, pelo apoio financeiro e fornecimento de material biológico, que permitiram o estabelecimento das bases desta pesquisa (1987-1990).

À equipe do Departamento de Pesquisa desta empresa, Engenheiros Osmar Kretschek e Amilcar José Costa, e funcionário Vilmar Brasil pela gentileza e pronto atendimento às solicitações de material biológico e ao funcionário Gilmar Lemes pela valiosa colaboração nas coletas locais, plantios e isolamentos, pelo período de 1990-1992.

Às estagiárias Solange Ribas de Paula, Jovita Cislinski e Luciene da Silva Soares Vicentini pelo auxílio no desenvolvimento inicial da pesquisa.

Ao funcionário do Setor de Ciências Agrárias, Joel Fernando Coradin, pela constância e compreensão demonstradas, além do auxílio prático inestimável prestado em todas as etapas de desenvolvimento desta pesquisa, pelo período de 1992 à 1996.

Aos vários proprietários rurais que nos cederam pinhas imaturas para o desenvolvimento de parte desta pesquisa.

À família do Sr. Alcemir Wolf, de General Carneiro, Paraná, pelo mesmo motivo.

Ao Professor Edilberto Possamai, pelo processamento estatístico e digitação computadorizada deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIACÕES	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT) O. KTZE.	4
3.1.1. Informações Gerais.	4
3.1.2. Características Morfológicas	6
3.1.3. Pragas e Doenças	7
3.1.4. Método Convencional de Propagação	7
3.1.5. Necessidade da Micropropagação	8
3.2. MICROPROPAGAÇÃO DAS ESPÉCIES FLORESTAIS	10
3.2.1. Tipos de Micropropagação	11
3.2.1.1. Cultivo de segmentos nodais e gemas apicais	11
3.2.1.2. Organogênese direta e indireta	13
3.2.1.3. Embriogênese somática	14
3.2.2. Explantes e Morfogênese	16
3.2.3. Estabelecimento dos Cultivos	25
3.2.3.1. Assepsia dos explantes e contaminação	26
3.2.3.2. Meios de cultura	30
3.2.3.3. Reguladores de crescimento	41
3.2.3.4. Problemas relativos aos Cultivos: - Vitriificação e Oxidação	51
3.2.3.5. Condições Ambientais de Cultivo	56
3.3. PERDA DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO	60
3.4. PARTICULARIDADES MORFOLÓGICAS DAS ESPÉCIES	64
3.5. MICROPROPAGAÇÃO DAS ARAUCARIACEAE	67
4. MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.1. PROCEDIMENTOS E CONDIÇÕES BÁSICAS	69
4.2. FONTE DE EXPLANTES E PORTA-ENXERTOS.	70
4.3. ASSEPSIA E ISOLAMENTO DOS EXPLANTES.	72
4.4. MEIOS DE CULTURA BÁSICOS.	74
4.5. REGULADORES DE CRESCIMENTO.	77

4.6.	PERÍODOS DE CULTIVO OU INCUBAÇÃO.	78
4.7.	REJUVENESCIMENTO.	78
4.8.	PARADA DE CRESCIMENTO DAS MUDAS.	80
4.9.	ARMAZENAMENTO DOS PINHÕES.	81
4.10.	DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS.	82
4.11.	ASPECTOS ANATÔMICOS.	83
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	86
5.1.	ESTABELECIMENTO DOS CULTIVOS.	86
5.1.1.	Assepsia dos Explantes.	86
5.1.2.	Meios Básicos.	93
5.1.3.	Reguladores do Crescimento e Multiplicação.	100
5.1.4.	Reguladores do Crescimento e Gemas Apicais.	114
5.1.5.	Reguladores de Crescimento e Brotos Dominados.	122
5.1.6.	Enraizamento dos Brotos Obtidos.	124
5.2.	CULTIVO DOS EMBRIÕES DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>	132
5.3.	ARMAZENAMENTO DE MUDAS.	139
5.4.	ARMAZENAMENTO DE PINHÕES.	140
5.5.	REJUVENESCIMENTO <i>IN VIVO</i>	142
5.6.	ASPECTOS ANATÔMICOS.	148
5.6.1.	Organização e Desenvolvimento dos Meristemas Axilares.	148
5.6.2.	Formação e Desenvolvimento das Raízes.	160
6.	CONCLUSÕES.	169
7.	BIBLIOGRAFIA.	174
	APÊNDICE.	191

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	COMPOSIÇÃO DE DIVERSOS MEIOS DE CULTURA BÁSICOS (VALORES EM MG/L).	32
TABELA 2.	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÍONS E DE N EM DIVERSOS MEIOS DE CULTURA BÁSICOS (EM MM).	33
TABELA 3.	COMPOSIÇÃO DO MEIO BÁSICO MCM, (MEIO PARA MORFOGÊNESE DE CONIFERAS)	76
TABELA 4.	DESCONTAMINAÇÃO E BROTAÇÃO CONFORME TIPOS E TAMANHO DOS EXPLANTES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE QUATRO MESES, PRÉ-TRATADAS POR IMERSÃO (DUAS HS) EM SOLUÇÃO DE BENLATE 2 G/L E CULTIVADOS EM MS/2 (TRÊS MESES DE CULTIVO).	87
TABELA 5.	INFLUÊNCIA DE CINCO FUNGICIDAS NA DESCONTAMINAÇÃO DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS (1 E 2) DE PONTEIROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE QUATRO ANOS DE IDADE. * 1 - PRÉ-TRATAMENTO POR IMERSÃO, DUAS HORAS; ** PRÉ-TRATAMENTO + TRATAMENTO POR ISOLAMENTO POR CINCO MINUTOS.	90
TABELA 6.	INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS CONFORME O MEIO MS, NO NÚMERO DOS BROTOS FORMADOS EM EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE.	93
TABELA 7.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE BROTOS OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE, CONFORME OS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS.	94
TABELA 8.	INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS NO CRESCIMENTO (ALTURA EM CM) DOS BROTOS FORMADOS EM EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE.	95
TABELA 9.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTOS AXILARES ORTOTRÓPICOS DA <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> , FORMADOS EM SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADOS CONFORME OS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS.	95

TABELA 10.	NÚMERO MÉDIO DE BROTO DOS EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE QUATRO MESES DE IDADE, CONFORME POSIÇÃO NO CAULE E PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO MS/2.	97
TABELA 11.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS NÚMEROS DE BROTO OBTIDOS DOS EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE QUATRO MESES DE IDADE CONFORME A PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO MS/2.	98
TABELA 12.	INFLUÊNCIA DAS CITOCININAS BA, KIN E Z, (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO ÍNDICE DE BROTAÇÃO DOS EXPLANTES SUBAPICAIS E MEDIANOS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE. (28 EXPLANTES/TRATAMENTO).	101
TABELA 13.	EFEITO DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS PELOS EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	102
TABELA 14.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIOS MS/2 E MCM COM CARVÃO ATIVADO, 5 G/L, CITOCININAS (0,08 MG/L).	103
TABELA 15.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DA <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIO MCM COM AS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L).	104
TABELA 16.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIO MS/2 COM AS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L).	105
TABELA 17.	EFEITO DOS MEIOS MS/2 E MCM, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO NÚMERO E CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS EM SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE. (8 EXPLANTES/TRATAMENTO).	106

TABELA 18.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE BROTO FORMADOS EM SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIOS MS/2 E MCM, COM AS CITOCININAS BA, KIN E Z E CARVÃO ATIVADO 5 G/L.	107
TABELA 19.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE BROTO FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DAS MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIO MCM, COM CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L).	108
TABELA 20.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTO OBTIDOS DE SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADOS EM MEIO MCM COM 0,24 MG/L DE BA, KIN E Z E CARVÃO ATIVADO 5 G/L.	110
TABELA 21.	SOBREVIVÊNCIA (S) E ALONGAMENTO (A) DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS - TRÊS MESES EM MS/2, SEM E COM CARVÃO ATIVADO (10 G/L), GA ₃ (2 MG/L), BA (0,1 E 0,2 MG/L), AIB (3 E 6 MG/L). 20 EXPLANTES/TRATAMENTO. ALTURA EM CM.	114
TABELA 22.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE SOBREVIVÊNCIA DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE DOIS-TRÊS MESES DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> , CULTIVADAS EM MS/2, COM E SEM CARVÃO ATIVADO (10 G/L), GA ₃ (2 MG/L), BA (0,1 E 0,2 MG/L) E AIB (3 E 6 MG/L) (EFEITOS DE A E B).	115
TABELA 23.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MÊSES DE IDADE, CULTIVADAS EM MS/2, COM E SEM CARVÃO ATIVADO (10 G/L), GA ₃ (2 MG/L), BA (0,1 E 0,2 MG/L) E AIB (3 E 6 MG/L). (EFEITOS DE A E B).	117
TABELA 24.	INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA BÁSICO (MS/2 E MCM), ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE. (25 EXPLANTES/TRATAMENTO; ALTURA EM CM).	118
TABELA 25.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE NO MEIOS MS/2 E MCM, COM CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E GA ₃ (2 MG/L).	119
TABELA 26.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES EM MEIO MS/2, COM CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E GA ₃ (2 MG/L).	119

TABELA 27.	EFEITOS DO CARVÃO ATIVADO (10 G/L) E DO ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) EM MEIO MS/2 NO CRESCIMENTO DOS BROTOS DOMINADOS DOS SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE. (ALT. EM CM; DADOS TRANSFORMADOS POR RAÍZ QUADRADA DE $Y+0,5$).	122
TABELA 28.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DOS BROTOS DOMINADOS FORMADOS POR SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADOS EM MEIO MS/2, COM CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E GA ₃ (2 MG/L).	123
TABELA 29.	ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS BROTOS AXILARES DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS CONTÍNUOS COM AIB (1 E 2 MG/L). PERÍODOS DE ENRAIZAMENTO = 45 DIAS. R = 45 BROTOS/TRATAMENTO (270).	125
TABELA 30.	ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS BROTOS AXILARES DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS INDUTIVOS COM AIB (MG/L). MEIO DE ENRAIZAMENTO (MS/2). PERÍODO DE ENRAIZAMENTO = 45 DIAS. R = 30 BROTOS/TRATAMENTO (450).	125
TABELA 31.	ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS BROTOS AXILARES DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS INDUTIVOS COM AIB (6 E 12 MG/L). MEIO DE ENRAIZAMENTO (MS/2 E MS/4). PERÍODO DE ENRAIZAMENTO = 45 DIAS. R = 15 BROTOS/TRATAMENTO (120).	126
TABELA 32.	ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE BROTOS AXILARES DE 3 TIPOS DE EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS INDUTIVOS: 6 E 12 MG/L AIB; 6 E 12 DIAS. MEIOS DE ENRAIZAMENTO MS/2 E MS/4, 2 FASES COM VERMICULITA. R = 15 BROTOS/TRAT. (TOTAL 840).	127
TABELA 33.	EFEITO DO MEIO MS E DIFERENTES TIPOS DE TRATAMENTOS NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> . 40 DIAS DE CULTIVO.	133
TABELA 34.	EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS COM BENZILAMINOPURINA 9 E 18 MG/L, NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> . 40 DIAS DE CULTIVO. R = 24 EMBRIÕES/TRATAMENTO (144). MEIO DE CULTURA = MS/2.	134

TABELA 35.	EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS COM BENZILAMINOPURINA 9 E 18 MG/L, NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> . 40 DIAS DE CULTIVO. R = 24 EMBRIÕES/TRATAMENTO (144). MEIO DE CULTURA = MS/2. . . .	134
TABELA 36.	EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS, BA (60 MG/L), 1,30 HORAS E 3 HORAS NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> , CULTIVADOS EM DIVERSOS TIPOS DE MEIOS BÁSICOS. 40 DIAS DE CULTIVO. R = 12 EMBRIÕES/TRATAMENTO. (360).	135
TABELA 37.	EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS, BA (120 MG/L) E 10 G/L DE CARVÃO ATIVADO (CA) NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> , CULTIVADOS EM DIVERSOS TIPOS DE MEIOS BÁSICOS. 40 DIAS DE CULTIVO. R = 12 EMBRIÕES/TRATAMENTO. (360).	136
TABELA 38.	CRESCIMENTO MÉDIO (95 E 185 DIAS) DAS MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE, ARMAZENADAS A 4 °C, COM ALTURAS INICIAIS DE 8,9 E 6,2 CM, COMPARADAS AO CONTROLE (9,1 CM. R = 88 MUDAS/TRAT.)	139
TABELA 39.	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DAS MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE ARMAZENADAS A 4 °C (95 E 185 DIAS).	140
TABELA 40.	GERMINAÇÃO DOS PINHÕES ARMAZENADOS EM FREEZER, - 2 °C, APÓS 4,5 E 5,5 MESES. ARMAZENAMENTO INICIADO EM 26.06.95. TOTAL SEMENTES/TRATAMENTO = 1.122.	141
TABELA 41.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS, NO NÚMERO DE BROTO FORMADOS PELOS EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.	192
TABELA 42.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS, NO CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS EM EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.	192
TABELA 43.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE BROTAÇÃO DOS EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE QUATRO MESES DE IDADE, CONFORME POSIÇÃO NO CAULE E PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO MS/2.	192

TABELA 44.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, CARVÃO ATIVADO 5 G/L NO ÍNDICE DE BROTAÇÃO DE DOIS TIPOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	193
TABELA 45.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	193
TABELA 46.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DO MEIO MCM, DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	194
TABELA 47.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO MEIO MS/2, CITOCININAS BA, Z E KIN (0,08 MG/L) E CARVÃO ATIVADO 5 G/L, NO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	194
TABELA 48.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DOS MEIOS MS/2 E MCM, DAS CITOCININAS (0,24 MG/L) BA, KIN E Z, CARVÃO ATIVADO (5 G/L), NO NÚMERO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	195
TABELA 49.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO MEIO MS/2, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NA FORMAÇÃO DE BROTOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	195
TABELA 50.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO MEIO MCM, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO NÚMERO DE BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	196
TABELA 51.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DOS MEIOS MS/2 E MCM, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24, MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	196
TABELA 52.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MEIO MS/2, DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DE BROTOS FORMADOS EM SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	197

TABELA 53.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DO MEIO MCM, DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	197
TABELA 54.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA SOBREVIVÊNCIA DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, EM MS/2, SEM E COM CARVÃO ATIVADO (10 G/L), GA ₃ (2 MG/L), BA (0,1 E 0,2 MG/L), AIB (3 E 6 MG/L).	198
TABELA 55.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, EM MS/2, SEM E COM CARVÃO ATIVADO (10 MG/L); GA ₃ 2 MG/L; BA 0,1 E 0,2 MG/L; AIB 3 E 6 MG/L.	198
TABELA 56.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DOS MEIOS BÁSICOS MS/2 E MCM, CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) NO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE. (ALTURA EM CM).	198
TABELA 57.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DO MEIO MCM, DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) NO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	199
TABELA 58.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DO MEIO MS/2, CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) NO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE TRÊS MESES DE IDADE.	199
TABELA 59.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DO CARVÃO ATIVADO (10G/L) E DO ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) EM MS/2 NO CRESCIMENTO DOS BROTOS DOMINADOS DOS SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.	199
TABELA 60.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) EM MEIO MS/2 COM CARVÃO ATIVADO (10 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS DOMINADOS DOS SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.	199
TABELA 61.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA TEMPERATURA (4 °C) NO CRESCIMENTO DAS MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.	200
TABELA 62.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO ARMAZENAMENTO, POR 4,5 E 5,5 MESES A -2 °C, NO ÍNDICE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DUAS PROCEDÊNCIAS.	200

TABELA 63.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA PROCEDÊNCIA, NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> SUBMETIDAS AO ARMAZENAMENTO A -2 °C, POR 4,5 E 5,5 MESES.	200
------------	--	-----

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. SEGMENTO CAULINAR DE UMA MUDA DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS 2 MESES DE IDADE, CULTIVADO EM MS/2 AOS 90 DIAS, COM UM BROTO DOMINANTE E DOIS DOMINADOS. 113
- FIGURA 2. GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADAS EM MS/2 + 10 G/L DE CARVÃO ATIVADO. 60 DIAS DE CULTIVO. 120
- FIGURA 3. GEMAS APICAIS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, COM BROTOS AXILARES, DEVIDO À DESTRUÇÃO DO MERISTEMA APICAL. 90 DIAS DE CULTIVO. 120
- FIGURA 4. BROTOS AXILARES DOMINANTES, OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, EM MEIO MS/2, APÓS TRATAMENTO INDUTIVO COM AIB, 6 MG/L, 12 DIAS. NOTE FORMAÇÃO EXCESSIVA DE CALO. 129
- FIGURA 5. BROTOS AXILARES DOMINANTES, OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADES, EM MEIO MS/2, EM DUAS FASES (A SUPERIOR COM VERMICULITA), PARA ENRAIZAMENTO APÓS TRATAMENTO INDUTIVO COM AIB, 12 MG/L, 6 DIAS. NOTE AUSÊNCIA DE CALO EXCESSIVO. 129
- FIGURA 6. BROTOS AXILARES DOMINANTES OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, ENRAIZADOS EM MEIO MS/2, EM DUAS FASES (A SUPERIOR COM ALGODÃO PICADO), APÓS TRATAMENTO INDUTIVO, 6 MG/L AIB, 12 DIAS. NOTE AUSÊNCIA DE CALO EXCESSIVO. . . . 130
- FIGURA 7. BROTOS AXILARES DOMINANTES OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, ENRAIZADOS EM MEIO MS/2, EM DUAS FASES (A SUPERIOR COM ALGODÃO PICADO), APÓS TRATAMENTO INDUTIVO, 6 MG/L AIB, 12 DIAS. NOTE AUSÊNCIA DE CALO EXCESSIVO. . . . 130
- FIGURA 8. BROTOS DOMINANTES OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, ENRAIZADOS APÓS TRATAMENTO INDUTIVO, UM ANO APÓS ENRAIZAMENTO. 131
- FIGURA 9. PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE. 131

FIGURA 10.	PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE, UM ANO APÓS O TRANSPLANTE.	132
FIGURA 11.	BROTOS OBTIDOS POR MULTIPLICAÇÃO DO MERISTEMA APICAL DE EMBRIÕES MADUROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> . TRATAMENTO: BAP 18 MG/L, TRATAMENTO INDUTIVO, DUAS HORAS.	137
FIGURA 12.	BROTOS OBTIDOS POR MULTIPLICAÇÃO DO MERISTEMA APICAL DE EMBRIÕES MADUROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> . TRATAMENTO: BAP 18 MG/L, TRATAMENTO INDUTIVO, DUAS HORAS. BROTO DUPLICADO.	137
FIGURA 13.	BROTO DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> ORIGINADO PELO MERISTEMA APICAL DE EMBRIÃO MADURO, MOSTRANDO DESENVOLVIMENTO DE BROTOS AXILARES NA BASE PELA QUEBRA DA DOMINÂNCIA APICAL. TRATAMENTO INDUTIVO COM BAP 60 MG/L, UMA HORA E TRINTA MINUTOS.	138
FIGURA 14.	PONTEIROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE 20 ANOS. (QUEDAS DO IGUAÇÚ - PR. GIACOMET-MARODIM INDÚSTRIA DE MADEIRAS S.A.).	144
FIGURA 15.	GEMAS APICAIS DOS PONTEIROS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE 16 ANOS, 40 DIAS APÓS O ENXERTO EM MUDAS DE UM-DOIS MESES DE IDADE.	145
FIGURA 16.	COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DAS GEMAS APICAIS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE 16 ANOS, ENXERTADAS CONFORME A IDADE DA MUDA E POSIÇÃO DO ENXERTO. ESQUERDA: ENXERTO FEITO NA REGIÃO SUBAPICAL DE MUDA DE QUATRO MESES. DIREITA: ENXERTO EFETUADO NA REGIÃO BASAL DE MUDA DE UM MÊS. 60 DIAS APÓS O ENXERTO.	145
FIGURA 17.	GEMAS APICAIS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE 20 ANOS, NO 1º REENXERTO. NOTE APARÊNCIA PARCIALMENTE REJUVENESCIDA EM RELAÇÃO ÀS DAS FOTOS 14 E 16. 30 DIAS APÓS REENXERTO. .	146
FIGURA 18.	GEMAS APICAIS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE QUATRO ANOS REENXERTADAS EM MUDAS DE UM MÊS. 30 DIAS APÓS REENXERTO.	146
FIGURA 19.	À ESQUERDA, REENXERTO DE INDIVÍDUOS DE QUATRO ANOS; À DIREITA:- REENXERTO DE INDIVÍDUOS DE 20 ANOS (DIREITA DA FOTO 18).	147

FIGURA 20.	BROTOS AXILARES OBTIDOS <i>IN VITRO</i> DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DE DOIS MESES DE IDADE, NÃO ENRAIZADOS E ENXERTADOS EM MUDAS DE UM MÊS. 40 DIAS.	147
FIGURA 21.	MERISTEMA ORTOTRÓPICO DE SEGMENTO CAULINAR DE MUDA DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> . SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 100X. GM - GRUPO MERISTEMÁTICO; CP - CÉLULAS PARENQUIMÁTICAS; PA - PARENQUIMA CORTICAL.	150
FIGURA 22.	SEGMENTO CAULINAR DE MUDAS DE <i>ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA</i> , APÓS 45 DIAS DE CULTIVO. SG - SEGMENTO; C - CALO FRIÁVEL; BD - BROTO AXILAR DOMINANTE; Bd - BROTO AXILAR DOMINADO.	152
FIGURA 23.	MERISTEMA AXILAR DE UM SEGMENTO DE MUDA DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> , EM FASE POUCO MAIS AVANÇADA DE DESENVOLVIMENTO. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 100X. PT - PROTODERME. CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS. PA - PARENQUIMA CORTICAL.	153
FIGURA 24.	FASE MAIS AVANÇADA NA ORGANIZAÇÃO DO MERISTEMA AXILAR. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 100X. PT - PROTODERME; CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS; PA - PARÊNQUIMA CORTICAL.	153
FIGURA 25.	MERISTEMA AXILAR JÁ QUASE TOTALMENTE ORGANIZADO EM MERISTEMA APICAL DE GEMA E BROTO AXILAR. PT - TU - TÚNICA; CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS; RP - REGIÃO PERIFÉRICA DO CORPUS; RC - REGIÃO CENTRAL DO CORPUS. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 400X.	154
FIGURA 26.	GEMA PARCIALMENTE ORGANIZADA. MA - MERISTEMA APICAL; PM - PRIMÓRDIO FOLIAR. PCB - PROCÂMBIO; PA - PARÊNQUIMA CORTICAL. TQ - TRAQUEÓIDES. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 160X.	154
FIGURA 27.	MERISTEMA APICAL COM PRIMÓRDIOS FOLIARES. TU - TÚNICA; RP - REGIÃO PERIFÉRICA DO CORPUS; RC - REGIÃO CENTRAL DO CORPUS; PCB - PROCÂMBIO; PM - PRIMÓRDIO FOLIAR. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 160X.	155
FIGURA 28.	FOTOMACROGRAFIA DE GEMA AXILAR - 10º DIA DE CULTIVO. PA - PARÊNQUIMA CORTICAL. PCB - PROCÂMBIO. 60X.	155
FIGURA 29.	DETALHE, MOSTRANDO PROCÂMBIO E TRAQUEÓIDES DIFERENCIADOS. TU - TÚNICA; PCB - PROCÂMBIO; PA - PARÊNQUIMA CORTICAL. 400X.	156

- FIGURA 30. DETALHE DE GEMA COM PRIMÓRDIOS FOLIARES EM ESTÁGIOS INICIAIS DE FORMAÇÃO E ZONEAMENTO HISTOLÓGICO EVIDENTE. TU - TÚNICA; CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS; RP E RC - REGIÕES PERIFÉRICA E CENTRAL DO MESMO. 200X. 159
- FIGURA 31. GEMA PRESTES A IRROMPER PELO CÓRTEX, AOS 15-16º DIA DE CULTIVO DO SEGMENTO. INÍCIO DA FASE DE ALONGAMENTO QUE PRECEDE A FORMAÇÃO DO BROTO. 400X. 159
- FIGURA 32. BROTOS AXILARES DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA* DE 30 - 60 DIAS, APÓS 30 - 35 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS/2, COM 1 - 2 MG DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO, DOIS DELES ENRAIZADOS E, DOIS COM CALOS MUITO VOLUMOSOS. 161
- FIGURA 33. BROTO AXILAR DE SEGMENTO CAULINAR DE MUDA DE *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA* DE 30-60 DIAS, COM TRÊS RAÍZES BEM DESENVOLVIDAS, APÓS 50 DIAS DE CULTIVO E PRESTES A SER TRANSPLANTADO PARA O SOLO. NOTE CALO VOLUMOSO. 162
- FIGURA 34. CORTE TRANSVERSAL DA BASE DE BROTO AXILAR CULTIVADO EM MEIO DE ENRAIZAMENTO, TRÊS DIAS DE CULTIVO. FOTOMACROGRAFIA, 60X. SVB - SISTEMA VASCULAR DO BROTO; TQ-NINHO DE TRAQUEÓIDES; PE-PERIDERME; CF-CALO FRIÁVEL; PA-PARENQUIMA CALOSO. 164
- FIGURA 35. DETALHE DE NINHO DE TRAQUEÓIDES. CORTE TRANSVERSAL, 400X. TQ-TRAQUEÓIDES; CC-CÂMBIO DO NINHO DE TRAQUEÓIDES; PA-PARÊNQUIMA CALOSO. 164
- FIGURA 36. CORTE TRANSVESAL DE CALO DE BROTO AXILAR CULTIVADO EM MEIO DE ENRAIZAMENTO, APÓS 32 DIAS DE CULTIVO. PR - PRIMÓRDIO DE RAÍZ; PA - PARÊNQUIMA CALOSO; TQ - NINHO DE TRAQUEÓIDES. SECÇÃO TRANSVERSAL, 400X. 165
- FIGURA 37. SECÇÃO TRANSVERSAL DE CALO DE ESTACA DE RAMO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO ANOS. PR -PRIMÓRDIO RADICIAL; PA - PARÊNQUIMA CALOSO; TQ - NINHO DE TRAQUEÓIDES. NOTE TEXTURA FIRME DO PARÊNQUIMA CALOSO. 60X. 167
- FIGURA 38. SECÇÃO TRANSVERSAL DE CALO DE ESTACA DE RAMO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO ANOS, COM O PRIMÓRDIO DE RAIZ EM INÍCIO DE ALONGAMENTO E NÍTIDA ORIGEM A PARTIR DO CÂMBIO QUE ENVOLVE UM NINHO DE TRAQUEÓIDES. 60X. 167

FIGURA 39. SECÇÃO TRANSVERSAL DE CALO DE ESTACA DE RAMO DE
ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA DE QUATRO ANOS, COM O PRIMÓRDIO DE
RAIZ EM FASE DE ALONGAMENTO E ZONEAMENTO HISTOLÓGICO.
60X. 168

LISTA DAS ABREVIACOES

DAP	=	diâmetro à altura do peito.
MS	=	meio de Murashigue e Skoog.
MS/2	=	meio de Murashigue e Skoog com a concentração dos nutrientes minerais reduzida à metade.
MCM	=	meio para a morfogênese em conífera.
LP	=	meio de Leproive e Quoirin.
AIA	=	ácido indol-3-acético.
AIB	=	ácido indol-3-butírico.
ANA	=	ácido 2-naftalenoacético.
2,4-D	=	ácido 2-4-diclorofenoxiacético.
GA ₃	=	ácido giberélico.
BA	=	6-benzilaminopurina.
Kin	=	cinetina, 6-furfurilaminopurina.
Z	=	zeatina.
TDZ	=	Thidiazuron.
2ip	=	isopenteniladenina.
$\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	=	micro Einstein por metro quadrado por segundo.
nm	=	nanômetro.
MSE	=	massa suspensor embrionária.

RESUMO

Visando o desenvolvimento de um protocolo para a regeneração dos genótipos superiores da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze, procurou-se verificar os aspectos básicos envolvidos e o comportamento da espécie quanto à micropropagação, através do cultivo dos segmentos caulinares de mudas de 30 a 60 dias, com a obtenção de brotos axilares ortotrópicos. Dos oito a 10 meristemas axilares presentes nestes segmentos, em cultivos no meio MS/2, desenvolveram-se em média dois a três brotos, dos quais, um a dois dominantes. Das citocininas utilizadas para a obtenção de maior número de brotos, verificou-se que a espécie é sensível à zeatina mas em combinação com o meio MCM. As gemas apicais e os brotos dominados somente cresceram no meio básico MS/2, com o acréscimo de carvão ativado (5g, 10g ou 20 g/l), e ácido giberélico (2 mg/l). O enraizamento (60% a 80%) dos brotos dominantes, foi obtido mediante o tratamento indutivo prévio por seis ou 12 dias, com o ácido indol-3-butírico (6 e 12 mg/l) em meio básico simples, contendo somente 30 g/l de sacarose e 6 g/l de ágar. A emergência e o desenvolvimento das raízes ocorreram nos meios MS/2 ou MS/4, com duas fases: uma superior com vermiculita e 4,5 g/l de ágar, na qual foram inseridas as bases dos brotos, e a inferior com 6 g/l de ágar, sem vermiculita. Embriões maduros da espécie não mostraram competência para a organogênese, face aos tratamentos testados, mas mostraram que é possível a multiplicação do meristema apical, por meio de tratamentos citocinínicos indutivos com altas concentrações e curto prazo (duas-três horas). Para se contornar a limitação da pesquisa a três-quatro meses por ano, imposta pela periodicidade da frutificação, foram testados, com sucesso, dois tipos de armazenamento a frio: o dos pinhões, a -2°C, com 80% de germinação após seis meses; das mudas de 30 a 60 dias, a 4°C, com inibição total do crescimento; também por seis meses. Verificou-se ser viável o rejuvenescimento *ex vitro* dos indivíduos adultos da espécie, mediante enxertias sucessivas em mudas de 4-6 cm de altura, e em condições ambientais controladas (17 °C ± 2 °C, 60 a 90% de umidade relativa). Os estudos anatômicos mostraram que a Araucária tem grande poder de regeneração, pela rapidez (15 dias) da organização dos meristemas axilares em brotos; capacidade de desdiferenciação das células parenquimáticas do córtex, para a formação do tecido pró-vascular para a conexão dos brotos e segmento caulinar de origem e formação das raízes a partir de células pró-vasculares do calo basal dos brotos. As raízes formadas provaram ser funcionais pela boa sobrevivência das mudas obtidas e transplantadas para o solo. O desenvolvimento do protocolo da multiplicação da espécie via microestacas de mudas é possível, havendo no entanto a necessidade de se ampliar os estudos relativos à obtenção de brotos múltiplos a partir dos meristemas axilares do caule.

ABSTRACT

The aspects involved on *in vitro* multiplication of selected genotypes of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze were the principal aim of this research. The results and the steps for working throughout the year were presented. Single orthotropic shoots could be obtained only in a small number, 2 to 3 per stem segment cultivated on MS/2. There were no responses to cytokinins treatments, except zeatin in MCM basal medium. However, apical stem meristem of *Araucaria* mature embryos showed that the possibility of forming multiple buds exist, despite of the low rates obtained with cytokinins in pulse treatments. Adventitious bud formation did not occurred on cotyledons and hypocotils of these treated embryos. Dominant axillary shoots rooted at 60% to 80% rates, with 6mg or 12 mg/l of indole-butynic acid in a 6 or 12 days pulse treatments for root induction, and two phases MS/2 or MS/4 - vermiculite basal medium, for roots emergence and development. Transplanted to soil, *Araucaria*'s plantlets were sucessful. Dominated axillary shoots and seedlings apical shoots elongated to 4-8 cm, within 60 to 90 days in MS/2, plus 5g, 10g or 20 g/l of activated charcoal and 2 mg/l of giberellic acid. *Ex vitro* rejuvenation of *Araucaria* was outlined, and may be possible through serial graftings, under controlled conditions of temperature ($17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) and 60% to 90% of relative umidity. Storage of seeds and inhibition on seedlings development were obtained in refrigerators at $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectively. To establish a protocol for *Araucaria in vitro* multiplication through orthotropic axillary branching, depends only on the multiple buds formation which need to be studied in details, possibly through zeatin treatments. Anatomical studies revealed that *Araucaria* has a high regenerative potential because of the short period (15 days), necessary for the organization of axillary residual meristems to forming shoots, and the differentiation of cortex cells originating provascular tissue for connecting the formed shoots to seedlings explant. Roots were formed from provascular tissue of basal callus, developing into normal ones, proved through the good performance of transplanted plantlets.

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação das espécies florestais é um vasto campo de pesquisa que se encontra em franco desenvolvimento. É mais difícil quando comparada à das plantas herbáceas e arbustivas de ciclo vital mais curto. Estas dificuldades variam muito conforme as espécies, sendo, em geral, menores nas de rápido crescimento.

De maneira geral, as coníferas, comparadas às Dicotiledôneas arbóreas, são mais difíceis de serem micropropagadas, mesmo através do cultivo de segmentos caulinares, o menos complexo dos métodos de multiplicação *in vitro* e que oferece maiores garantias da fidelidade genética e fenotípica dos indivíduos obtidos.

As espécies do gênero *Araucária* foram pouco estudadas quanto a este aspecto, mas as pesquisas realizadas até o momento, as indicam como recalcitrantes quanto à micropropagação. As dificuldades decorrem de particularidades fisiológicas e morfológicas inerentes.

As fisiológicas estão relacionadas com as dificuldades para se obter maior número de brotos axilares (devido a fortes correlações de dominância) e para se enraizar os brotos obtidos. As morfológicas estão relacionadas ao plagiotropismo dos ramos, que diminui a disponibilidade de explantes utilizáveis e à presença, no caule, de meristemas axilares residuais em vez de gemas plenamente formadas.

A proximidade muito estreita entre estes meristemas residuais e a necessidade prévia da organização dos mesmos em gemas, para o posterior alongamento, tornam mais difíceis as respostas aos estímulos citocinínicos dados para a quebra das correlações de dominância e a formação de brotos múltiplos.

Esta pesquisa abrange, em maior amplitude, o estudo básico dos aspectos e necessidades envolvidos na micropropagação da *Araucaria angustifolia*, através do cultivo *in vitro* de segmentos caulinares de mudas de dois - três meses, para o estabelecimento do protocolo de multiplicação de genótipos superiores da espécie.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi estabelecer o protocolo de multiplicação dos genótipos superiores de *Araucária angustifolia* (BERT) O. Ktze. Para se alcançar este objetivo, foi necessário:

- a. Estabelecer o cultivo *in vitro* dos segmentos caulinares de mudas de dois a três meses, verificando métodos de assepsia, isolamento e meios de cultura adequados à sobrevivência e respostas aos tratamentos a serem dados em etapas posteriores.
- b. Determinar as exigências da espécie, para se obter maior número de brotos axilares e crescimento dos mesmos.

- c. Estudar os aspectos anatômicos envolvidos na organização e desenvolvimento dos brotos axilares.
- d. Estabelecer as exigências e a metodologia mais adequada para se obter maior índice de enraizamento dos brotos obtidos e os aspectos anatômicos envolvidos no processo.
- e. Estabelecer métodos para contornar a periodicidade da produção de sementes, que limita a disponibilidade de mudas da mesma idade a três meses por ano.
- f. Determinar as exigências para o rejuvenescimento de indivíduos adultos pelo efeito cascata, através de enxertias *in vitro*.
- g. Estudar os aspectos iniciais envolvidos no estabelecimento do cultivo *in vitro* de explantes caulinares de indivíduos de maior idade.
- h. Determinar a competência da espécie para a micropropagação, através do cultivo de embriões maduros, visando principalmente o comportamento do meristema apical.

3. REVISÃO DE LITERATURA

No desenvolvimento da metodologia para multiplicação dos genótipos superiores de uma essência florestal, são fundamentais as particularidades morfológicas, modo de desenvolvimento, habitat, aspectos fisiológicos, e genotípicos inerentes à espécie; e os aspectos básicos da micropropagação: escolha dos tipos de explantes, métodos de assepsia dos mesmos; meios de cultura, reguladores do crescimento e condições de cultivo adequados a cada fase ou tipo de micropropagação, além do manuseio das plântulas obtidas, na adaptação às condições *ex vitro*.

3.1. *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE.

3.1.1. Informações Gerais.

Conhecida, popularmente, como pinheiro brasileiro, pinheiro do Paraná ou araucária, esta é a essência florestal de maior expressão econômica da região Sul do país.

Ocorre com maior intensidade nos estados de Santa Catarina, Paraná e

Rio Grande do Sul e na região das Missões na Argentina; esparsamente, pode ser encontrada nas regiões elevadas de São Paulo e sul de Minas Gerais (CARVALHO, 1994).

A araucária desenvolve-se melhor em solos profundos e férteis, em regiões com precipitações bem distribuídas, 1.250 a 2.450 mm/ano e temperaturas suaves, com a média anual de 10°C - 18°C (MONTEIRO e SPELTZ, 1980).

Nas matas do planalto, está, frequentemente, associada à imbuia (*Ocotea porosa* (Nees e Mart.)), erva-mate (*Ilex paraguariensis* Sr. Hilaire), e ao cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). É uma espécie característica e exclusiva da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), nas formações Aluvial (Galeria), Sub-Montana, Montana e Alto-Montana, sendo encontrados cinco a 25 exemplares por hectare (KLEIN, 1960).

Sua importância econômica decorreu do fornecimento de madeira de alta qualidade para construções em geral, caixotaria, móveis e laminados, e vários outros usos:- tábuas para forro, ripas, caibros, palitos para fósforos, carpintaria comum, marcenaria, tanoaria, molduras, guarnições e compensados. Produz celulose de fibra longa, que permite a obtenção de papel de excelente qualidade. O teor de celulose é de 58,3% e o da lignina, 28,5% (CARVALHO, 1994).

Suas sementes ricas em amido, são ainda fonte de proteínas, servindo para a alimentação humana, animais domésticos e para a fauna silvestre (CARVALHO, 1994).

3.1.2. Características Morfológicas

Quando jovem a árvore tem a forma cônica, assim permanecendo até os 12 - 15 anos quando se inicia a floração e frutificação. Na fase adulta, toma a forma de taça.

O tronco dos indivíduos adultos é retilíneo e indiviso, dimensões médias de 10 a 35 m de altura e 50 a 120 cm de DAP, podendo alcançar 50 m e 250 cm, respectivamente.

A casca é espessa (2 a 15 cm), de aspecto esponjoso; o cilindro central é formado por anéis grossos e deprimidos com muita resina (CARVALHO, 1994).

Segundo JOLY (1973), é uma espécie dióica, com folhas de distribuição alterno-espiralada, oval lanceoladas de ápices agudos, côncavas, com nervuras indistintas, salvo a central.

As inflorescências, cones ou estróbilos masculinos se formam em ramos bianuais; são cilíndricos, média de 8 cm a 17 cm x 1,5 cm a 3 cm, com muitas escamas seminíferas ou microsporófilos, em cujas faces ventrais se encontram 8 microsporângios ou sacos polínicos. A polinização é anemófila.

Os cones ou estróbilos femininos são elipsóides ou ovóides, 7 cm - 8 cm x 5 cm - 6 cm, se formam em ramos curtos, e são compostos por inúmeras escamas ovulíferas ou megasporófilos dispostos helicoidalmente sobre um eixo central. Cada megasporófilo fértil tem em sua face ventral um óvulo anátropo.

A floração ocorre em abril - maio e após a fecundação, os cones femininos crescem atingindo cerca de 20 cm a 25 cm de diâmetro. Quando completamente desenvolvidas, são comumente chamadas de pinhas, e as sementes, pinhões.

Cada pinha fornece 40 - 100 pinhões de dimensões variando de 4 cm a 7 cm x 1,5 cm - 2 cm. Cada semente é formada pelos envoltórios lignificados e pela amendoa ou endosperma primário amiláceo que envolve o embrião de 2,5 cm - 3 cm de comprimento, formado por dois cotilédones alongados, entre os quais se encontra o ápice caulinar, um curto hipocótilo, e a radícula (JOLY, 1973).

3.1.3. Pragas e Doenças

Na fase muito jovem é particularmente sensível aos fungos dos gêneros *Fusarium* (podridão das raízes) e *Rhizoctonia* (tombamento); cupins e formigas podem acarretar sérios problemas locais (VITÉ, 1980).

Entre os insetos daninhos, MACEDO (1980), cita as lagartas de *Dirphia araucariae*, que em grande número, podem devorar todas as folhas das árvores, afetando o incremento em diâmetro e dando aos povoamentos aspecto desolador.

A produção das sementes pode ser afetada pela broca (*Laspeyresia araucariae* Pastrana, da ordem Lepidóptera) que se alimenta do endosperma e do embrião. Esta lagarta pode atacar também as gemas apicais, formando galhas volumosas (MONTEIRO *et al*, 1980b).

3.1.4. Método Convencional de Propagação

Sua propagação é feita pela semeadura das sementes direta no campo (SPELTZ *et al*, 1980; MALINOVSKI e STÖHR, 1980; SHIMIZU e HIGA, 1980).

3.1.5. Necessidade da Micropropagação

A conservação e a multiplicação dos genótipos são, em geral, mais facilmente obtidas (dado o longo período de rotação das florestais nativas), por meio da propagação vegetativa.

A araucária, é uma espécie difícil de ser propagada através da enxertia (GURGEL e GURGEL FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) e estaquia (IRITANI e SOARES, 1983).

A micropropagação da espécie poderá vir a ser o instrumento chave na multiplicação dos indivíduos selecionados quanto à forma, resistência a condições ambientais adversas e, principalmente, rapidez de crescimento e produção de sementes de qualidade.

Os reflorestamentos da espécie são necessários devido à sua importância econômica, ao estado precário das suas matas pelo extrativismo contínuo sem a devida reposição; desequilíbrio faunístico e florístico, além das alterações sócio-econômicas regionais (BREHPOL, 1980; PILASI, 1980; MARLAND, 1988; WOODWELL, 1989; FEARNSIDE, 1989; ROSILLO-CALLE, 1990).

Regionalmente, o patrimônio biológico nativo está sendo protegido pela Política Nacional do Meio Ambiente, PNMA, e seus instrumentos, EIA - Estudos de Impacto Ambiental, (Decreto Lei nº 6938/81) dos quais decorrem os Relatórios de Impacto Ambiental - RIMA. São Paulo e Paraná (100) são os estados que apresentam maior número de EIA-RIMA (QUEIROZ, 1981).

Entretanto, pela consulta a somente quatro desses relatórios (Povinho de São Jorge, Campo Largo, 1988; Morro Verde, 1988; Usina Hidrelétrica de

Segredo, 1987 e Guarapuava, 1989), verifica-se que as reservas estão em estado precário, com referências constantes a capoeiras, capoeirões e mata primária degradada, com erosão genética dos principais componentes, mesmo com manejo sustentado. Também são constantes as referências às espécies de aves e mamíferos ameaçadas de extinção. A ocorrência de profundas alterações do habitat natural é indicada pela ausência gradativa das aves Jacupiranga (*Penelope obscura*), Gralha azul (*Cyanocarax coeruleus*) e Maitaca bronzeada (*Pionus maximilian*).

Sob o ponto de vista econômico-social, conforme estudos da FUPEF/EMBRAPA (1990), a madeira da araucária atingiu, por volta de 1990, US\$ 580,00/m³ contra US\$ 120,00/m³ de *Pinus elliottii* e *P. taeda*. O consumo regional de madeira era de 2,6 milhões de m³/mês, sendo 66% de exóticas e 44% de araucária e imbuia, um percentual alto que indicava o contínuo extrativismo.

O maior número de madeiras do país está concentrado na região sul do país, e tem contribuído com cerca de 8% do PIB, e com US\$ 1 bilhão da receita de exportação.

Atualmente, o pinheiro do Paraná está presente na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, tendo sido classificada como vulnerável (DIÁRIO OFICIAL, janeiro/1992). No Estado de Santa Catarina, ele consta como espécie rara e ameaçada de extinção (KLEIN, 1993).

Com a escassez crescente da matéria prima, estas madeiras estão migrando para a Amazônia, onde as matas ainda se encontram intocadas em proporções razoáveis.

O consenso geral dos ecologistas é de que sejam feitos reflorestamentos

em larga escala nas áreas degradadas, como medida preventiva contra os efeitos negativos decorrentes dos desmatamentos contínuos, em função da demanda crescente pelos produtos florestais (STRAIN, 1985; SALATI e NOBRE, 1989; MARLAND, 1989; ANON, 1989; BUSBACHER, 1989; PETERS, 1989; BROWN, 1989).

LUGO (1991), considera a micropropagação como técnica moderna de grande potencial para a conservação das espécies em vias de extinção, suprimindo ao mesmo tempo as necessidades humanas.

3.2. MICROPROPAGAÇÃO DAS ESPÉCIES FLORESTAIS

As primeiras referências aos cultivos *in vitro* das espécies florestais, conforme PIERIK (1987), datam de 1936 e foram feitas por C. D. LaRue, cultivando *in vitro* embriões de várias ginospermas; R. J. Gautheret (1940), cultivando tecido cambial de *Ulmus sp* e Ernst A. Ball (1950), que obteve a regeneração de órgãos a partir de calo de *Sequoia sempervirens*.

Desde então, a micropropagação das espécies arbóreas tem sido objeto de inúmeras pesquisas e, apesar dos avanços obtidos, ainda apresenta problemas a serem superados. Entre eles, a perda parcial ou total da capacidade de regeneração conforme a idade.

A maioria dos trabalhos realizados tem por base a micropropagação de material juvenil, visando a multiplicação dos indivíduos jovens selecionados através de programas de melhoramentos (JOHN e WEBB, 1987).

Entre as espécies florestais há muita variação quanto à capacidade de

resposta nos cultivos *in vitro* e, em sentido amplo, as Dicotiledôneas são mais acessíveis que as Monocotiledôneas e Ginospermas. Essas variações também são encontradas entre as espécies de cada um desses grupos.

Dentre as coníferas, as espécies do gênero *Araucaria* são as menos estudadas e tidas como as mais difíceis de serem micropropagadas (HANDRO, 1986; MAENE e DEHBERG, 1987).

3.2.1. Tipos de Micropropagação

A micropropagação das espécies florestais tem sido feita através do cultivo de segmentos nodais e gemas apicais de caules ou ramos; obtenção de brotos adventícios, direta ou indiretamente via calo (organogênese direta ou indireta); obtenção de embriões somáticos, também de maneira direta ou indireta via formação de calo (BHOJWANI e RAZDAM, 1983; THORPE *et al*, 1991).

3.3.1.1. Cultivo de segmentos nodais e gemas apicais

Este tipo de micropropagação, via de regra, é feito pelo cultivo dos segmentos ou gemas apicais de caule ou ramos de mudas ou indivíduos mais velhos, em meio de cultura contendo citocinina. Simplificadamente, o método consiste no estímulo do desenvolvimento dos meristemas ou gemas axiliares, de maneira única ou múltipla com o desenvolvimento das gemas axilares dos brotos em alongamento.

Os brotos múltiplos desenvolvidos são repicados para novos ciclos de

multiplicação, tantas vezes quantas forem necessárias até se obter o número desejado ou até se verificar uma diminuição de resposta (fase de multiplicação).

Em geral, os brotos obtidos já apresentam alongamento suficiente no próprio meio de multiplicação para serem submetidos à fase de enraizamento em meio de cultura contendo auxinas. Quando isto não ocorre, os brotos não suficientemente desenvolvidos, passam por uma fase intermediária, a do alongamento, em meio de cultura sem reguladores do crescimento, ou com teores muito baixos de citocininas ou ácido giberélico. Esta fase, muitas vezes se faz necessária para se eliminar o efeito residual das citocininas usadas que podem inibir o enraizamento (GEORGE, 1993).

Após o enraizamento, obtém-se as plântulas ou mudas obtidas *in vitro*, que devem ser transferidas para o solo, em condições *ex vitro*. Nesta fase, há necessidade de cuidados iniciais tais como manutenção das plântulas em ambiente sombreado, com umidade relativa alta e regas frequentes (fase de adaptação ou aclimatação) (PIERIK, 1991).

O princípio deste método de micropropagação é a eliminação da dominância do meristema apical, pela sua excisão ou ablação (segmentos nodais) e ou aplicação de citocininas (gemas apicais), permitindo o crescimento das gemas ou meristemas axilares.

Nas espécies com dominância apical muito forte, as gemas axilares dos segmentos nodais, mesmo com citocinina no meio de cultura, não formam brotos múltiplos, desenvolvendo-se sem ramificações. Nestes casos, a taxa de multiplicação depende da rapidez do desenvolvimento do broto axilar e do número de novos segmentos que o mesmo pode fornecer. Em *Dalbergia sissoo* e *Feijoa*

sellowiana, foram obtidos três a quatro brotos a partir do primeiro, em seis semanas (BHOJWANI e RAZDAN, 1983).

Por ser mais simples e menos suscetível a mudanças sob as condições de cultivo, garantindo a fidelidade genotípica desejada, este é o método mais adotado para a micropropagação das espécies florestais (THORPE *et al*, 1991). Sua desvantagem é que para algumas espécies este método pode ser muito trabalhoso e lento.

3.2.1.2. Organogênese direta e indireta

O termo organogênese, nesta revisão, está sendo considerado somente para a obtenção de brotos adventícios, ou seja, não originados de gemas ou resíduos meristemáticos pré-existentes.

O método consiste na indução da formação de ápices caulinares, através do tratamento dos explantes com reguladores do crescimento, citocininas somente e em concentrações maiores que as do método anterior, ou combinadas com auxinas.

Os ápices caulinares podem ser formados diretamente sobre os explantes (organogênese direta) ou em calos induzidos pelo tratamento dado (organogênese indireta).

A indução depende da interação entre o explante, o meio de cultura utilizado, a concentração e o tipo de citocinina e/ou auxinas e condições ambientais de cultivo (THORPE *et al*, 1991).

O método é mais utilizado para a micropropagação de coníferas e de

maneira direta. Os explantes mais frequentemente utilizados são embriões imaturos e maduros, embora cotilédones, epicótilos e partes de mudas muito jovens possam dar respostas satisfatórias (THORPE *et al*, 1991).

A organogênese indireta é mais utilizada para a multiplicação de Dicotiledôneas, cujos tecidos parecem ser mais aptos para a formação de calos organogênicos, mais facilmente mantidos através de sub-culturas sucessivas. O balanço apropriado entre uma citocinina e uma auxina é o princípio básico da organogênese indireta (BHOJWANI e RAZDAN, 1983; THORPE *et al*, 1991).

Vários fatores devem ser considerados quando este método é escolhido: o calo deve ser organogênico e manter essa característica através dos sub-cultivos; poderá haver dificuldade no enraizamento dos brotos obtidos devido aos efeitos residuais das altas concentrações da citocinina usada para a indução; os custos podem ser elevados; a fidelidade genotípica pode ser comprometida pela alteração do número de cromossomas (DUNSTAN e THORPE, 1986).

3.2.1.3 Embriogênese somática

Conforme THORPE *et al* (1991), esta deveria ser a rota de micropropagação preferencial para a micropropagação das espécies florestais, sempre que possível, devido:- a dificuldade de enraizamento dos brotos obtidos através do cultivo dos segmentos nodais; a embriogênese somática elimina esta dificuldade devido à presença do polo radicular e formação de radícula; é um método muito efetivo para se obter um grande número de plantas e de maneira quase simultânea; os calos embriogênicos podem servir como fonte de

protoplastos embriogênicos para a engenharia genética das espécies florestais. A embriogênese somática obtida de calos embriogênicos é mais utilizada que a obtida diretamente dos explantes.

Para as Dicotiledôneas vários tipos de explantes podem ser utilizados, mas em se tratando de coníferas, experimentos bem sucedidos resultaram, na maior parte dos casos, do cultivo de embriões imaturos e, em alguns casos, de embriões maduros (THORPE *et al*, 1991). Entretanto, GEORGE e SHERRINGTON (1984), citam exemplos de embriões somáticos em coníferas, obtidos a partir de acículas e brotos.

As exigências básicas para os dois tipos de embriogênese somática é a indução direta dos embriões ou do calo embriogênico, através da adição ao meio de cultura de doses relativamente altas de auxinas, mais frequentemente o ácido 2 - 4 - diclorofenoxiacético, combinado ou não com uma citocinina; uma fonte de nitrogênio reduzido, na forma de íons de NH_4^{+2} (NH_4Cl , por exemplo) ou aminoácidos tais como glutamina, asparagina ou alanina (PIERIK, 1987; THORPE *et al*, 1991).

A formação dos embriões somáticos pode ser reconhecida em seus estágios iniciais de desenvolvimento pelas suas formas típicas: - nódulos individualizados e característicos na *fase globular*, nódulos em forma de coração (fase de coração ou "heart"); fase de torpedo, quando se tem uma plântula composta por um curto eixo caulicular, em cujas extremidades se vêem a radícula e cotilédones em início de desenvolvimento (DODDS e ROBERTS, 1982). O desenvolvimento apropriado dos embriões do estágio globular para o de torpedo, em geral, ocorre com a transferência dos mesmos para um meio básico sem

reguladores. Entretanto, como inicialmente observado por HALPERIN e WETHERELL (1964), na embriogênese somática de *Daucus carota*, em muitos casos, os embriões somáticos da fase torpedo germinam muito rápido, sem passar pela denominada fase final de maturação. Nesta fase se completa e se define a organização dos tecidos embrionários. Sem ela, as plântulas obtidas podem apresentar conformação anormal, com cotilédones fundidos, meristemas apicais da raiz e do caule incompletos ou ausentes.

Este fenômeno é muito comum, ocorrendo inclusive em muitas espécies florestais (LU e THORPE, 1987; LELÚ *et al*, 1994).

AMMIRATO e STEWARD (1971), obtiveram embriões somáticos adequadamente maduros, pelo aumento da osmolaridade do meio de cultura, aumentando a concentração de sacarose, ou adição de inositol e sorbitol. O ácido abscísico, utilizado em concentrações adequadas, ou seja, que não inibem o desenvolvimento normal dos embriões, também proporcionam a maturação adequada dos mesmos (AMMIRATO, 1974, 1977).

3.2.2. Explantes e Morfogênese

Conforme AMMIRATO (1985), os aspectos morfogênicos envolvidos na micropropagação das plantas, estão sendo cada vez mais estudados, e a caracterização dos mesmos, feitas através dos termos utilizados pelos pesquisadores do desenvolvimento do embrião animal.

O mesmo autor cita e define estes termos: - determinação, competência, indução e plasticidade.

Determinação: - é o desencadeamento dos processos internos que programam e definem a rota de desenvolvimento de uma célula ou grupo de células, levando-as a uma expressão morfológica típica.

Competência: - é a capacidade de uma célula ou grupo de células para responderem a um estímulo, expressando-se morfológicamente conforme um potencial inerente.

Indução: - é o processo através do qual se leva uma célula ou grupo de células a se expressarem morfológicamente de maneira particular, através de estímulos apropriados. Se as células já forem competentes para esta resposta, a indução é denominada permissiva; se a competência tiver que ser adquirida e/ou mudada, a indução é diretiva.

Plasticidade: - é a capacidade das células responderem a um estímulo dado, expressando-se morfológicamente de maneira diferente ao estabelecido por uma determinação anterior. Em outras palavras: células seguindo um curso de desenvolvimento já estabelecido, podem ser levadas a seguir um novo programa, conforme o estímulo recebido.

A plasticidade é tanto maior quanto menor for o número de etapas vencidas pelas células, numa rota pré-estabelecida.

Estes conceitos podem ser correlacionados com os utilizados para descrever processos morfogênicos no desenvolvimento natural das plantas, citados por ESAÚ (1972): - potencialidade meristemática, diferenciação e especialização, desdiferenciação, e aos conceitos de totipotência de M. J. Schleiden, 1938 e T. Schwann, 1839, e polaridade, de H. Vöchting, 1878.

Pela totipotência, toda célula somática viva têm, em potencial, a capacidade

para originar diversos tipos de células, tecidos e órgãos para reconstituir partes perdidas e mesmo novos indivíduos.

A polaridade se refere ao direcionamento da regeneração - na formação do embrião, a partir das primeiras divisões do ovo ou zigoto, as células superiores estão destinadas à formação das partes aéreas, as inferiores à raízes. Qualquer célula viva conserva esta propriedade.

O desenvolvimento natural da planta, assim como sua regeneração, está condicionada à formação de novas células através de divisões de células pré-existentes. Diz-se que as células em divisão estão em atividade meristemática. Esta atividade é a função específica das células dos ápices do caule, raiz principal, ramos e raízes secundárias, além das que determinam o crescimento secundário das Ginospermas e Dicotiledôneas - o câmbio e o felôgeno.

As células novas resultantes passam pelos processos de diferenciação e especialização, ou seja, crescem desenvolvendo características morfológicas adequadas às funções a serem desempenhadas. Quanto maior o número de características desenvolvidas maior é o grau de diferenciação e especialização.

A potencialidade meristemática é a capacidade das células já diferenciadas, de voltarem a se dividir e formar novas células.

A desdiferenciação é a manifestação da potencialidade meristemática pelas células já diferenciadas. Ocorre com maior facilidade nas células pouco diferenciadas ou especializadas.

Portanto, a micropropagação, sendo um processo de regeneração, depende dos fatores morfogênicos: -

- a competência e plasticidade, decorrem da totipotência, polaridade e

potencialidade meristemática das células em cultivo; e, dependem do grau de diferenciação e especialização das mesmas.

O grau de diferenciação das células em cultivo, indica o percurso já percorrido por essas células no programa de desenvolvimento pré-estabelecido (determinação). Maior o grau de diferenciação, mais difícil é a indução a uma resposta desejada, sendo menores a competência e a plasticidade e, conseqüentemente, a capacidade de desdiferenciação.

Segundo CHRISTIANSON e WARNICK (1985), uma resposta morfológica depende de três estágios: - aquisição da competência; indução e determinação para uma resposta morfogênica particular; diferenciação, no qual a organização dos tecidos se torna aparente.

Os três estágios podem ser reconhecidos pela manipulação das condições de cultivo, desde que as necessidades em reguladores do crescimento para a indução sejam distinguidas das dos dois outros estágios.

A resposta morfogênica dos explantes cultivados *in vitro* é o resultado da interação entre o genótipo, o estágio de desenvolvimento dos mesmos, condições ambientais de cultivo, composição química do meio de cultura e reguladores do crescimento (FINSTADT *et al*, 1993). Como exemplo os autores citam explantes de folhas de *Convolvulus arvensis*, que cultivados em três tipos de meios de cultura (para formação de brotos, enraizamento e formação de calo), formaram somente pequenos calos. Quando foram transferidos para qualquer um dos meios indutivos passaram a responder conforme o regulador presente. Os autores explicam que a competência para as respostas foi adquirida no primeiro cultivo, não importando o tipo de regulador dos meios.

A ação dos reguladores utilizados e o tempo de indução necessário para se obter a resposta desejada são descritos por AMMIRATO (1985): pecíolos de folhas de *Daucus carota*, cultivados em meio com ácido naftalenoacético só formaram brotos em um extremo e raízes em outro. Quando cultivados no mesmo meio de cultura, mas contendo o ácido 2 - 4 diclorofenoxiacético, houve formação de embriões somáticos em um extremo e raízes no outro. O tempo de permanência no meio indutivo influenciou a intensidade da resposta: transferidos para o mesmo meio, sem o ácido 2 - 4 diclorofenoxiacético, a intervalos de um, dois, três e quatro dias, o máximo de embriões somáticos foi formado com o tratamento de quatro dias, inclusive com a eliminação da polaridade, com embriões nos dois extremos dos segmentos.

Aplicando esses conceitos básicos à regeneração *in vitro* das espécies florestais, a competência, tendo-se em conta a presença de gemas axilares ou resíduos meristemáticos axilares (Coníferas) dos segmentos nodais e ápices caulinares, não deveria apresentar problemas para a multiplicação. No entanto, os problemas existem e, mesmo com a aplicação de citocininas e utilização de explantes de indivíduos muito jovens, algumas espécies são reconhecidamente difíceis de serem multiplicadas: - *Juglans* spp (MCGRANAHAN e TULECKE, 1987); *Hevea brasiliensis* (PARANJOTHY, 1987); *Cunninghamia lanceolata* (BIGOT e ENGELMANN, 1987); *Prosopis* spp (JORDAN, 1987); *Araucaria* spp (HANDRO, 1986).

Muitas espécies florestais apresentam alta taxa de multiplicação através do cultivo dos segmentos nodais e/ou ápices caulinares: *Populus* spp (AHUJA, 1987); *Acer*, *Betula*, *Castanea*, *Fagus*, *Tilia* e *Ulmus* spp (CHALUPA, 1987);

Eucalyptus spp (GUPTA e MASCARENHAS, 1987); *Sapium* spp (KRIKORIAN e KANN, 1987); *Pseudotsuga menziesii* (ABOEL-NIL, 1987); *Cryptomeria japonica* (ISIKAWA, 1987); *Picea* spp (BORNMAN, 1987; JOHN e WEBB, 1987); *Pinus* spp (JELASKA, 1987; MEHRA-PALTA e THOMPSON, 1987; ZEL *et al*, 1988); *Acer saccharinum* (PREECE *et al*, 1991); *Betula pendula* (SAEBO *et al*, 1992); *Quercus robur* "fastigiata" (MARKS e SIMPSON, 1993); *Caesalpinia pulcherrima* (RAHMAN *et al*, 1993).

Na análise do que significa o termo indução, AMMIRATO (1985), ressalta que a composição hormonal do meio de cultura é apenas um dos fatores exógenos que afeta os padrões de desenvolvimento de um explante ou partes do mesmo; que está cada vez mais clara a evidência de que para promover a resposta desejada em espécies recalcitrantes, deve haver uma sequência mais complexa de mudanças e manipulações.

O mesmo autor informa que, além do estágio de desenvolvimento do explante, já foi demonstrado que a posição original do mesmo na planta, influi no tipo e frequência de resposta morfogênica: nas gramíneas, tecidos embrionários; tecidos meristemáticos de folhas e inflorescências jovens, têm maior competência morfogênica que os de outras localizações.

Entretanto, o desenvolvimento vegetal é plástico e, os processos envolvidos podem ser mudados ou modulados, produzindo uma variedade de respostas, apesar de não se ter ainda idéia da extensão dessa plasticidade.

Para a organogênese direta e indireta, a competência parece estar bem mais restrita e ser característica de indivíduos jovens: embriões imaturos e maduros; cotilédones, hipocótilos, epicótilos; as mesmas partes de embriões

germinados *in vitro*; partes de mudas obtidas *in vitro*. Também estão condicionadas às diferenças entre espécies.

Organogênese direta e indireta foram obtidas de embriões de: - *Picea glauca* (CAMPBELL e DURZAN, 1974); *Pinus strobus* (MINOCHA, 1980); *Pinus elliottii* (PEREZ-BERMUDEZ *et al*, 1987); *Pinus ponderosa* (ELLIS e BILDERBACK, 1987); *Populus deltoides* (COLEMAN *et al*, 1990); *Picea glauca* (ELLIS *et al*, 1991); *Pinus strobus* (CHESIK *et al*, 1991); *Fraxinus americana* (BATES *et al*, 1992); *Picea omorika* (BUDIMIR e VUJICIC, 1992); *Vigna radiata* (GULATI e JAIWAL, 1992); *Prosopis tamarugo* (NANDWANI e RAMAWAT, 1992); *Pinus caribaea* (HALOS e GO, 1993; GO *et al*, 1993); *Cupressus sempervirens* (LAMBARDI *et al*, 1995). De folhas de indivíduos germinados *in vitro*: *Eleagnus angustifolia* (ECONOMOU e MALOUPA, 1995), *Dioscorea bulbifera* (WERNICKE e PARK, 1993); *Betula pendula* (LEEGER e TRIPEPI, 1993).

Num estudo sobre a obtenção da embriogênese somática, CARMAN (1990), cita como mais competentes os tecidos não meristemáticos de embriões imaturos, maduros, mudas e estruturas florais. Descreve as células destes tecidos como semelhantes às células meristemáticas primárias, sendo extremamente sensíveis às menores alterações dos fatores físicos e químicos envolvidos. Podem estar presentes nos explantes de algumas espécies e, em outras, ser formadas somente após muitas divisões celulares, ocorridas sob determinadas condições de cultivo, para a desdiferenciação e estabelecimento da rota para a embriogênese.

Segundo o mesmo autor, há um período mais propício para a embriogênese somática nos embriões zigóticos em desenvolvimento ("janela de

resposta") que corresponde a 11 a 14 dias após a antese em *Trifolium aestivum*, durante os quais se induz facilmente um calo embriogênico a partir do escutelo. Essa "janela" é encontrada também nos embriões zigóticos maduros, cultivados em meio com ácido abscísico. A perda da competência fora do período mencionado, não ocorreu pela diferenciação das células do escutelo, mas pelo direcionamento das células para um programa de desenvolvimento para a germinação, com acumulação rápida de substâncias de reserva no mesmo. O ácido abscísico inibe e/ou reverte este processo. O autor cita, como exemplos de espécies florestais nas quais os embriões maduros perdem a competência para formar embriões somáticos pelos mesmos motivos: *Picea glauca* e *Picea engelmannii*.

A embriogênese somática das espécies florestais está na dependência de uma competência quase que restrita à fase inicial do desenvolvimento do embrião zigótico. Nas coníferas, a embriogênese somática tem sido obtida através da formação de um tecido inicialmente denominado calo embriogênico, mas que atualmente está sendo denominado de "massa suspensor-embrional" (MSE) (ATTREE e FOWKE, 1993). Esta denominação se deve às observações feitas nos primeiros experimentos bem sucedidos com embriões em início de desenvolvimento: o tecido embriogênico, "calo", origina-se, na maioria dos casos, das células do suspensor do embrião zigótico em desenvolvimento. É composto por uma massa de células semelhantes às do suspensor: longas, tendo numa das extremidades um pequeno número de células pré-embriônicas. São exemplos: - *Picea abies* (HAKMAN e ARNOLD, 1985; HAKMAN *et al*, 1985); *Picea glauca* e *P. mariana* (HAKMAN e FOWKE, 1985); *Pinus elliotii* (JAIN e NEWTON, 1989);

Pinus caribaea (LAINE e DAVID, 1990); *Larix x leptoeuropaea* (LELU *et al*, 1994). Entretanto, a embriogênese somática pode ser obtida de embriões imaturos com tecido embriogênico originado de outras partes que não o suspensor como em *Cupressus sempervirens*, com MSE da base do eixo embrionário; e radícula (LAMBARDI *et al*, 1995); e *Picea glauca*, com MSE do hipocótilo (LU e THORPE, 1986). O calo embriogênico das Dicotiledôneas, em geral, é de textura média mas não friável, fácil de ser quebrado; tem aparência nodular e, é composto por pequenas células parenquimáticas, não havendo diferenciação de elementos de condução e, com pequenas áreas de grande atividade meristemática, principalmente na periferia (VIEITEZ *et al*, 1990). Estes calos, em grande parte dos casos tiveram origem nos cotilédones de embriões imaturos, coletados logo após a antese, como em *Juglans regia*, seis a 11 semanas (TULECKE e MCGRANAHAN, 1985); *Liriodendron tulipifera* x *L. crenata*, oito semanas (MERKLE *et al*, 1993); *Prunus avium* (DE MARCH *et al*, 1993); *Juglans nigra*, 13 semanas (NEUMAN *et al*, 1993); *Acacia catechu*, 40 dias (ROUT *et al*, 1995).

De embriões maduros, foram obtidas as embriogênese somáticas de *Castanea sativa* x *C. crenata* (VIEITEZ *et al*, 1990), de calo de cotilédones, *Picea abies*, com MSE dos cotilédones e hipocótilo (KVAALEN e ARNOLD, 1991); *Picea omorika*, MSE dos cotilédones e base do hipocótilo (BUDIMIR e VUJICIC, 1992); *Fraxinus americana*, calo de cotilédones e hipocótilo (BATES *et al*, 1992).

São poucos os exemplos de embriogênese somática obtida de explantes que não embriões: *Betula pendula*, folhas jovens de mudas de uma semana e um ano (KURTEN *et al*, 1990; NUUTILA *et al*, 1991); ápices com cotilédones de mudas de 10 a 21 dias, *Picea omorika* (BUDIMIR e VUJICIC, 1992); folhas de

mudas obtidas *in vitro*, inflorescências jovens - *Euterpe edulis* (GUERRA, 1989).

Mais raros ainda são os exemplos de embriogênese somática direta: *Aesculus hippocastanum*, embriões coletados 30 dias após a antese (KISS *et al*, 1992); *Liriodendron tulipifera* x *L. chinense*: de embriões zigóticos imaturos obtidos por polinização controlada (MERKLE *et al*, 1993); *Prunus avium*, embriões zigóticos de 2,5 mm - 4,5 mm (DE MARCH *et al*, 1993); *Juglans nigra* (NEUMAN *et al*, 1993).

Não é incomum a embriogênese secundária, ou seja embriões somáticos formados diretamente sobre os obtidos na primeira cultura: *Aesculus hippocastanum* (RADOJEVIC, 1988); *Castanea sativa* x *Castanea crenata* (VIEITEZ *et al*, 1990); *Juglans nigra* (NEUMAN *et al*, 1993); *Acacia catechu* (ROUT *et al*, 1995).

3.2.3. Estabelecimento dos Cultivos

O desenvolvimento de um protocolo para a micropropagação de uma espécie vegetal depende de vários fatores, aparentemente simples na essência, mas que na realidade abrangem inúmeras variáveis de cuja interação depende o sucesso no alcance do objetivo final que é a clonagem dos genótipos superiores.

Estas variáveis, excluindo o estabelecimento das plântulas obtidas, decorrem da opção pelo tipo de micropropagação a ser pesquisado, da verificação dos explantes mais viáveis e do estabelecimento dos cultivos que depende dos aspectos, procedimentos e problemas envolvidos com a descontaminação dos explantes, escolha do meio de cultura básico mais adequado, uso dos

reguladores do crescimento e condições ambientais para o desenvolvimento desses cultivos (período de incubação).

3.2.3.1. Assepsia dos explantes e contaminação

Esta etapa pode ser crucial no estabelecimento dos cultivos *in vitro*, principalmente, quando se trata de explantes de indivíduos no seu habitat natural (PIERIK, 1987; ZIMMERMAN, 1985; CASSELS, 1991).

GEORGE e SHERRINGTON (1984), recomendam uma série de cuidados com a planta doadora (Ortet), antes da coleta dos explantes: - cultivo de mudas em casa de vegetação com baixa umidade relativa (70%); evitar molhar as partes aéreas na regas; aplicação de fungicidas/inseticidas; conservar semanas antes da coleta, as mudas em uma atmosfera mais seca (umidade relativa menor do que 70%). Quando se tratar de material de campo, cobrir os brotos com celofane ou plástico, com prévia aplicação de fungicida e/ou inseticida, permitindo que os brotos se desenvolvam sem o contato direto com o ambiente.

Após a coleta, retirar todas as partes necrosadas e lavar os explantes em água corrente muito limpa por várias horas, se necessário, antes da assepsia.

ZIMMERMAN (1985) e PIERIK (1987), recomendam, após a limpeza superficial com água corrente, a imersão dos explantes em álcool 70%, por alguns segundos a 1 -2 minutos conforme o grau de maturação do explante a ser usado. Os muito tenros, requerem passagens rápidas pelo álcool 70%.

A assepsia é feita pela imersão dos explantes em soluções de produtos esterilizantes. YEOMAN e MACLEOD (1977), citam como mais eficientes e

utilizados o hipoclorito de sódio (9% a 10%), hipoclorito de cálcio (2%), peróxido de hidrogênio (10% a 12%), água bromada (1% a 2%), cloreto de mercúrio (0,1% a 1%). As concentrações e os tempos de tratamento dependem das características morfológicas dos explantes, e o grau de exposição dos mesmos às condições ambientais.

Frutos carnosos imaturos dos quais serão retiradas as sementes em geral são tratados inteiros. O endocarpo lignificado e o tegumento duro de alguns frutos e sementes, em geral, são retirados antes da assepsia.

É comum a utilização de algumas gotas de detergente na solução esterilizante para melhor contacto com a superfície do material a ser tratado. ZIMMERMAN (1985), salienta que os tratamentos dos explantes na solução esterilizante, em agitadores ou a vácuo, são mais efetivos que os tratamentos estáticos.

Na prática, os tratamentos mais adequados devem ser determinados empiricamente, conforme o tipo de explante, facilidade de aquisição do agente químico.

Todos os autores mencionados concordam que há ocorrência de contaminantes internos, não atingidos pelos tratamentos já descritos.

PIERIK (1987), tendo em conta efeitos pouco positivos e secundários, não recomenda a utilização de antibióticos na micropropagação, principalmente a inclusão dos mesmos nos meios de cultura. Prefere, nos casos mais difíceis, optar por outro tipo de micropropagação: o cultivo de meristemas que, em geral, são isentos de microorganismos.

Devido à pouca efetividade de um só antibiótico, mesmo de largo espectro,

YOUNG (1984), testou com sucesso, o uso simultâneo de vários antibióticos, incluindo-os nos meios de cultivo. Esta prática torna-se necessária quando se tem conhecimento da variedade de bactérias, fungos, micoplasmas, vírus e viróides que ou, sempre estão associados, sendo endofíticos ou penetram nas plantas através de feridas, aberturas naturais e mesmo através de mecanismos próprios. Podem ser inter e intracelulares (CASSELS, 1991). Muitos deles são capazes de sobreviver e se multiplicar no meio de cultura, embora muitos também possam ficar em estado latente, talvez devido à alta concentração dos nutrientes minerais, sacarose e pH. São estes contaminantes que aparecem tardiamente nos cultivos secundários e terciários, principalmente quando há redução na concentração do meio.

As bactérias que mais estão associadas às plantas são as dos gêneros: *Acetobacter*, *Autobacterium*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agromyces*, *Agrobacterium*, *Azotomonas*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*; Os principais fungos são: - *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*. Os micoplasmas mais comuns, pertencem aos gêneros: *Achloeplasma*, *Anaeroplasma*, *Mycoplasma* (do floema), *Spiroplasma* (do floema), *Ureaplasma* (CASSELS, 1991).

Por serem termolábeis, os antibióticos devem ser acrescentados aos meios de cultura por ultrafiltração, implicando em maior mão-de-obra, obrigatoriamente na capela de fluxo laminar, com a temperatura dos meios de cultura (previamente

esterilizados em autoclave, 120° C, 20 minutos), em torno de 35° C - 45° C. Antes de serem utilizados, a concentração mínima efetiva (CME) deve ser determinada, para evitar efeitos tóxicos das altas concentrações (CASSELS, 1991; GEORGE, 1993).

Alguns pesquisadores testaram a efetividade e os efeitos de vários antibióticos e fungicidas.

THURSTON *et al* (1979), trabalharam com 25 compostos, entre fungicidas e bactericidas, na prevenção da contaminação das culturas de *Cattleya aurantiana* e *Stanhopea occulata*. Dos resultados obtidos, concluíram que a anfotericina B, apesar de instável, foi efetiva para os fungos dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, na concentração de 10 ppm; a *gentamicina*, é muito estável, não fitotóxica, mesmo em concentrações altas (50 ppm), e foi efetiva contra bactérias gram positivas e gram negativas e micoplasmas; a *vancomincina* não foi efetiva e apresenta toxidez nas concentrações de 50 - 200 ppm; o fungicida Benlate, autoclavado, passou à forma hidrolisada - metil - 2 - benzimidazol - carbamato e foi muito efetivo contra fungos. Este fungicida, conforme os autores, estimulou o crescimento dos brotos e o enraizamento dos mesmos. Contudo, conforme os mesmos autores, o produto pode ter afetado negativamente os explantes de algumas espécies, como *Ulmus americana*, *Platanus occidentalis* e *Acer saccharinum*.

O fungicida kanamicina à concentração de 50 - 60 mg/l, além de ser muito efetivo, aumentou a formação de brotos adventícios em calos e discos foliares de *Daucus carota* (OWENS, 1979). Em contraposição, este antibiótico reduziu o crescimento dos cotilédones e inibiu completamente a formação de brotos em

discos foliares de *Rubus* sp (FIOLA *et al*, 1990). PHILLIPS *et al* (1981), verificaram que a rifampicina foi também muito efetiva, sem afetar o crescimento das células em suspensão de *Helianthus tuberosus*.

LEIFERT *et al* (1992), constataram, para várias espécies herbáceas, uma ação decrescente dos antibióticos estreptomicina, polimicina, rifampicina, carbecilina, na inibição do crescimento, formação de calo, divisão celular e enraizamento dos brotos obtidos.

Também para espécies herbáceas, KNEIFEL e LEONHARDT (1992), em experimentos envolvendo 28 antibióticos, isolados e em combinações variadas, constataram que as misturas Imipenem / ampicilina e Imipenem / penicilina G, nas concentrações de 5 mg/l cada, foram as mais positivas no combate e prevenção das bactérias *Staphylococcus xylosum*, *S. aureus*, *S. cohnii*, *Bacillus* sp; *Corynebacterium* sp, *Pseudomonas vesicularis*.

Uma relação completa dos antibióticos e combinações de dois ou mais deles, mais utilizados na prevenção e combate aos agentes contaminantes, características principais, incluindo a ação sobre os microorganismos e concentrações recomendáveis, é apresentada pela Sigma Chemical Company, páginas 1641 - 1643, do seu catálogo de 1995.

3.2.3.2. Meios de cultura

Nos cultivos *in vitro*, os nutrientes necessários à sobrevivência, crescimento e condições para as respostas desejadas, são fornecidos aos explantes através dos meios de cultura básicos. Estes meios são formulados através de compostos

inorgânicos que garantem a presença dos macro e micro nutrientes sob formas disponíveis, compostos orgânicos complementares, tais como vitaminas, inositol, vários aminoácidos, sacarose e um agente gelificante, quando se utiliza meios semisólidos.

Atualmente, em função das inúmeras pesquisas realizadas, há um grande número de composições básicas, muitas delas derivadas de modificações das que foram propostas pelos primeiros pesquisadores da área. Entre estas, a mais conhecida e utilizada é a de Murashigue e Skoog (1962), comumente designada MS. As adaptações resultaram da constatação das exigências nutricionais específicas de muitas plantas, principalmente as florestais (Tabela 1).

MCCOWN e SELLMER (1987), salientam que a escolha de um meio de cultura com a composição básica adequada é fator preponderante no estabelecimento dos cultivos e obtenção das respostas desejadas, uma vez que a mesma pode, inclusive, afetar o efeito dos reguladores do crescimento adicionados.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DE DIVERSOS MEIOS DE CULTURA BÁSICOS (VALORES EM MG/L).

Elementos	1962	1965	1965	1968	1969	1972	1979	1980	1985
	Murashigue e Skoog	Linsmaier e Skoog	Erikson	Gamborg	Nistch	Gresshoff e Doy	De Greef e Jacob	McCown	Litvay
CaCl ₂	440,00	332,02	332,02	113,23	166,00		226,50	72,00	16,61
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	---	---	---	---	---	347,00	---	556,00	---
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,0025	0,025		0,025	0,0025		0,125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,0025	0,025	0,025	0,025	0,0025	0,25	0,50
FeNaEDTA	36,70	36,70	36,70	36,70	36,70	36,70	36,70	36,70	36,70
H ₃ BO ₃	6,20	6,20	0,63	3,00	10,00	0,30	10,62	6,20	31,00
KH ₂ PO ₄	170,00	170,00	340,00	---	68,00	300,00		170,00	340,00
Na ₂ H ₂ PO ₄	---	---	---	130,44	---	---	250,00	---	---
KI	0,83	0,83	---	0,75	---	0,80	1,583	---	4,15
KCl	---	---	---	---	---	65,00	600,00	---	---
K ₂ SO ₄								990,00	
KNO ₃	1900,00	1900,00	1900,00	2500,00	950,00	1000,00	2000,00	---	1900,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00	370,00	370,21	250,00	185,00	17,09	500,00	180,70	903,38
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	16,90	16,90	10,00	18,94	1,00	1,68	22,30	21,00
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,025	0,25	0,25	0,025	0,0025	0,25	1,25
NH ₄ NO ₃	1650,00	1650,00	1200,00	---	720,00	1000,00	---	400,00	1650,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	---	---	---	---	---	400,00	---	---
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	8,60	15,00	2,00	10,00	0,30	1,06	8,60	43,00
ác. nicotínico	0,50		0,50	1,00	5,00	1,00	1,00	0,50	0,50
piridoxina - HCl	0,50		0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	0,50	0,10
tiamina - HCl	0,10	0,40	0,50	10,00	0,50	10,00	10,00	1,00	0,10
ác. fólico	---	---	---	---	0,50	---	---	---	---
biotina	---	---	---	---	0,05	---	---	---	---
glicina	2,00	---	2,00	---	2,00	4,00	---	2,00	---
mioinositol	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Analisando 11 tipos de formulações básicas (Tabela 2), os mesmos autores salientaram que os aspectos mais importantes nessa escolha são a concentração total de íons inorgânicos, o teor total de N, o composto inorgânico utilizado para o fornecimento de Ca^{2+} e a concentração deste último e o teor dos íons Cl^- .

As concentrações iônicas totais altas como as de Litvay (1981), (101,40 mM) e de Murashigue e Skoog (1962), (94,26 mM), podem inibir o crescimento dos explantes de muitas espécies, havendo, no entanto, exceções, conforme espécie/genótipo. É, por esta razão, que muitos pesquisadores utilizam estes meios de cultura com a concentração iônica total reduzida à metade, 1/3, 1/4 e até 1/5 da formulação inicial.

TABELA 2. CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÍONS E DE N EM DIVERSOS MEIOS DE CULTURA BÁSICOS (EM MM).

Autores	Usos	Conc. Total Íons	Conc. Total N
Litvay, 1981	Coníferas	101,40**	60,00
Murashigue e Skoog, 1962	Geral	94,25	60,00
Anderson, 1975	Rhododendron	86,48	59,36
Quoirin e Lepoivre, 1977	Maçã	68,58	38,00
Durzan, 1973	Coníferas	61,83	50,00
Gamborg, 1968	Geral	59,98	26,72
McCown, 1981	Geral	42,39	14,58
Gresshoff e Doy, 1972	Geral	36,34	13,06
Zimmermann, 1980	Mirtilo	31,18	15,00
Gupta e Durzan, 1985	Coníferas	29,05	15,48
White, 1943	Geral	19,04	3,33

** em valores totais decrescentes.

Os teores muito baixos de N não suportam um crescimento adequado, afetando inclusive a morfogênese.

Os íons Ca^{2+} são fornecidos por compostos salinos, em geral não muito solúveis. Uma vez absorvidos, estes íons são requisitados pelas regiões em crescimento ativo, onde são utilizados ou ficam acumulados. Após algum tempo de cultivo, também devido o baixo índice de transpiração dos explantes no interior dos recipientes de cultivo, pode ocorrer a deficiência em Ca^{2+} que visualmente se reconhece pela necrose das regiões meristemáticas. Para se evitar estes aspectos negativos, deve-se utilizar compostos que forneçam Ca^{2+} sob formas mais disponíveis e que não contenham cloro.

O teor de íons Cl^- muito elevado pode ser tóxico, causando o amarelecimento das folhas, enfraquecimento dos caules e morte dos explantes.

Os autores recomendam testar, antes de tudo, o efeito da composição do meio básico sobre os explantes; utilizar inicialmente um meio básico com teor iônico total médio/baixo; testar o efeito do aumento do teor de N e/ou Ca^{2+} ; usar recipientes que proporcionem boas trocas gasosas; ficar atento ao fato de que as diferenças nas exigências entre genótipos/espécies podem ser grandes.

Segundo OZIAS-AKINS e VASIL (1985), os nutrientes minerais requeridos pelas plantas podem ser divididos em dois grandes grupos: os que se ligam covalentemente aos compostos orgânicos e são constituintes vitais das macromoléculas, DNA, RNA e proteínas (N, P e S); e os que participam de variadas funções, incluindo a regulação dos gradientes osmóticos e elétricos, síntese de proteínas, reações de redução e oxidação das metaloproteínas (K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, B e Cl).

Conforme os mesmos autores e GEORGE (1993), de todos os nutrientes, o N e suas formas, oxidada ou reduzida, é o responsável pelos efeitos mais pronunciados no crescimento, diferenciação e morfogênese.

Fornecido sob as formas NO_3^- e NH_4^+ , também desempenha papel importante no equilíbrio do pH do meio de cultura durante o período de cultivo. Sendo absorvido em pH mais ácido, a retirada do NO_3^- causa a elevação do mesmo, o que pode limitar a sua absorção posterior; o NH_4^+ é absorvido em pH mais alto e sua retirada acidifica o meio, tornando possível maior absorção do NO_3^- . Embora o fornecimento do N sob a forma de nitratos seja maior que sob a forma NH_4^+ , não é recomendável que seja a única fonte de N, para se evitar o acúmulo de nitritos que pode ser tóxico.

As plantas utilizam as formas reduzidas de N (do amônio e aminoácidos) que, geralmente, têm efeitos positivos no crescimento e diferenciação. Estimulam a atividade da nitrato redutase, facilitando o metabolismo do N e aumentando a disponibilidade do N dos compostos presentes; equilibram o pH do meio em presença do NH_3^- , aumentando a absorção deste; estimulam a síntese dos fatores endógenos necessários às divisões celulares, e participam da formação das novas paredes celulares, diminuindo a necessidade em citocininas para a multiplicação. Os aminoácidos, tais como a glutamina, por exemplo, não substituem o NH_4^+ nestes aspectos. Na morfogênese, o efeito do N reduzido pode ser constatado mais diretamente na indução da embriogênese somática embora seja importante também para a organogênese direta e no cultivo de embriões zigóticos. Este efeito é dependente de uma concentração adequada de sacarose.

TEASDALE (1987), salienta, em relação aos micronutrientes, especial

atenção aos aspectos referentes aos íons metálicos, principalmente o Fe, que na presença de fosfato precipita sob a forma de hidróxido de ferro, insolúvel. Por esta razão, é preferencialmente adicionado aos meios básicos sob a forma NaFeEDTA, ou como sulfato, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em solução preparada com Na_2EDTA na proporção adequada (1/3 de Fe total). Em excesso, o EDTA livre pode formar quelados com os íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , tornando-os indisponíveis e acarretando suas deficiências.

Quanto aos demais, deve-se ter em mente que há correlações positivas, competições e antagonismos entre eles: o Cu^{2+} não é absorvível sob a forma de quelados e sua retirada do meio se faz juntamente com o Zn^{2+} e o Mn^{2+} ; o Zn^{2+} se correlaciona positivamente com o Ca^{2+} , Mg^{2+} , S e B, e negativamente com o Cu^{2+} , Mn^{2+} e o Fe^{2+} ; o Mn^{2+} é importante porque substitui o Mg^{2+} em muitas reações enzimáticas, tem absorção competitiva em relação ao Cu^{2+} e Zn^{2+} além de correlações negativas com o B^+ , Ca^{2+} e positivas com o Mg^{2+} e S^+ ; o boro absorvido com H_3BO_3 e distribuído passivamente, tem correlações positivas com o Zn^{2+} , S^+ e Cu^{2+} ; e negativas com o Mg^{2+} ; o Mo^{2+} é absorvido como molibdato. É o único anion, MoO_4^{2-} , importante como constituinte das enzimas sulfatoxidase e nitrato-redutase.

Sobre os aspectos bioquímicos dos micronutrientes, GEORGE e SHERRINGTON (1984), enfatizam que pelo menos cinco dos micronutrientes são necessários para a síntese de clorofila - o Fe^{2+} é necessário para a formação do ácido lurulínico e ácido protoporfirínico, respectivamente primeiro e último precursores da clorofila; é componente das ferridoxinas transferidoras dos elétrons na fotossíntese; o Mn^{2+} é necessário para a manutenção da ultra estrutura

dos cloroplastos e dos processos fotossintéticos - a atividade do fotosistema II é proporcional ao teor de Mn^{2+} . O Mo^{2+} e Zn^{2+} são importantes na síntese de clorofila e desenvolvimento dos cloroplastos; o Cu^{2+} é constituinte da plastocianina, pigmento de transferência de elétrons.

O Cu^{2+} e Zn^{2+} são constituintes de enzimas oxidases que estão envolvidas na oxidação e hidroxilação de compostos fenólicos, do ácido abscísico e das superoxidases que decompõem radicais superóxidos tóxicos; com o Fe^{2+} e o Mo^{2-} tomam parte nas enzimas nitrogenases e nitrato redutase; o Co^{2+} é o componente metálico da vitamina B_{12} que tem relação com a síntese dos ácidos nucleicos; o Zn^{2+} de enzimas da síntese de DNA e RNA; o Mg^{2+} e o Mn^{2+} ou Co^{2+} são necessários para a ativação dessas enzimas; o B^+ é necessário à atividade meristemática, estando envolvido na síntese das bases nitrogenadas e do uracilo em particular.

Muitos micronutrientes estão envolvidos na atividade dos reguladores do crescimento, há, por exemplo, uma estreita correlação entre o teor de Zn e auxinas; o B participa da síntese de citocininas e com a sua deficiência há aumento do teor de AIA - ácido indol-3-acético; o Mn^{2+} é cofator das enzimas de oxidação do AIA; o efeito do etileno depende do seu metabolismo por uma enzima contendo átomos de Cu.

TEASDALE (1987), alerta que os meios de cultura básicos existentes têm a concentração dos micronutrientes nos limites da deficiência ou toxicidade. Esses limites podem causar estresses que induzem mudanças genéticas pela amplificação dos genes, tendo-se como resultado variação somaclonais.

Este aspecto é indesejável quando o objetivo é a manutenção de

características selecionadas, havendo, portanto, necessidade da otimização da concentração dos micronutrientes para as espécies florestais.

Com relação aos nutrientes orgânicos, é regra geral o acréscimo de uma mistura de vitaminas, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, além do mioinositol.

Não há, na realidade, evidências específicas da necessidade das plantas quanto às vitaminas nos cultivos *in vitro*. Foram considerados como essenciais apenas o mioinositol e a tiamina. As outras são adicionadas como medida de prevenção contra fatores limitantes, tendo em vista as possíveis exigências das espécies/genótipos (OZIAS-AKINS e VASIL, 1985).

O mioinositol estimula o crescimento e a morfogênese através de processos de síntese do ácido D-galacturônico, com a formação de componentes da parede celular como a pectina; participa da síntese do anti-oxidante ácido ascórbico, além das que são necessárias às divisões celulares.

Os aminoácidos, representados na maioria dos meios básicos, pela glicina, são fontes de N imediatamente disponíveis, mas não substituem as fontes inorgânicas, sendo que alguns são inibidores do crescimento, mesmo em concentrações muito baixas, como a lisina, treonina, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina. Os aminoácidos mais utilizados são a glutamina e a asparagina acrescentadas ao meio isoladamente, e preferencialmente aos íons NH_4^+ para a obtenção da organogênese direta e principalmente embriogênese somática. A utilização de fontes ricas em aminoácidos como a caseína hidrolisada é quase que uma constante no último caso e em dosagens altas - 1 g/l (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

A sacarose, usada em altas concentrações - 2% - 4%, é a fonte de energia

e C dos explantes. É mais indicada que outros mono e dissacarídeos para uso na micropropagação por ter se mostrado mais efetiva, talvez pela facilidade de transporte até as regiões meristemáticas. Ela influencia a absorção dos íons NH_4^+ e NO_3^- e aumenta o estímulo das citocininas para as divisões celulares. É necessária para a diferenciação do xilema e floema e inibe a síntese de clorofila. Juntamente com os macronutrientes, é responsável pela pressão osmótica do meio de cultura, que deve possibilitar a absorção de água e nutrientes. A pressão osmótica pode influenciar direta e proporcionalmente a taxa de divisões celulares e o grau de morfogênese (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Embora em muitos casos se dê preferência à utilização dos meios de cultura líquidos, a maioria dos pesquisadores usam para a clonagem *in vitro* os meios semisólidos, apesar do alto custo dos agentes solidificantes.

O agar, polissacarídeo de alto peso molecular é o mais popular, gelificando à temperatura ambiente, após dissolução em água a 90° C. A concentração utilizada varia em torno de 0,6% a 0,8% conforme o poder de solidificação do produto: o gel resultante retém água com força proporcional ao grau de solidificação.

Conforme PIERIK (1991), o crescimento *in vitro* pode ser afetado pela concentração e tipo de agente gelificante utilizado. Entre outras opções, cita como mais adequados, polímeros sintéticos, os biogéis (poliacrilamidas), alginatos, e o gelrite, altamente purificado, que é um polissacarídeo anionico que solidifica em presença de sais solúveis, sendo utilizado à concentração de 0,2%.

Num contexto geral, meios de culturas líquidos, ou com concentrações baixas de agar e sacarose, combinados com altas concentrações de reguladores

do crescimento, principalmente citocininas, altas temperatura, intensidades luminosas muito baixas são causa do fenômeno conhecido como vitrificação dos explantes com os brotos se tornando quebradiços, hiperhidratados e transparentes. Uma concentração mais alta de agar diminui a vitrificação, mas também torna mais difícil a absorção de água e nutrientes, além de diminuir o contato do explante com o meio.

O meio de cultura básico preparado deve ter seu pH ajustado num valor que mantenha os nutrientes em formas solúveis. Este valor está estabelecido em torno de 5,7 a 5,8. Segundo vários autores, entre os quais GEORGE e SHERRINGTON (1984); PIERIK (1987, 1991), após a esterilização do meio de cultura em autoclave, a 120° C e pressão 1,5 atmosferas, por 20 minutos, há acidificação do meio com o pH baixando para perto de 5,0. Eles recomendam o ajuste do pH a quente, para minimizar este aspecto.

O pH dentro dos limites fisiológicos, 3,5 a 8,0, tem a função de manter intactas as membranas celulares e equilibrar o pH interno das células (6,5 a 8,0); manter os nutrientes sob formas solúveis; regular a absorção dos mesmos e dos reguladores do crescimento (MINOCHA, 1987).

Ainda, conforme MINOCHA (1987), independente do seu valor inicial, 21 dias após o estabelecimento dos cultivos, o pH tende a se estabilizar entre 4,7 a 5,1; estes valores dependem da composição do meio, absorção e utilização dos nutrientes e tipo de explante/espécie. Estes últimos afetam significativamente o pH do meio de cultura pela absorção diferenciada de nutrientes e/ou fluxos de H⁺, sendo que o pH final, após um determinado tempo de cultivo, pode ser específico conforme o explante utilizado. O crescimento e a diferenciação ocorrem em uma

faixa entre os valores 3,5 a 8,0 e, na média, 5,0 ou pouco acima e abaixo, os reguladores do crescimento são absorvidos.

3.2.3.3. Reguladores de crescimento

Conforme VÁLIO (1979); PIERIK (1987); ROBERTS e HOOLEY (1988), os reguladores do crescimento são substâncias orgânicas naturais (ou artificiais) que, em concentrações baixas, promovem, inibem ou modificam qualitativamente o crescimento das plantas superiores, geralmente, em local diferente daquele onde foram produzidas.

Os reguladores do crescimento formam grupos característicos, conforme as suas atividades: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno.

Em condições ideais de cultivo, o crescimento e a morfogênese *in vitro* são determinados pela interação e balanço entre os reguladores naturais presentes, ou sintetizados pelos explantes e os adicionados aos meios de cultura. As concentrações efetivas necessitam ser verificadas experimentalmente, conforme o tipo de explante, a espécie e o objetivo proposto (PIERIK, 1991; GEORGE 1993).

As auxinas são substâncias orgânicas com estrutura e/ou atividades fisiológicas semelhantes às do ácido indol-3-acético (AIA), a auxina natural das plantas superiores. Nestas, o AIA determina, isolada ou conjuntamente com outros reguladores naturais, o crescimento celular, crescimento do caule e folhas, a dominância apical, a formação de flores femininas e crescimento das mesmas, crescimento dos frutos, a partenocarpia, a formação de raízes adventícias, a

inibição do alongamento das raízes e retardamento da abscisão foliar (VÁLIO, 1979).

Na micropropagação as auxinas são utilizadas para induzir a formação de calos e manter o seu crescimento; crescimento e morfogênese em células isoladas, calos e órgãos, em geral em combinação com citocininas. Entretanto, seus efeitos mais específicos são o estímulo da formação de raízes em brotos obtidos pela multiplicação e na indução dos embriões somáticos (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

O AIA não é muito utilizado devido à sua instabilidade, sendo decomposto pela temperatura na esterilização do meio de cultura e pela luz (PIERIK, 1991). Entretanto, tendo em vista que a atuação dessa auxina ainda não está totalmente esclarecida, ZAERR e MAPES (1985), são de opinião que a mesma deveria ser utilizada, preferencialmente, às outras.

Entre os vários compostos auxínicos sintetizados em laboratório, os mais efetivos e utilizados são os ácidos indol - 3 - butírico (AIB), α - naftalenoacético (ANA) e o 2 - 4 - diclorofenoxiacético (2-4-D). Com alta atividade auxínica, mas menos utilizados, são os ácidos 2 - naftiloxiacético (NOA), 4 - clorofenoxiacético (4-CPA), p - clorofenoxiacético (PCPA), 2 - metil - 4 - clorofenoxiacético (MCPA), 2 - 4 - 5 - triclorofenoxiacético (2-4-5 - T) e 4 - amino - 3, 5, 6 - dicloropicolínico (Picloram) (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Para a iniciação e crescimento dos calos, a auxina mais empregada é o 2-4-D. Ele é mais empregado para a indução de calos embriogênicos apesar da sua tendência para alterar a estabilidade genética das células.

As concentrações utilizadas para a indução e crescimento dos calos estão entre 0,005 a 50 μmol (PIERIK, 1991).

Para a organogênese direta ou indireta e crescimento dos brotos axilares, as auxinas, quando necessárias, são usadas em concentrações baixas em combinação com altas concentrações de citocininas (BHOJWANI e RAZDAM, 1983; GEORGE, 1993).

No enraizamento dos brotos obtidos *in vitro*, as auxinas mais efetivas são o AIB (2,5 a 15 μmol), o ANA (2,5 a 5 μmol) e AIA (0,5 a 50 μmol) (BONGA e VON ADERKAS, 1992). Esta etapa da micropropagação através dos segmentos nodais, gemas apicais e organogênese direta ou indireta, pode ser particularmente difícil para as espécies florestais, principalmente coníferas. Não sendo muito eficaz o tratamento contínuo dos brotos com auxinas, pela inclusão no meio de cultura, muitos pesquisadores optaram pelos tratamentos indutivos que consistem na permanência dos brotos por períodos curtos, em meios de cultura com concentrações altas de auxinas. RANCILLAC (1979), tratou os brotos de *Pinus pinaster* por 12 dias em meio com 10 μM de ANA; BALL (1987), de *Sequoia sempervirens*, 12 hs em meio básico com 150 $\mu\text{M/l}$ de AIB; BEKKAOUI *et al* (1983), também com *Sequoia*, tratamento dos brotos por sete dias em meio com AIA (40 μmol) ou AIB (50 μmol) ou ANA (45 μmol). Após este tratamento inicial, que se refere ao período necessário para a indução das raízes, os brotos foram transferidos para meios básicos sem reguladores, para a emergência e alongamento das raízes. Método semelhante, mas com o plantio posterior dos brotos em condições *extra-vitro*, com alta umidade relativa, foi tentado por RANCILLAC *et al* (1979): os brotos de *Pinus sylvestris* foram tratados por 24

horas em solução aquosa de AIB (265 μmol) e ANA (25 μmol).

O enraizamento *ex-vitro* ou *in vivo* também foi adotado e para os brotos de *Picea abies* e *Pseudotsuga menziesii*, o tratamento dado foi a aplicação de 500 ppm de ANA, juntamente com 500 ppm do ácido nicotínico e 50 ppm de tiamina (CHALUPA, 1977).

Outros compostos, além dos já citados, podem ter atividade auxínica induzindo a formação de raízes adventícias: floroglucinol, que também estimula a produção e o crescimento dos brotos axilares em várias plantas lenhosas; catechol, ácido clororogênico, juntamente com o ácido cumárico (GEORGE, 1993).

As citocininas são compostos orgânicos, naturais ou não, cuja atividade principal está diretamente ligada às divisões celulares.

Há, atualmente, mais de 25 compostos naturais, entre os quais a primeira citocinina conhecida (a cinetina ou 6-furfurilaminopurina), (Kin), cujas estruturas derivam da purina e que, por hidrólise, produzem adenina. Entre elas, as mais utilizadas são a zeatina (Z) ou 4-hidroxi-3-metil-trans-2-buteniaminopurina; o 2iP ou N6-(2-isopenteniladenina) ou 6-(γ - γ -dimetilalil-aminopurina) (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

Pela modificação da cadeia lateral na posição N-6 da adenina, foram produzidas muitas citocininas sintéticas, tão ou mais ativas que a cinetina. Entre estes compostos encontram-se: 6-Benzilaminopurina (6BA, BA ou BAP); 6-(benzilamino)-9-(2-tetraidropiranyl)-9-H-aminopurina (PBA), além de outras (METIVIER, 1979).

Compostos citocinínicos não relacionados com a adenina, são derivados da uréia: - difenil-uréia; N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil uréia, (2Cl-4PU); N-(2,6-dicloro-

4-piridil)-N-fenil uréia, (2,6Cl-4PU) e mais recentemente, 1-fenil-3-(1,2,3-thidiazol-5-YL)-uréia ou simplesmente thidiazuron (TDZ) (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

Além das divisões celulares, as citocininas, nas plantas intactas, atuam no crescimento e diferenciação das células, retardam a senescência, eliminam ou reduzem a dominância apical e quebram a dormência de sementes (METIVIER, 1979).

Nas culturas *in vitro*, as citocininas estimulam as divisões celulares; o desenvolvimento das gemas ou meristemas axilares pela eliminação da dominância apical; estimulam a formação de brotos adventícios (com ou sem auxinas); podem ser requeridas para a indução de embriões somáticos, em geral combinadas com o 2-4-D ou outra auxina; inibem a formação, o crescimento das raízes, assim como o efeito das auxinas na indução de raízes adventícias. Concentrações altas de citocininas continuam exercendo seus efeitos nos brotos obtidos. Por este motivo, estes brotos devem permanecer em meio básico, até o desaparecimento total dos efeitos residuais, antes da fase de enraizamento (ZAERR e MAPES, 1985; BONGA e VON ADERKAS, 1992). As mais utilizadas são: BA, K, 2iP, Z e TDZ. As concentrações requeridas dependem da espécie/explante.

De maneira similar ao tratamento dos brotos com as auxinas, os tratamentos indutivos com as citocininas podem ser mais eficazes que os tratamentos contínuos, na obtenção de brotos através das gemas ou meristemas laterais ou brotos adventícios. Para a obtenção de maior número de brotos axilares, gemas apicais de *Picea abies* (BORNMAN, 1987) e *Pinus sylvestris*, (BORNMAN, 1983), foram tratadas por duas horas em solução de 93,3 μ mol de

BA. Também com gemas apicais de *Pinus sylvestris*, ZEL *et al*, 1988, obtiveram resultados semelhantes, mas com tratamentos em soluções de BA - 8,3 μmol , por duas horas ou 33 μmol por cinco horas. Na obtenção de brotos adventícios diretamente dos explantes pode-se citar como exemplos - *Pinus strobus*, de embriões cultivados por quatro semanas em meio com 15 μmol de BA (CHESIK *et al*, 1991); *Pinus canariensis*, de embriões tratados por quatro e oito horas em solução de 75 μmol de BA (PULIDO *et al*, 1992); de *Pinus caribaea*, embriões cultivados em meio com 16,6 μmol de BA, por quatro semanas (GO *et al*, 1993).

O tratamento dos explantes de mudas jovens, antes da coleta, com altas concentrações de citocinina também é utilizado. Em *Picea abies*, a pulverização dos brotos apicais de mudas com uma solução de 933,3 μmol de BA, a cada 48 horas, cinco vezes, estimulou o desenvolvimento de maior número de brotos axilares e brotos adventícios (BORNMAN, 1987). Em 1983, o mesmo autor, já havia conseguido resultados semelhantes com *Pinus sylvestris*, mas com soluções de 93,3 μmol de BA.

Na maioria dos casos a morfogênese, tendo em vista a obtenção de brotos, não requer a participação de auxinas. Em alguns casos, a presença de outras substâncias nitrogenadas, tais como as poliaminas podem aumentar a formação dos brotos adventícios diretos como por exemplo, em discos foliares de *Betula pendula*, cultivados em meio com 50 μmol de zeatina + 94 μmol de cefotaxime e 80 μmol de putrescina (VALOBRA e JAMES, 1990).

As poliaminas são compostos orgânicos alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos, sendo derivados dos aminoácidos por descarboxilação. As mais abundantes nas plantas são a putrescina (diamino), espermidina (triamino) e

espermina (tetramino). Desempenham papel importante na germinação das sementes, crescimento das células, senescência e respostas às condições de estresses. Na micropropagação, estão relacionadas com as divisões celulares, e parecem ter efeito positivo na formação de raízes e brotos e na embriogênese somática (BAGNI e BIONDI, 1987).

Nos últimos anos, o herbicida thidiazuron, que promove a biosíntese (ou inibe o catabolismo) das citocininas endógenas e reduz o nível do ABA, nos explantes cultivados *in vitro*, vem alcançando grande destaque como citocinina bem mais potente que a BA (BONGA e VON ADERKAS, 1992). Muitos pesquisadores vêm investigando sua efetividade, com bons resultados em espécies florestais. HUETTEMAN e PREECE (1993), citam como exemplos as espécies *Robinia pseudoacacia*, *Theobroma cacao*, *Tilia cordata*, *Vitis rotundifolia*, *Larix decidua* e *Quercus robur*, nas quais o TDZ aumentou a multiplicação pelo estímulo do desenvolvimento dos brotos axilares ou formação de brotos adventícios. Para *Picea glauca*, o TDZ (0,01 μmol) com a zeatina (54 μmol), foi o melhor tratamento para a obtenção de maior número de brotos adventícios/explante, no cultivo de embriões maduros e epicótilos de mudas muito jovens (ELLIS *et al*, 1991).

Na embriogênese somática, via de regra, as citocininas são requeridas em concentrações variáveis e, algumas vezes, podem mesmo ser o único regulador necessário: cotilédones de embriões maduros de *Juglans nigra*, cultivados em meio com 5 μmol BA + 0,5 μmol AIB + 10 μmol Kin (TULECKE e McGRANAHAN, 1985); embriões imaturos de *Picea glauca*, em meio com 3,8 μmol BA + 5,5 μmol a 11 μmol 2-4-D (LU e THORPE, 1987); embriões maduros de *Picea abies*, em

meio com 5 μmol BA + 10 μmol ANA + 11 μmol 2-4-D (VERHAGEN e WANN, 1989; embriões e tecidos de folhas jovens, em meio com 10 μmol 2-4-D + 2,5 μmol Kin (KURTEN *et al*, 1990); embriões maduros de *Fraxinus americana* em meio com 11 μmol 2-4-D + 0,11 ou 1,1 μmol TDZ (BATES *et al*, 1992; cotilédones de embriões imaturos de *Juglans nigra*, em meio com 11 μmol TDZ + 1,1 μmol 2-4-D (NEUMAN *et al*, 1992); gemas apicais de indivíduos jovens de *Picea omorika*, em meio com 17 μmol BA - indução do calo, com posterior transferência para um meio com 10 μmol 2-4-D + 5 μmol BA (BUDIMIR e VUJICIC, 1992); embriões imaturos de *Prunus avium*, em meio com 20 μmol 2-4-D + 10 μmol Kin (DE MARCH *et al*, 1993); ovários não polinizados de *Cayratia japonica*, em meio com 10 μmol 2-4-D + 0,25 μmol TDZ (ZHOU *et al*, 1993); flores e anteras de *Liriodendron tulipifera* em meio com 10 μmol 2-4-D + 0,83 μmol BA (MERKLE *et al*, 1993); embriões maduros de *Cupressus sempervirens* em meio com 7,4 μmol BA + 4,4 μmol 2-4-D (LAMBARDI *et al*, 1994); cotilédones de embriões imaturos de *Acacia catechu* em meio com 15 μmol Kin + 2,5 μmol ANA (ROUT *et al*, 1995).

Descobertas, em 1926, as giberelinas são diterpenos cíclicos que possuem um esqueleto ent-giberelano. São conhecidos mais de 50 tipos de giberelinas naturais, dos quais o mais utilizado é o ácido giberélico (GA_3). Em plantas intactas causam alongamento do caule, crescimento foliar; retardam senescência; aumentam a dominância apical, induzem a diferenciação do xilema e divisões das células cambiais; floração e formação de flores masculinas e a partenocarpia; quebram a dormência de sementes (METIVIER, 1979).

Na micropropagação, o ácido giberélico não tem efeitos tão pronunciados como as auxinas e citocininas. Na cultura de calos, frequentemente produzem

efeitos semelhantes ao das auxinas, promovendo seu crescimento indiferenciado, nas concentrações de 3,3 a 26,6 μmol . Pode inibir, temporariamente, a formação de brotos adventícios e o desenvolvimento das gemas axilares. Pode ser necessário para o desenvolvimento dos embriões somáticos em algumas espécies como *Citrus* spp. É utilizado em baixas concentrações (0,1 μmol a 3,3 μmol) na cultura de meristemas, juntamente com citocininas e auxinas (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

O ácido giberélico é, frequentemente, adicionado ao meio de cultura para promover o crescimento dos brotos das espécies arbóreas frutíferas. A dormência dos brotos e aparência em roseta podem ser eliminados pela aplicação do GA_3 , cerca de 333,3 μmol . No cultivo de embriões das sementes que requerem o tratamento a frio para a germinação, este só se desenvolvem normalmente quando pré-tratados com GA_3 ou com a inclusão do mesmo no meio (GEORGE, 1993).

Calos das folhas de funcho, transferidos para um meio com GA_3 (3,3 μmol) formaram mais embriões somáticos. A inclusão do mesmo no meio de indução com o 2-4-D não surtiu efeito. A inibição na formação dos embriões somáticos imposta pela luz contínua, foi eliminada pela presença do GA_3 no meio de cultura (HUNAULT e MAATAR, 1995).

O ácido abscísico pertence ao grupo de substâncias que retardam os processos de crescimento, tais como o alongamento de raízes e caules; desenvolvimento das gemas e germinação de sementes e, por isto, são denominados inibidores do crescimento.

O ácido abscísico é um sesquiterpeno composto por 3 resíduos de isopreno

e a sua estrutura é semelhante aos anéis terminais dos carotenóides (ROBERTS e HOOLEY, 1988). Também são inibidores naturais vários compostos fenólicos como o ácido cinâmico, cumarina, ácido p-cumárico, ácido salicílico, ácido p-hidroxibenzóico, escopoletina, ácido clorogênico, ácido lunulárico.

Nas plantas intactas, os inibidores se acumulam nos órgãos sobre os quais exercem seus efeitos; não são degradados nos tecidos em repouso; são sintetizados nos tecidos verdes; inibem a germinação das sementes e o crescimento das gemas; inibem o crescimento em comprimento de caules e raízes; promovem a abscisão de folhas e frutos, estando envolvidos na senescência dos mesmos; promovem o fechamento dos estômatos (DIETRICH, 1979).

Na micropropagação das espécies florestais, o ácido abscísico tem uso destacado na embriogênese somática, para inibir a germinação precoce dos embriões obtidos, permitindo-lhes alcançar um grau maior de maturação (BONGA e VON ADERKAS, 1992). Este fato já havia sido reportado por AMMIRATO (1985), e tem sido confirmado por diversos pesquisadores:- DUNSTAN *et al* (1988), obtiveram a maturação adequada dos embriões somáticos de *Picea glauca*, em meio com 10,7 μmol e 40 μmol de ABA; TREMBLAY e TREMBLAY (1991), de *Picea mariana* e *Pinus strobus*, em meio com 6,7 μmol ABA, mas em combinação com 60 g/l de sacarose; os mesmos autores observaram que na concentração utilizada o ABA promoveu o crescimento do calo embriogênico; LELU *et al* (1993), conseguiram a maturação dos embriões somáticos de *Larix x leptoeuropaea*, em meio com 35,2 a 52,8 μmol de ABA e 10 a 20 g/l de sacarose; HRISTOFOROGLU *et al* (1993), obtiveram embriões de boa qualidade em meio

com 1,3 μmol de ABA combinado com 0,12 M de maltose; plântulas vigorosas foram obtidos desses embriões com a germinação ocorrendo em meio básico com 0,03 M de sacarose + 0,047M de maltose.

O etileno é um gás natural simples, de fórmula C_2H_4 , produzido por muitos tecidos, mais particularmente em frutos e tecidos senescentes. A produção desse gás é sempre uma reação a um stress: - fermentos, toxinas, calor, frio, desidratação e outros (DIETRICH, 1979).

Nos cultivos *in vitro*, a produção de etileno, pelos explantes, pode ser estimulada pelas auxinas, citocininas, CO_2 , Ca^{2+} e Cu^{2+} ; ou inibida por PO_4^- , Co^{2+} , Ni^{2+} , poliaminas; nos tecidos verdes é inibida pela luz.

A morfogênese pode ser estimulada - formação de brotos adventícios em cotilédones de *Pinus radiata* (5 - 8 μmol); a indução das raízes adventícias não é inibida e, muitas vezes, pode ser estimulada, mas o alongamento das mesmas pode ser coibido, com estímulo da formação das raízes secundárias (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

Nos experimentos que visam verificar a ação do etileno nos explantes, sempre se utiliza o ácido 2 - cloroetilfosfônico ou etefon, que libera etileno de maneira gradual (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

3.2.3.4. Problemas relativos aos Cultivos: - Vitrificação e Oxidação

Além da contaminação tardia, já mencionada, dois problemas podem ser encontrados no estabelecimento das cultura *in vitro*: a vitrificação e a oxidação dos

explantes.

A vitrificação é amplamente discutida por GASPAR *et al* (1987), que a definem como sendo uma desordem fisiológica que frequentemente afeta os brotos formados nas culturas *in vitro*. Tem como sinônimos: translucência, vitrescência ou malformação hiperhídrica.

DEHBERGH *et al* (1992), resumem as características que exprimem a vitrificação:- os brotos frequentemente têm aspecto vítreo, com entre-nós curtos e aspecto de roseta, com o diâmetro maior ou bem menor; as folhas são grossas, pequenas e hipertrofiadas, enrugadas ou enroladas, e quebradiça com grandes meatos no mesófilo e pouco parênquima paliçádico; epidermes anormais, com cutículas finas e em alguns casos, com muitos hidatódios; estômatos em maior ou menor número, malformados, com maior deposição de calose e não funcionais; os cloroplastos têm grana e estroma malformados e com baixo teor de clorofila; nos caules, os parênquimas cortical e medular também se hipertrofiam e apresentam grandes meatos; o sistema vascular é pouco lignificado; a conexão vascular entre caules e raízes pode ficar incompleta ou anormal. Sob os aspectos bioquímicos, as folhas dos brotos têm menor teor de lignina e celulose e a atividade de várias enzimas é deficiente; o peso seco é menor devido ao alto teor de água.

Os fatores envolvidos na vitrificação estão relacionados com o explante, o meio de cultura, o recipiente de cultivo e as condições ambientais.

Explantes mais tenros são mais suscetíveis que os mais lignificados. Dos componentes do meio de cultura, o tipo de ágar e a concentração utilizada, são as causas primárias: - menor solidificação causa a vitrificação por que facilita a absorção de água, reguladores do crescimento e dos ions Ca^{2+} , K^+ , Na^+ e Mg^{2+} .

O material utilizado para vedar os frascos de cultivo deve permitir uma boa troca gasosa.

As condições ambientais de cultivo influem indiretamente: - maiores temperaturas, implicam em menor solidificação dos meios de cultura; juntamente com a umidade relativa ambiental alta, determina maior umidade relativa - 100%, no interior dos frascos, favorecendo a vitrificação; a qualidade da luz implica, em alguns casos, em menor lignificação dos brotos: - o azul (430 nm) aumenta a lignificação, o vermelho (650 nm) causa o estiolamento devendo, portanto, haver proporções adequadas de ambos.

Brotos vitrificados têm baixas taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência no transplante para o solo. A reversão do processo é possível, corrigindo-se os fatores que o determina.

A oxidação ou escurecimento dos explantes é resultado dos altos níveis de tanino ou outros hidrofenois nos mesmos, sendo, em geral, mais característicos de tecidos mais velhos, de determinadas espécies e a estação do ano (verão). Os compostos são liberados pelos cortes dos explantes e se acumulam no meio de cultura, inibindo o crescimento, intoxicando e matando os explantes (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Entretanto, conforme BONGA e VON ADERKAS (1992), a oxidação nem sempre é negativa: nos calos subcultivados de *Larix x eurolepis*, a formação de brotos adventícios está sempre associada ao escurecimento destes calos; da mesma maneira, são formados os embriões somáticos pelos calos de *Picea abies* e *Coffea canephora*.

As oxidações, conforme GEORGE e SHERRINGTON (1984), são

consequência das enzimas oxidases contendo cobre como as polifenoloxidasas e tirosinase, liberadas no estado oxidante pelas células feridas no isolamento. Os substratos dessas enzimas variam conforme o tecido, mas, em geral, são a tirosina e o ácido clorogênico. Alguns compostos fenólicos podem ter efeito promotor na morfogênese, mas também podem ser inibidores como o ácido euconico e a tiramina. A inibição irreversível da oxidação ocorre quando os compostos fenólicos são oxidados para quinonas altamente ativas que polimerizam e/ou oxidam as proteínas para formar compostos melaninicos.

A prevenção e o controle da oxidação podem ser feitos através de:- remoção das substâncias fenólicas dos explantes, lavando-os por várias horas em água corrente; transferências frequentes dos explantes para frascos com meios de cultura novos; utilização de antioxidantes e/ou carvão ativado, no momento do isolamento ou incluindo-os no meio de cultura.

São antioxidantes, o ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína hidrocloreídrica e as poliamidas, das quais o polivinilpirrolidone (PVP) insolúvel e com alto peso molecular é o mais efetivo. O carvão ativado normalmente é usado nas concentrações de 2 a 3 g/l e os antioxidantes, 0,01% a 0,5% (10 a 500 mg/l) quando incluídos no meio de cultura.

O PVP é usado nas concentrações de 100 mg/l a 5 g/l quando incluído nos meios de cultura e 0,7% ou 7 g/l quando usado em pré-tratamento, por imersão dos explantes por 30 horas, em solução com 2% (20g/l) de sacarose.

Outros antioxidantes, como a glutaniona e o mercaptoetanol, são utilizados nas concentrações de 100 mg - 200 mg/l, tanto para os pré-tratamentos como para a inclusão nos meios de cultura.

Em geral, a conservação das culturas iniciais, logo após o isolamento, no escuro por alguns dias, diminui a liberação dos compostos fenólicos e as reações enzimáticas da oxidação (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

O carvão ativado tem sido objeto de particular interesse, uma vez que é utilizado por alguns pesquisadores como componente do meio de cultura, sem o intuito de prevenir ou diminuir os efeitos da oxidação.

Sua ação sobre a morfogênese é discutida, uma vez que ele tem alta capacidade de adsorção, tornando quase indisponíveis diversos componentes do meio de cultura, entre os quais os reguladores de crescimento, além dos compostos fenólicos causadores da oxidação.

FRIDBORG *et al* (1978), constataram que o carvão ativado adsorveu os ácidos fenilacético e os derivados do benzóico, que devem ser inibidores, permitindo a formação de embriões somáticos nas culturas de células de *Haplopappus gracilis* e *Daucus carota*.

DUMAS e MONTEUUIS (1995), verificaram que o carvão ativado (20g/l) aumentou o enraizamento dos brotos de indivíduos jovens e adultos de *Pinus pinaster*, quando incluído no meio básico para a emergência e crescimento das raízes e após o tratamento pulse com alta concentração de AIB.

DRUART e DE WULF (1993), verificaram que o carvão ativado (10g/l), presente no meio de cultura, provocou a hidrólise da sacarose (no momento da esterilização a 120 °C), 95% da qual foi desdobrada em frutose e glicose. Este desdobramento teve efeito positivo na obtenção de brotos axilares e embriões somáticos em algumas frutíferas.

EBERT *et al* (1993), estudaram o efeito do carvão ativado (2,5 g/l), sobre

a BA nas concentrações de 1,6 a 37 μmol , presentes no meio de cultura. No primeiro dia, após o preparo do meio, 50% da BA foi adsorvido. Após 10 dias, a disponibilidade dessa citocinina caiu para 0,8% a 1%.

Usada juntamente com 110 μmol de 2-4-D, a BA não reduziu a adsorção do mesmo pelo carvão ativado, mas sua disponibilidade foi aumentada em presença de 40 g/l de sacarose e na concentração de 550 μmol .

À concentração de 550 μmol , 88% do 2-4-D foi adsorvido em meio sólido, e 93% em meio líquido; à concentração de 7,3 μmol , 94% a 95% em meios sólidos ou líquidos. A disponibilidade do 2-4-D, 10 dias após o preparo do meio de cultura, ficou em torno de 2% a 4% (EBERT e TAYLOR, 1990).

3.2.3.5. Condições Ambientais de Cultivo

As condições ambientais dos cultivos estão mais ou menos padronizados para as culturas em meios sólidos.

Os fatores ambientais mais importantes são a temperatura e a luz, quanto à intensidade, fotoperíodo e qualidade.

A influência da temperatura é notável em alguns cultivos: 70% dos embriões de oliveira germinaram e cresceram a 25 °C, contra apenas 35% a 15 °C, 20 °C ou 30 °C; folhas de *Vitis vinifera*, sobreviveram a 20 - 25 °C, mas só cresceram a 29 °C (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

A temperatura ótima para a morfogênese varia conforme as espécies, mas a geralmente adotada para o período de incubação, para a maioria das espécies, é de 25 °C \pm 3 °C a 5 °C. Algumas, requerem tratamentos específicos, conforme

o estágio da micropropagação: brotos de *Pseudotsuga menziesii*, só enraizaram bem a 19 °C; a 24 °C, houve formação de muito calo com baixo índice de enraizamento. Calos de algumas espécies requerem um tratamento a frio, 4 °C, por três a seis dias antes de serem transferidos para um ambiente a 25 °C para a formação de brotos. Plantas de espécies arbóreas obtidas de brotos axilares, podem permanecer inibidos, por algum tempo, após o transplante para o solo e os de *Prunus insititia* só cresceram após dois meses de tratamento a 0 °C ou vaporização com o GA₃ (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

A maior parte dos cultivos se desenvolvem satisfatoriamente em uma larga faixa de intensidade luminosa (energia luminosa total dada aos e/ou recebida pelos explantes) e fotoperíodos, mas a iluminação fornecida pelas lâmpadas fluorescentes à intensidade de 1.000 lux, aproximadamente 15 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ e, fotoperíodos de 16 horas, parecem preencher as necessidades básicas para a morfogênese *in vitro*. Entretanto, devem ser consideradas e mantidas condições para os cultivos a intensidades maiores (5 a 10.000 lux, aproximadamente, 78,5 a 157 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) e no escuro (BHOJWANI e RAZDAM, 1985).

O crescimento dos calos indiferenciados pode ser estimulado por intensidades entre 15,7 e 78,5 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ e inibido por intensidades maiores, devido ao estímulo da síntese de inibidores do crescimento. Segmentos nodais e gemas apicais, reagem bem se mantidos nos estágios iniciais e na fase de multiplicação, sob intensidades de 4,7 e 47,1 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$; a permanência dos brotos, após enraizamento e antes do transplante, por um determinado período sob intensidades de 47,1 e 157 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, pode aumentar a sobrevivência das plântulas após o transplante, pela influência na morfologia das folhas e melhores condições

para o desenvolvimento autotrófico. Na fase de multiplicação dos brotos axilares e desenvolvimento dos brotos adventícios, também as altas intensidades luminosas foram mais favoráveis (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

Alguns pesquisadores adotam procedimentos particulares: - cultivo sob luz contínua: - DAVID *et al* (1992), obteve brotos adventícios de cotilédones e acículas de *Pinus pinaster*, e SRIVASTAVA *et al* (1985), brotos adventícios diretos de folhas jovens de *Betula pendula*; cultivos com diferentes intensidades conforme fase: - WINTON e VERHAGEN (1976), obtiveram brotos adventícios diretos de embriões de *Pseudotsuga menziesii*: - deixando os embriões uma semana no escuro e por 30 dias sob a intensidade luminosa de $31,4 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, o desenvolvimento dos brotos ocorreu sob $62,8 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$; COLEMAN e ERNST (1990), conservaram os segmentos de caule de *Populus deltoides* por 10 dias no escuro, com posterior cultivo sob $15,7 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas para o desenvolvimento dos calos organogênicos; RANDWANI e RAMAWAT (1992), obtiveram calos e brotos de hipocótilos e cotilédones de *Prosopis tamarugo*, sob $31,4 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperíodo de 16 horas; o enraizamento dos brotos obtidos ocorreu sob intensidade de $15,7 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, e mesmo fotoperíodo.

Para o enraizamento *ex vitro* de *Pinus radiata*, no inverno, BERGMANN e STOMP (1994), simularam dias longos, com a interrupção das noites por duas horas com lâmpadas incandescentes de luz rica em infravermelho, 750 nm.

Para a embriogênese somática, na grande maioria dos casos, os experimentos são instalados no escuro, até o aparecimento dos embriões somáticos nos estágios iniciais. Entretanto, experimentos bem sucedidos foram realizados na luz e com fotoperíodos longos, como os de HAKMAN *et al* (1985),

com embriões imaturos de *Picea abies*; NUUTILA *et al* (1991), com folhas jovens de *Betula pendula* (125,6 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$); KISS *et al* (1992), com gemas apicais de *Picea omorika* (5,1 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

TREMBLAY (1990), (*Picea glauca*) e TREMBLAY e TREMBLAY (1991), (*Picea mariana* e *P. rubens*) conservaram no início, as culturas embriogênicas no escuro, transferindo-as posteriormente para uma baixa intensidade luminosa, 5,1 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, quando se obteve os embriões somáticos; a fase de maturação dos mesmos, ocorreu sob intensidade de 15,7 e 94,2 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Seus resultados mostraram que a ausência da luz em todas as fases, antes da maturação aumentou o número de embriões com boas qualidades, mas na fase de maturação, diminuiu o número de embriões germinados.

Conforme BONGA (1985), a qualidade da luz influi na morfogênese. O comprimento de onda azul (450 nm) foi o melhor para a obtenção de brotos na cultura do calo de tabaco; a luz vermelha (650 nm) favoreceu a formação de brotos nos calos de *Pseudotsuga menziesii*; os raios ultravioleta (300 a 400 nm) podem ser prejudiciais aos cultivos das espécies lenhosas, porque são absorvidos pelas quinonas e flavonas da cadeia respiratória dos explantes e sua energia transferida para o DNA, possibilitando efeitos mutagênicos.

BARALDI *et al* (1988), obtiveram maior número de brotos de *Prunus insititia*, sob maiores intensidades de luz branca, azul e infravermelho. FUERKRANS *et al* (1990), verificaram que a luz azul (430 nm), na intensidade de 36 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, inibiu completamente o enraizamento dos brotos de *Prunus serotina*, que foi estimulado pelo amarelo (560 nm).

LUIR *et al* (1983), demonstraram, no cultivo *in vitro* de *Malus domestica*,

a influência da luz em base dos fitocromos: - a exposição dos explantes, por cinco minutos ao dia, ao comprimento de onda vermelho, inibiu completamente a formação de brotos; cinco minutos de exposição ao infravermelho, logo após, reverteu completamente a inibição imposta pelo vermelho.

ELLIS e WEBB (1993), num estudo sobre as condições luminosas usadas para a cultura *in vitro* das coníferas, concluíram que: - a micropropagação das coníferas é flexível quanto ao fotoperíodo, intensidade e qualidade da luz; as condições ótimas dependem da espécie e do tipo de explante e da resposta morfogênica desejada; no entanto, para a maioria dos propósitos, boas condições são dadas pela luz branca fria das lâmpadas fluorescentes às intensidades de 10 a 20 w/m² (58 e 116,18 μ E/m²/s), fotoperíodos de 16 a 24 horas, temperatura constante de 25 °C; e a otimização para um dado sistema, considerando-se inclusive as suas diferentes etapas, poderia ser pesquisada a partir deste ponto inicial.

3.3. PERDA DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO

Este é o maior problema encontrado nas espécies arbóreas: há uma perda progressiva da capacidade de regeneração dos explantes, à medida que aumenta a idade dos indivíduos.

Muitas pesquisas de micropropagação das espécies florestais tem sido feitas no sentido de solucionar este problema.

BONGA (1985); HACKETT (1987), observaram que os explantes adultos de *Eucalyptus* spp não sobreviveram muito tempo após o isolamento, isto

significando que as dificuldades têm início já no estabelecimento das culturas. Os mesmos autores citam diversas maneira de se obter explantes jovens de indivíduos adultos: - usar brotações da base dos troncos de árvores abatidas; fazer o anelamento parcial na base dos troncos e na base dos ramos mais baixos para se provocar a brotação epicórmica. Ambos e diversos outros autores, citam métodos mais demorados, denominados de "efeito cascata". Através detes métodos, faz-se enxertos sucessivos dos explantes adultos em indivíduos muito jovens, *ex* e *in vitro*, ou por estaquias sucessivas. Nas enxertias *in vitro*, as sementes dos porta-enxertos são germinadas *in vitro*, e é praticamente o meristema a ser rejuvenecido que é enxertado no ápice caulinar da plântula. Enxertias *in* e *ex vitro*, rejuvenesceram explantes de indivíduos adultos de: - *Eucalyptus camaldulensis*, *Cupresus dupreziana*, *C. sempervirens*, *Platanus acerifolia*, *Sequoiadendron giganteum*.

Conforme PIERIK (1990), a combinação dos dois processos, enxertia e estaquias *ex vitro*, proporcionou o rejuvenescimento dos explantes adultos de *Pseudotsuga menziesii*, *Platanus acerifolia*, *Pinus pinaster* e *Sequoia sempervirens*.

Para verificar o grau de rejuvenescimento obtido em *Sequoia sempervirens*, PIERIK (1991), utilizou, como marcadores, o teor e tipos de proteínas dos elementos envolvidos. As análises revelaram que ambos eram iguais nos recém-germinados e nos meristemas rejuvenescidos; diferentes, nos explantes não submetidos às enxertias. Este autor cita, ainda, outras alternativas para se obter o rejuvenescimento: - via embriogênese somática e organogênese, utilizando protoplastos obtidos de meristemas apicais, enfatizando as dificuldades

para se obter os resultados desejados. Entretanto, cita como exemplos de resultados positivos, através da organogênese: - *Betula pendula*, *Larix* spp, *Sequoia sempervirens* e *Thuja plicata*; através da embriogênese somática: - *Populus cilata*, *Prunus cerasus*, *Eucalyptus longan*, *Quercus petrae*.

O cultivo *in vitro* prolongado dos meristemas apicais de caules ou ramos dos indivíduos adultos, com repicagens frequentes para novos meios de cultura com a mesma composição inicial, rejuvenescem gradativamente estes explantes e, o grau obtido é expresso pela capacidade crescente de multiplicação, conforme BONGA e VON ADERKAS (1992). Estes efeitos foram observados em *Sequoia sempervirens*, *Betula pendula*, *Castanea sativa* e *Vitis vinifera*.

Os mesmos autores citam pré-tratamentos que melhoram a micropropagação dos explantes de indivíduos adultos: - a micropropagação do *Pinus pinaster* foi melhorada pela coleta dos explantes de estacas enraizadas, podadas, fertilizadas e tratadas com BA. Pelo mesmo método houve melhoria na micropropagação de *Pinus taeda*; a poda de estacas enraizadas de indivíduos adultos de *Quercus robur* levou à formação de novos brotos, menos lignificados e mais reativos que os obtidos sem a poda; o estiolamento dos ramos de *Castanea sativa* x *C. crenata*, de 30 anos, melhorou a multiplicação dos brotos obtidos após o estiolamento.

FRANCLET *et al* (1987), tentaram desenvolver uma metodologia para o rejuvenescimento *in vitro* dos indivíduos adultos de *Sequoia sempervirens*, como possível modelo para outras espécies, através do cultivo prolongado, de meristemas apicais de indivíduos de 500 anos, mas após o enraizamento dos brotos obtidos, verificaram que o plagiotropismo dos ramos não foi eliminado.

HACKETT e MURRAY (1993), concluíram que não há uma hierarquia rígida entre as características morfológicas nos processos da maturação das espécies florestais, e que deve haver vários eventos reguladores paralelos, um para cada característica ou eventos separados para um conjunto delas ou que talvez haja eventos em série que mudam uma característica, sendo pré-requisito de mudanças em outras. Estas conclusões foram baseadas na obtenção crescente de respostas conforme as dosagens do GA₃ aplicadas à *Hedera helix* adulta: - doses baixas suprimiram a floração; doses um pouco maiores, suprimiram a floração e induziram uma baixa capacidade de enraizamento; doses bem maiores, aumentaram a capacidade de enraizamento e a produção de antocianinas; doses muito altas, reverteram todas as características morfológicas adultas para a forma tipicamente juvenil.

Os autores localizam os sítios dos diferentes padrões de determinação e diferenciação das células, tecidos e órgãos nos meristemas apicais, uma vez que são diferentes em tamanho, configuração e atividade mitótica, nos explantes juvenis e adultos.

Conforme HACKETT (1987), a juvenilidade envolve a expressão diferenciada de partes do genoma durante o desenvolvimento e muitos produtos tipicamente juvenis foram isolados mas não identificados; há diferença na produção de enzimas: o bloqueio da síntese de antocianinas na fase adulta de *Hedera helix* é causada pela falta de transcrição do RNAm, pela dehidroquercitina - redutase.

3.4. PARTICULARIDADES MORFOLÓGICAS DAS ESPÉCIES

Este aspecto é muito importante na micropropagação de muitas coníferas e das araucariáceas em particular. Nestas, há três particularidades a serem levadas em consideração: - presença de primórdios de gemas na axila das folhas, em vez de gemas completas; plagiotropismo dos ramos e a formação das raízes adventícias a partir do calo de cicatrização das estacas e mcriestacas.

Os primórdios de gemas (preventicias, conforme FINK, 1984), do caule na ausência da gema apical, formam gemas que se desenvolvem ortotropicamente. Nos ramos, formam gemas que se desenvolvem plagiotropicamente.

As gemas axilares, propriamente ditas, são formadas pelo meristema apical do caule, a intervalos regulares. Essas gemas formam ramos plagiotrópicos, com crescimento horizontal, simetria bilateral e tempo de vida limitado; na axila das folhas, os primórdios também são plagiotrópicos. Portanto, nas espécies desta família e de algumas espécies de outras famílias de coníferas, os explantes utilizáveis ficam limitados ao ápice caulinar dos indivíduos adultos e, nos jovens, a segmentos do caule e gema apical.

Estas particularidades morfológicas são mantidas durante e após a micropropagação de: *Sequoia sempervirens* (BOULAY, 1987); *Picea abies* (BORMANN, 1987); *Pseudotsuga menziesii* (ABOEL-NIL, 1987); *Thuja heterophylla*, *Thuja plicata* e *Cunninghamia lanceolata* (BIGOT e ENGELMAN, 1987); *Araucaria cunninghamii*, *A. hustenii*, *A. araucaria*, *A. araucana*, *A. excelsa* (MAENE e DEBERGH, 1987). Entretanto, o grande número de folhas existentes no caule, indica primórdios ortotrópicos como fonte potencial de grande número

de indivíduos com as mesmas características.

Da mesma maneira que para o rejuvenescimento, o plagiotropismo pode, em algumas espécies, ser revertido através do efeito cascata. MAENE e DEBERGH (1987), obtiveram resultado parcial, com ramos de indivíduos de 20 anos de *Araucaria excelsa*. Após quatro enxertias sucessivas em mudas muito jovens, os ramos enraizados, cresceram verticalmente, mas ainda conservavam a simetria bilateral.

Conforme CHAMPAGNAT (1974), o plagiotropismo na *Araucaria angustifolia* está fortemente fixado. Nos gêneros *Picea* e *Larix* não é tão persistente e em *Pseudotsuga menziesii*, se estabelece em mudas de cinco - sete meses (BONGA, 1985).

Conforme CHAMPAGNAT (1974), a base deste problema está nas correlações entre os diversos órgãos da planta, que se estabelece, principalmente, por processos bioquímicos e suas intensidades variam entre espécies e variedades da mesma espécie, podendo afetar a capacidade de regeneração das mesmas. Ainda, conforme o mesmo autor, as correlações evoluem no tempo e no espaço, ou seja, os receptores, sob os efeitos da ação metabólica de estruturas ou órgãos doadores, são sensíveis a determinados estímulos, somente em um dado momento do seu desenvolvimento, sensibilidade esta, denominada competência.

A competência, dependendo da evolução no espaço e no tempo, ou seja, de um certo desenvolvimento ou diferenciação, condições fisiológicas e talvez genéticas, para que os receptores respondam a uma determinada influência, seja de estímulo ou de inibição, não é fácil de ser detectada.

Na maioria das coníferas, o enraizamento das estacas ocorre somente a partir de um meristema que envolve grupos de traqueídeos que se formam no calo, um processo mais difícil, determinando baixos índices de enraizamento, conforme KOMISSAROV (1969). Na *Araucaria angustifolia*, o enraizamento das estacas enquadra-se neste esquema (IRITANI *et al*, 1986).

Com a formação das raízes no calo, os brotos de *Picea sitchensis* (JOHN e WEBB, 1987) não enraizaram sob tratamentos contínuos com baixas concentrações ou com tratamentos indutivos com altas concentrações de auxinas ou modificações nas concentrações de alguns constituintes do meio de cultura. Um índice de 70% de enraizamento foi obtido quando, após a remoção do calo, os brotos foram postos a enraizar sob condições de alta umidade relativa, em areia. JELASKA (1987), obteve o enraizamento dos brotos de *Pinus pinaster* com a indução das raízes *in vitro* e com auxinas e com a emergência e crescimento das mesmas em condições *extra-vitro* em perlite ou outro substrato que permitisse um bom arejamento, inoculado com fungos micorrízicos, no caso, *Pisolithus tinctorius* ou *Hebeloma cylindrosporum*.

MEHRA-PALTA e THOMPSON (1987), obtiveram cerca de 80% de enraizamento dos brotos de *Picea mariana* e *Picea glauca*, tratando as bases dos mesmos por segundos em altas concentrações de AIB e, colocando-os para enraizar em vermiculite estéril com MS/2, sacarose e carvão ativado.

Em *Pseudotsuga menziesii*, brotos obtidos de indivíduos de três - quatro anos, enraizaram melhor quando suas bases foram tratadas com uma mistura comercial contendo AIB e colocados a enraizar em um substrato misto de turfa e perlite, a 21 °C de temperatura ambiente e 24 °C do substrato, umidade relativa

de 100%. O enraizamento teve início após seis a oito semanas e somente se completou na 20ª semana (ABOEL-NIL, 1987).

3.5. MICROPROPAGAÇÃO DAS ARAUCARIACEAE

Conforme HANDRO (1986) e MAENE e DEBERGH (1987), foi tentada a micropropagação das seguintes espécies da família Araucariaceae: - *A. angustifolia*, *A. araucaria*, *A. cunninghamia*, *A. excelsa*, *A. araucana* e *A. balansae*. A maioria não apresentou respostas específicas conforme o tratamento com reguladores do crescimento, formando calos que não sobreviveram quando sub-cultivados. Os brotos ortotrópicos obtidos não enraizaram ou apresentaram baixo índice de enraizamento. Brotos adventícios foram obtidos de hipocótilos de mudas de *A. cunninghamia* de sete dias, em meio MS/2 com 0,6 a 37,3 μmol de BA, com ótimo em torno de 0,6 a 3 μmol . Alta taxa de enraizamento, 80%, foi obtida para brotos da mesma espécie, com o tratamento inicial de duas semanas em meio com 10 μmol de AIB, e plantio posterior em condições *extra-vitro*.

A micropropagação da *A. angustifolia* foi objeto de estudo de HANDRO e FERREIRA (1980); PENCHEL e KIRBY (1986); e ZANETTE *et al* (1987). Os primeiros, obtiveram brotos ortotrópicos de segmentos de caule de mudas estioladas, que não enraizaram, mesmo após um ano em meio básico; calos de diversas consistências tendo por base diversas combinações entre auxinas e citocininas, que não sobreviveram aos primeiros sub-cultivos.

PENCHEL e KIRBY (1986), verificaram, também em segmentos de caule e gemas apicais de mudas estioladas, a influência de zeatina e do 2iP, 5 a 10

μmol , estimulando o desenvolvimento de brotos axilares em maior número de segmentos não só para *A. angustifolia* mas também para *A. heterophylla*.

ZANETTE *et al* (1987), utilizando segmentos caulinares de mudas muito jovens, não estioladas, verificaram que a glicina e o mio inositol (40 μmol ; 1.250 μmol) estimularam o desenvolvimento de maior número de brotos axilares e, principalmente, nos segmentos basais.

Recentes são os estudos realizados por GUERRA *et al* (1993), visando a indução e o estabelecimento de linhagens celulares poliembriogênicas da espécie a partir de embriões prózigóticos. O estabelecimento de linhagens poliembriogênicas estáveis foi obtido em meios secundários LP contendo 1,33 μmol e 0,66 μmol de 2-4-D, 0,31 μmol de BA e 0,21 μmol de Kin.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os aspectos e procedimentos básicos de todos os experimentos realizados foram os já estabelecidos e que são rotineiros nos laboratórios de micropropagação. Por este motivo eles estão apresentados resumidamente, destacando-se os relativos a cada etapa, conforme os objetivos propostos.

4.1. PROCEDIMENTOS E CONDIÇÕES BÁSICAS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Para o preparo dos meios de cultura, enxague de vidraria e outros utensílios lavados, utilizou-se água equivalente à duplamente filtrada e fornecida por deionizador Permution 3.500 l/h.

As esterilizações foram feitas em autoclave horizontal Fabbé, 225 litros, a 120 °C e 1,5 atmosferas. O tempo de esterilização dos frascos para os cultivos a serem utilizados ou com material a ser descartado, contaminados ou não, e placas petri e água deionizada para os isolamentos e repicagens, foi de 50 a 60 minutos e 20 minutos para os meios de cultura.

Os isolamentos e repicagens foram feitos em capela de fluxo laminar, horizontal, VECO, HLFS-18, filtros absolutos HEPA, de eficiência de 99,97% e pré-filtros sintéticos.

Para o manuseio do material biológico na capela de fluxo laminar, foram utilizados cabos de bisturi com lâminas cirúrgicas nº 11, pinças inoxidáveis de 14 e 22 cm, constantemente limpas em algodão com álcool comercial e flambadas em chama de lamparina de álcool comercial.

As pesagens dos produtos necessários ao preparo das soluções estoque dos nutrientes minerais e dos nutrientes orgânicos, vitaminas e glicina e, soluções de reguladores do crescimento, foram feitas em balança semianalítica HELMAC, HM - 100 e balança analítica BOSCH, S-2000, com precisão de 0,0001 g.

Para o preparo dos meios de cultura foram utilizadas soluções estoque preparadas conforme o estabelecido por MURASHIGUE e SKOOG, 1962, conservadas em geladeira. O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8 antes da esterilização e a quente, após a mistura dos componentes nutricionais com a solução de ágar, 6 g/l, em pH neutro Analion, HM-108, em constante agitação, em agitador magnético Micronal. A dissolução do ágar foi feita em forno microondas Sanyo 5 l.

Todos os frascos foram vedados com papel alumínio Rochedo, extra-forte.

4.2. FONTE DE EXPLANTES E PORTA-ENXERTOS.

Os explantes da araucária, para a maior parte dos experimentos, foram obtidos de mudas de dois a três meses, de pinhões adquiridos nos municípios

próximos de Curitiba, Quitandinha, São João do Triunfo e Angaí (todos no Paraná).

Os lotes adquiridos, foram retirados os menores de 4,5 cm, os que apresentavam pouco endosperma primário, os estragados e os infestados por lagartas. Os selecionados, cerca de 1/4 do total, foram lavados e após imersão em água por 12 horas e secagem de 6 a 12 horas, tratamento por uma - duas horas com a solução de Benlate, 5 g/l, foram postos para germinar embalados em polietileno grosso e escuro.

Os pinhões germinados foram plantados em embalagens plásticas, 14 x 18 cm, em terra peneirada e esterilizada ou não com brometo de metila e, em tubetes de 2,5 x 14 cm, em bandejas de isopor, cedidos pela empresa Giacomet-Marodin Indústria de Madeiras S.A..

Após o plantio, todas as mudas se desenvolveram em casa de vegetação Van der Hoeven. As coletas periódicas foram feitas conforme as necessidades de mudas de oito a 14 cm de altura, as gemas apicais perfazendo 1/3 a 1/4 da mesma.

As diferentes procedências, em geral duas a cada ano, foram devidamente anotadas e conservadas em separado.

Os explantes de indivíduos de maior idade, quatro e 16 a 25 anos, foram obtidos de ponteiros de indivíduos retirados em operações de desbastes sistemáticos de povoamentos da fazenda da empresa Giacomet-Marodin, em Quedas do Iguaçu, Paraná.

4.3. ASSEPSIA E ISOLAMENTO DOS EXPLANTES.

As mudas da araucária, para os cultivos dos segmentos caulinares, foram cortadas rentes na base, 24 a 48 horas antes dos isolamentos.

Inteiras, essas mudas foram imersas por 40 minutos em água com detergente, 2 ml/l, e lavadas em água corrente por duas horas. Após secagem por uma hora, as gemas apicais foram retiradas e os caules, com as acículas reduzidas a 1 cm, foram deixados para secar até que se verificasse uma desidratação incipiente (em geral quatro a seis horas). Das gemas foram retiradas as acículas externas mais verdes e, após lavadas em água com detergente e água corrente, secagem de uma - duas horas, colocadas em solução de Benlate, 6 g/l, por 50 minutos, juntamente com os caules, que nela permaneceram por duas horas.

Após secagem de quatro - seis horas para a melhor absorção do fungicida sistêmico, os dois tipos de material foram preparados para a assepsia final. Os caules foram cortados em três segmentos (em média 2,5 cm) e separados em erlenmeyers, identificados como basais, medianos e subapicais. Após lavados em água corrente e enxaguados com água deionizada, para a completa retirada do Benlate, foram tratados com a solução de hipoclorito de sódio, Reagen ou Synth, 5 - 6% de cloro livre, a 25% por 40 a 50 minutos.

As gemas apicais, separadas, receberam os mesmos tratamentos.

Os explantes de indivíduos de quatro e 16 a 25 anos, foram utilizados em pequenas quantidades devido ao volume e submetidos aos mesmos pré-tratamentos, utilizando-se adicionalmente soluções não esterilizadas para os pré-

tratamentos e esterilizadas para tratamentos pós isolamento, de vários fungicidas: Plantacol, Tecto, Rovral, Cercobim e Benlate.

Foram consideradas soluções de 300 mg/l do princípio ativo de cada um, respectivamente, pentacloronitrobenzeno (75%), 2,4-(tiazotil) benzinidazol (60%), isopropilcarbonil (dicloro - 3 - 5 - fenil - 3 - hidantoina (50%), 1 - 2 - (3 - metoxicarbonil - 2 - tioureido) - grupo benzinidazol (70%) e metil - 1 s-(butilcarbamoil) - 2 - benzimidazol carbamato (50%).

Para o cultivo dos embriões maduros foram utilizados, preferencialmente, pinhões retirados de pinhas recém-coletadas.

Após lavagem prévia em água com detergente e água corrente, foram retirados os envoltórios externos e as sementes, com o endosperma primário exposto, tratadas com hipoclorito de sódio, 20% por 40 - 50 minutos.

Os isolamentos dos segmentos caulinares das mudas e dos indivíduos mais velhos, após lavados por quatro a cinco vezes em água deionizada esterilizada, foram feitos pela retirada das acículas da base (1 cm), cortes das extremidades dos segmentos e das acículas necrosadas pelo cloro livre.

Das gemas, também após lavadas, foram retiradas as acículas mais externas (1/3 do tamanho inicial) e das bases (1 cm) o cortex e extremidade necrosada. Os explantes, depois de limpos, foram colocados em erlenmeyers esterilizados e, ao término, lavados com água esterilizada para a retirada dos resíduos e resina.

Os segmentos e as gemas limpos, foram inoculados no meio gelosado com a inserção das bases limpas no mesmo.

Os embriões foram retirados do endosperma primário, também após quatro

a cinco lavadas em água deionizada esterilizada, através de cortes laterais longitudinais para a separação do endosperma em duas metades.

Também neste caso, os embriões foram colocados em erlenmeyers esterilizados, para posterior retirada do amido aderido através de várias lavadas com água esterilizada. As radículas foram retiradas e os embriões inoculados em posição inclinada, com o hipocótilo inserido no meio gelosado e os cotilédones em contato com a superfície do mesmo.

4.4. MEIOS DE CULTURA BÁSICOS.

Para a maioria dos experimentos foram testados os meios de MURASHIGUE e SKOOG (1962), completo (MS), e as concentrações minerais reduzidas a 1/2, 1/3 e 1/4 (MS/2, MS/3 e MS/4); e o de BORNMAN, 1963, denominado "medium for conifer morphogenesis", MCM, (Tabela 3).

Tendo em vista o exposto por MCCOWN e SELLMER (1987) e TEASDALE (1987), sobre os possíveis efeitos das concentrações totais dos íons inorgânicos e do N, principalmente, na morfogênese, procurou-se verificar, em primeira instância, a ação dos nutrientes minerais às concentrações utilizadas no meio básico de MURASHIGUE e SKOOG, 1962, na organização e desenvolvimento dos meristemas axilares residuais do caule das mudas de dois a três meses. Para tanto, foram considerados em separado, as duas fontes de N, NH_4NO_3 (solução A; 1650 mg/l) e KNO_3 (solução B; 1900 mg/l); efeito combinados das duas fontes e da solução A com as soluções dos demais nutrientes minerais. Estes foram agrupados conforme as soluções estoque

comumente utilizadas:- solução C (H_3BO_3 , 6,20 mg; KH_2PO_4 , 170 mg; KI, 0,83 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg/l); solução D (CaCl_2 , 440 mg/l); solução E ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 370 mg/l; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15,60 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,60 mg/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg/l); solução F (FeSO_4 , 27,8 mg/l e NaEDTA, 37,30 mg/l).

Cada tratamento constou da utilização dos nutrientes conforme as soluções estoque, às concentrações indicadas para o meio de MURASHIGUE e SKOOG, 1962, adicionadas proporcionalmente a 1 l, à solução de ágar 6 g/l com 30 g/l de sacarose.

Para se evitar as aproximações dos valores decorrentes das transformações em μmol , as quantidades de nutrientes e reguladores do crescimento foram expressos em mg/l.

TABELA 3. COMPOSIÇÃO DO MEIO BÁSICO MCM, MEDIUM FOR CONIFER MORPHOGENESIS.

Composto	Concentração em mg/l
Macronutrientes	
CH ₄ N ₂ O	150,00
KNO ₃	2.000,00
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	500,00
(NH ₄) ₂ .5H ₂ O	400,00
KH ₂ PO ₄	270,00
KCl	150,00
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	250,00
Sub-Total	3.720,00
Micronutrientes	
NaFe.EDTA.2H ₂ O	37,5
H ₃ BO ₃	1,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,0
Mn.SO ₄ .H ₂ O	0,17
Na.MoO ₄ .2H ₂ O	1,25
KI	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Sub-Total	43,720
Vitaminas e Outros Compostos Orgânicos	
Mioinositol	90,00
Glicina	2,00
Tiamina - HCl	1,70
Ácido Nicotínico	0,60
Pantotenato	0,50
Piridoxina - HCl	2,50
Ácido Fólico	1,10
Biotina	0,125
Sub-Total	98,525
Total Geral	3.862,245
Sacarose = 30 g/l	Agar - 6 g/l

Foram feitos experimentos para se verificar a influência da pressão osmótica do meio MS/2, sobre a organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos. Para a elevação da pressão osmótica, acrescentou-se ao meio básico, mais 10 g/l de sacarose e 3 e 6 g/l de manitol.

4.5. REGULADORES DE CRESCIMENTO.

Para a obtenção de maior número de brotos axilares ortotrópicos foram testadas as citocininas BA, Kin, 2iP, TDZ e adenina sulfato, às concentrações de 0,08 a 1 mg/l. Para o cultivo de embriões, foram feitos testes com as mesmas citocininas nas concentrações de 2 a 10 mg/l, incluídos no meio básico (tratamentos contínuos) e de 15 a 20, 60 a 150 mg/l, para tratamentos contínuos em meio básico com carvão ativado e tratamentos indutivos em soluções sem e com carvão ativado.

Para o crescimento das gemas apicais e dos brotos dominados foram testadas duas concentrações do GA₃ (2 e 4 mg/l) em meio básico com e sem carvão ativado.

Para o enraizamento dos brotos dominantes obtidos, foram testadas as auxinas AIA, AIB e ANA, além das novas auxinas, os ácidos indol - 3 - acetil - L - aspártico, indol - 3 - acetil alanina, indol - 3 - acetil glicina e indol - 3 - fenil alanina. As concentrações utilizadas foram de 1 e 2 mg/l, para os tratamentos contínuos.

Os tratamentos indutivos ficaram restritos à utilização do AIB às concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mg/l, em meio gelosado contendo somente 30 g/l sacarose e 6 g/l de ágar. Os tempos de tratamentos testados foram de seis a 12 dias.

Os brotos utilizados nestes experimentos foram obtidos de segmentos caulinares cultivados em MS/2, sem reguladores.

4.6. PERÍODOS DE CULTIVO OU INCUBAÇÃO.

Os experimentos relativos à obtenção dos brotos axilares e das gemas de araucária tiveram a duração de 60 a 90 dias; os de enraizamento no mínimo 45 dias, além dos seis a 12 dias dos tratamentos indutivos e os 60 - 80 dias para a obtenção dos brotos axilares em MS/2. Os embriões foram cultivados também por 60 - 90 dias.

4.7. REJUVENESCIMENTO.

As gemas dos indivíduos adultos, de 16 a 25 anos, foram obtidas de ponteiros de 14 a 18 cm, fornecidos pela empresa Giacomet-Marodin Indústria de Madeiras S.A., de povoamentos instalados em Quedas do Iguaçu, Paraná.

Optou-se pelos enxertos em garfagem terminal, em mudas de 4 a 6 cm, no máximo 10 cm de altura, selecionadas pelo vigor e maiores diâmetros (0,5 a 0,6 cm).

As gemas a serem enxertadas foram retiradas dos ponteiros recebidos e apresentavam diâmetros mínimos de 1,5 cm e médios de 3 a 4 cm. As acículas externas foram retiradas em grande quantidade para a redução das gemas a um tamanho razoável e adaptável ao diâmetro das mudas.

A região basal das gemas foi cortada em cunha de 1 a 1,5 cm de comprimento por 0,5 a 0,7 cm de base, com o uso de bisturis com lâminas cirúrgicas nº 11.

As mudas foram cortadas deixando-se uma base de 2 cm, da qual foram

retiradas todas as acículas.

No corte longitudinal mediano, de 1 a 1,5 cm de comprimento feito nesta base, foi ajustada a cunha das gemas, retirando-se os excessos laterais. Devido a desproporção entre as partes adaptadas não foram observados cuidados tais como o ajuste das regiões cambiais.

Os enxertos foram protegidos por tiras de polietileno fino e flexível, assegurando-se que houvesse contacto firme entre enxerto e porta-enxerto.

As embalagens com os enxertos foram colocados em bandejas 40 x 60 x 15 cm, com água.

Foram feitos seis a oito experimentos, cada um com 150 a 200 enxertos. Os primeiros foram feitos em casa de vegetação Van der Hoeven, mas pelos problemas encontrados, os posteriores passaram para o laboratório de estaquia do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com temperaturas ambientais e umidade relativa controladas. As temperaturas ambientais ficaram em torno de 17 °C e a umidade relativa entre 70 e 80%, mantidas por um aparelho de ar condicionado Springer 30.000 BTU e pelo sistema de nebulização intermitente, utilizado para o enraizamento de estacas, funcionando a intervalos de 60 minutos, com aspersões de 15 segundos, 16 horas/dia.

Foram feitas duas tentativas de re-enxertos, mas foram encontrados problemas quanto às mudas utilizáveis ou seja com 4 a 6 cm de altura.

4.8. PARADA DE CRESCIMENTO DAS MUDAS.

Este fator revelou-se imprescindível para a eliminação da variável idade das mudas, não só para os enxertos, mas também para os experimentos de micropropagação.

Através de testes iniciais, verificou-se a viabilidade dos experimentos a 4 °C em balcões refrigeradores Engefrio com visor.

Para os experimentos foram considerados o controle à temperatura ambiente e mudas de dois tamanhos médios, 9,2 cm e 6,2 cm, colocadas em bandejas plásticas de 40 x 60 x 15 cm. Todas as mudas foram numeradas e suas alturas registradas no início do experimento.

Para os tratamentos a 4 °C foram utilizadas 250 mudas e para o controle 88.

As mudas etiquetadas foram distribuídas nas bandejas completamente ao acaso. Os balcões refrigeradores Engefrio de 1,20 x 2,00 x 1,00 m, mantiveram constante a temperatura de 4 °C \pm 1 °C.

Foram feitas duas avaliações do crescimento das que receberam o tratamento a frio, aos 85 e 185 dias após o início dos experimentos. Para as análises estatísticas foram sorteadas 88 mudas de cada tratamento.

Os experimentos foram realizados na sala 524-525 do anexo do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4.9. ARMAZENAMENTO DOS PINHÕES.

Após testes iniciais e verificação do grau de congelamento do endosperma primário e embriões de pinhões acondicionados em isopor e em embalagens de papel grosso submetidos a temperaturas de - 18 °C e 0 °C, foi adotado o armazenamento dos pinhões a - 2 °C.

Pinhões selecionados foram separados em unidades de 6 kg em embalagens triplas de papel grosso, devidamente etiquetados conforme procedência e colocados em freezer Prosdócimo, 500 l, regulado para a temperatura de - 2 °C \pm 1 °C. O período de armazenamento foi de oito meses. Foram realizados testes de germinação após 4,5, 5,5 e 6,5 meses de armazenamento.

Em cada teste foram retirados dois a três pacotes de cada procedência e após 12 horas de "descongelamento" dos pinhões à temperatura ambiente, foram retirados os poucos que se encontravam em mau estado e os restantes imersos em água por 12 horas. Após o tratamento com a solução de Benlate 5 g/l por duas horas e secagem em aberto por 12 horas, os pinhões foram embalados em polietileno grosso e escuro para a germinação.

Foram feitas duas a três verificações das sementes germinadas, aos 15, 30 e 45 dias. A cada verificação os não germinados foram rapidamente lavados e novamente embalados.

O terceiro teste foi descartado devido a problemas de manuseio que interferiram com os resultados.

As sementes germinadas foram plantadas em terra em embalagens

plásticas de 14 x 18 cm, com posterior desenvolvimento em casa de vegetação Van der Hoeven.

Parte das mesmas foi utilizada para testes de micropropagação e parte para re-enxertos.

4.10. DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS.

Os frascos com os explantes, no início dos cultivos, foram colocados em prateleiras e, para melhor controle das observações periódicas, distribuídos em linhas, por tratamento, sem enumeração das repetições e sem ordenamento numérico dos tratamentos. Vistos frontalmente, a distribuição foi a dos blocos ao acaso.

Devido ao número de variáveis analisadas, a maior parte dos experimentos foi analisada como fatoriais e, os mais simples, através dos delineamentos completamente ao acaso.

A maior parte dos resultados são apresentados através das médias dos tratamentos obtidas e seus valores transformados por Raíz Quadrada de $Y + 0,5$ ou Arc Sen da Raíz Quadrada da Porcentagem, tabelas das análises de variância e das comparações das médias dos tratamentos pelo teste de amplitude múltipla de Duncan.

Nas tabelas das análises de variância, os valores de F, assinalados por * e **, indicam diferenças significativas e altamente significativas, consideradas a 95% de probabilidade. Nas comparações das médias, pelo teste de Duncan, as médias com as indicações dos tratamentos respectivos, acompanhadas pelas

mesmas letras, não diferem estatisticamente entre si.

Devido aos problemas encontrados, relatados conforme o caso, não foram feitas as análises estatísticas de alguns experimentos e os resultados são apresentados em tabelas, conforme os valores obtidos.

4.11. ASPECTOS ANATÔMICOS.

Todo o trabalho anatômico foi realizado no Laboratório de Microtécnica do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Para o estudo da organização e desenvolvimento dos meristemas residuais axilares foram coletadas amostras dos experimentos instalados, a intervalos de três dias, num total de cinco períodos de desenvolvimento, com oito a 10 amostras para cada um deles. Para o estudo do enraizamento foram coletadas bases de brotos axilares com calo, entre o 26º e 30º dias do período de 45 dias, quando ocorre a emergência das raízes formadas.

Todo material coletado foi lavado para a retirada do meio gelosado aderido e fixados em FAA, uma solução composta por formol, ácido acético e álcool etílico a 50%, nas proporções de 5:5:90, em frascos separados e etiquetados.

Após a fixação mínima de 48 horas, todo material foi submetido ao seguinte roteiro: -

- redução de cada amostra a três - quatro segmentos longitudinais e desidratação por 24 horas em cada uma das soluções da bateria alcoólica 50 a 100% e, pelas soluções de álcool etílico e álcool butílico terciário, nas proporções de 3:1; 1:1 e 1:3, finalizando com o álcool butílico puro, com duas trocas;

- aos frascos com este último composto, à temperatura ambiente, foram acrescentadas raspas de parafina pura até a saturação, com posterior permanência em estufa a 56 °C, substituindo-se, gradativamente, a mistura parafina - álcool butílico, por parafina pura.

- permanência dos segmentos em parafina pura, a 56 °C, por cinco dias;

- inclusão dos segmentos em parafina para a microtomização: em recipientes de papel de 3 x 3 x 2 cm, devidamente etiquetados, cada segmento foi coberto por parafina líquida (70 - 80 °C); após a solidificação da mesma, cada bloco, por vez, foi lapidado para adaptação em micrótomo Ancap 781;

- na sequência da microtomização (cada corte de espessura de 10 - 11 micrômetros), oito a 15 secções de cada segmento foram distendidas em adesivo de Binseng, sobre lâminas histológicas de 1 mm de espessura, e em chapa elétrica a 50 °C; após a distensão e retirada do excesso do adesivo, todas as lâminas com os cortes foram postas para secar por 15 dias;

- antes da coloração, as lâminas foram colocadas por 30 minutos em xilol puro, para a dissolução da parafina dos cortes e, para uma hidratação parcial, passaram rapidamente pelas soluções álcool etílicos - xilol, 1:1, álcool 90%, 70% e 50%;

- a coloração foi feita através do corante misto de azul de Astra e Safranina, em soluções alcoólicas a 1%, nas proporções de 1:1, por 12 minutos; após a coloração, as lâminas passaram rapidamente, para desidratação dos cortes, na bateria do ítem anterior e na ordem inversa e, colocadas finalmente em xilol puro, onde permaneceram sem limite de tempo, até o momento da montagem das lâminas;

- a montagem das lâminas foi feita pela cobertura dos cortes com lamínulas 24 x 50 mm, fixadas com entellan.

Após secagem por 15 dias, as secções foram examinadas em microscópio ótico Nikon. Foram feitas cerca de 3.500 lâminas e os eventos mais significativos foram fotografados através dos fotomicroscópios Wild do Departamento de Botânica e Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas e Departamento de Tecnologia da Escola de Florestas, Setor de Ciências Agrárias, UFPR. Foram utilizados filmes Kodak, 35 mm, preto e branco, ASA 100.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Os resultados dos experimentos são apresentados pelas médias dos tratamentos e seus valores transformados (maioria dos casos), e pelas comparações das mesmas através do teste de amplitude múltipla de Duncan. As análises de variância respectivas encontram-se em anexo, no apêndice.

5.1. ESTABELECIMENTO DOS CULTIVOS

Estão incluídos, neste ítem os resultados relativos à assepsia dos explantes e meios de cultura básicos utilizados, efeito dos reguladores do crescimento para a obtenção de maior número de brotos axilares, crescimento dos mesmos e alongamento das gemas apicais e enraizamento dos brotos obtidos.

5.1.1. Assepsia dos Explantes

A assepsia dos explantes caulinares das mudas de dois - três meses da araucária, já se encontrava mais ou menos estabelecida com o tratamento dos segmentos do caule e das gemas apicais, com a solução 25% - 27% de NaOCl, 5 - 6% de cloro livre, por 40 - 50 minutos, pelos experimentos desenvolvidos

durante o Convênio firmado entre a Fundação de Pesquisas Florestais - UFPR e a empresa Giacommet-Marodin Indústria de Madeiras S/A. No entanto, as mudas de araucária, cultivadas em casa de vegetação ou de plantios diretos no campo, apresentavam alta taxa de contaminação tardia devido a bactérias endógenas, durante o período de incubação para a brotação e/ou nos experimentos relativos ao enraizamento dos brotos obtidos. Por este motivo, foram adotados os pré-tratamentos das mudas, parcialmente desidratadas, com o fungicida Benlate.

A influência do mesmo na descontaminação dos segmentos das mudas e na brotação pode ser vista na Tabela 4 e o de vários fungicidas nos segmentos subapicais de indivíduos de quatro anos, na Tabela 5.

TABELA 4. DESCONTAMINAÇÃO E BROTAÇÃO CONFORME TIPOS E TAMANHO DOS EXPLANTES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO MESES, PRÉ-TRATADAS POR IMERSÃO (DUAS HS) EM SOLUÇÃO DE BENLATE 2 G/L E CULTIVADOS EM MS/2 (TRÊS MESES DE CULTIVO).

Tipo Segms	Basais				Medianas				Subapicais				
	Tamanho	Nº Expl	Cont	Limp	c/brt	Nº Expl	Cont	Limp	c/brt	Nº Expl	Cont	Limp	c/brt
3cm	1	10	6	4	4	12	6	6	6	10	3	7	7
	2	10	6	4	4	12	4	6	6	10	3	8	8
	3	11	6	5	5	15	4	7	7	12	4	7	7
Total		31	18	13	13	39	14	19	19	32	10	22	22
%		100	58,3	42	42	100	35	49	49	100	31	69	69
2cm	1	12	4	6	6	12	3	10	10	10	2	8	10
	2	12	4	6	6	12	3	10	10	11	2	9	9
	3	14	5	5	5	14	2	10	10	12	3	7	7
Totais		38	13	17	17	38	8	30	30	33	7	26	26
%		100	34	45	45	100	21	79	79	100	21	79	79

MS/2 = Meio de MURASHIGUE e SKOOG, 1962, com concentração mineral reduzida à metade.

Pela Tabela 4, verificou-se que o pré-tratamento por duas horas com o fungicida Benlate, à concentração de 2 g/l, aplicados após a desidratação parcial das mudas de plantios diretos de Quedas do Iguaçu, PR (Giacomet-Marodin Indústria de Madeira S.A.), não diminuiu significativamente a capacidade de resposta dos segmentos caulinares. O maior índice de contaminação e menor índice de brotação dos segmentos basais era esperado, devido à proximidade com o solo e, ao maior grau de lignificação. Os diferentes números de repetições/tratamento teve por base as seleções das 60 mudas recebidas, antes dos pré-tratamentos, e dos explantes após a assepsia com o NaOCl.

Posteriormente, a descontaminação passou a cerca de 90%, pelo menos a inicial, com a elevação da concentração do Benlate para 6 g/l.

O princípio ativo do fungicida Benlate, metil - 1 - (butil-carbanoil) - 2 - benzimidazol, é considerado como muito eficiente no combate a fungos e mostrou ser também bactericida.

Por ser um produto sistêmico é que foi adotada a desidratação parcial das mudas (secagem à temperatura ambiente por quatro a seis horas) que deve ter proporcionado maior absorção do mesmo.

A Tabela 5, referente aos segmentos subapicais (Sa1 e Sa2, respectivamente, 4 cm e 10 cm abaixo da gema apical) de ponteiros de indivíduos de quatro anos, também recebidos dos povoamentos de Quedas do Iguaçu e de propriedade da Giacomet-Marodin Indústria de Madeira S.A., refletiu a dificuldade de manuseio destes tipos de explantes: os ponteiros apresentavam diâmetros de 2 a 3 cm, tendo sido utilizados os tamanhos médios de 2,5 - 3 cm, com as acículas reduzidas a 0,5 cm. O tamanho dos explantes implicou em grandes

volumes das soluções de descontaminação e de água deionizada esterilizada para a retirada dos resíduos de NaOCl, além das dificuldades no manuseio no isolamento devido ao maior grau de lignificação.

Os diferentes números de explantes por repetição do experimento, desta Tabela 5, também foram resultantes da eliminação dos que se encontravam em mau estado após o processo da assepsia. Foram descartados os que apresentavam suberificação parcial do córtex. O súber, tecido morto, pela presença do ar no interior das suas células e impermeabilização parcial das paredes pela presença da suberina, não foi afetado pelo tratamento com o NaOCl. Pela sua estrutura, é uma fonte maior de contaminação, pelo acúmulo de agentes contaminantes, principalmente fungos.

TABELA 5. INFLUÊNCIA DE CINCO FUNGICIDAS NA DESCONTAMINAÇÃO DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS (1 E 2) DE PONTEIROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO ANOS DE IDADE. * 1 - PRÉ-TRATAMENTO POR IMERSÃO, DUAS HORAS; ** PRÉ-TRATAMENTO + TRATAMENTO POR ISOLAMENTO POR CINCO MINUTOS.

Fungicidas	Subapicais 1 (%)				Subapicais 2 (%)			
	Nº Expl	Cont	Limpos	c/brotos	Nº Expl	Cont	Limpos	c/brotos
Controle	12	42,8	57,2	41,6	11	73,3	26,7	26,7
Cercobin 1	12	50,0	50,0	50,0	12	100,0	-	-
Cercobin 2	12	66,6	33,4	25,0	12	100,0	-	-
Rovral 1	13	50,0	50,0	50,0	13	92,8	7,1	7,1
Rovral 2	12	69,0	31,0	7,2	13	100,0	-	-
Tecto 1	14	64,2	35,8	21,5	14	57,1	42,8	28,5
Tecto 2	12	33,3	66,7	41,7	12	75,0	16,0	8,3
Benlate 1	13	54,7	45,3	38,1	13	100,0	-	-
Benlate 2	13	30,8	69,2	38,1	11	84,5	15,5	7,1
Plantacol 1	13	39,3	60,7	53,5	10	70,0	30,0	30,0
Plantacol 2	13	92,9	7,1	7,1	11	81,7	18,3	12,5

* Solução de 300 mg/l do princípio ativo.

** Solução esterilizada em autoclave, 20 minutos; 300 mg/l do princípio ativo.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostraram que os fungicidas Tecto (66%), Plantacol (61%) e o Benlate (66%), aplicados à concentração de 300 mg/l dos respectivos princípios ativos, foram os mais eficientes na descontaminação dos explantes, sem afetar muito a capacidade de brotação dos mesmos, que se verificou ser mais demorada e menor que as dos segmentos caulinares de mudas muito jovens.

Após este experimento, decidiu-se pelo uso do Benlate nos pré-tratamentos devido à sua maior disponibilidade no mercado e por ser sistêmico.

O fungicida Tecto é de custo mais elevado e o Plantacol não é sistêmico. A eficiência do Benlate e a conservação das propriedades do composto ativo, após a esterilização em autoclave (20 minutos), mostrando a sua estabilidade, foi constatado por THURSTON *et al* (1979). Conforme os autores, este fungicida estimulou o crescimento dos brotos de *Cattleya aurantiana* e *Stanhopea occulata*. Muitos autores, entre os quais GEORGE e SHERRINGTON (1984), atribuem princípio ativo deste fungicida, propriedades citocinínicas.

A inclusão deste fungicida como componente dos meios básicos não foi adotada devido ao alto teor de material inerte (50%) e pelas possíveis implicações quanto aos resultados dos experimentos.

As gemas apicais das mudas de dois - três meses e dos indivíduos de quatro anos, e 16 - 25 anos, não mostraram índices de contaminação altos, devido à retirada de 1/3, das acículas externas e do córtex e parte do cilindro central.

A assepsia dos embriões maduros da araucária revelou ser problemática quando os pinhões são conservados em embalagens impermeáveis (devido à alta taxa de transpiração) ou quando conservados em pinhas não totalmente maduras, por períodos superiores a 10 -15 dias. Após este período as pinhas se desfizeram, em parte devido à decomposição do eixo central do cone, com proliferação de bactérias e fungos. Em ambos os casos, a contaminação dos embriões deve ter ocorrido pela penetração dos agentes contaminantes no interior do endosperma primário, pela extremidade de inserção no eixo central, e da micrópila, uma vez que o óvulo é anátropo. Os tegumentos não se fundem nesta extremidade e o embrião está alojado numa canaleta central do endosperma primário, na qual foram encontrados esporos e hifas de fungos.

Iniciados em 1993, os cultivos dos embriões maduros mostraram que os melhores resultados na assepsia, como era de se esperar, foram obtidos de pinhões retirados de pinhas recém coletadas e, o manuseio dos mesmos, com a retirada dos tegumentos lignificados para maior facilidade de manuseio nos isolamentos dos embriões, feito no máximo 24 horas antes destes isolamentos.

O endosperma primário exposto, após este período, mostrou início de decomposição do amido, tornando-se pegajoso ao tato. Os pinhões sem os tegumentos foram tratados com NaOCl, 10 a 15%, por 40 - 50 minutos. Em alguns experimentos, para a redução do volume, o endosperma primário foi reduzido às proporções de retângulos de 1,5 x 1,5 cm, com a redução do tempo de tratamento do NaOCl, 10 a 15%, para 15 - 20 minutos.

Não foram apresentados valores numéricos dos resultados dos tratamentos assépticos devido as irregularidades observadas. Os melhores resultados foram obtidos em 1994, ainda assim irregulares. Em 1995, com taxas de 100% de contaminação, mesmo com pinhões recém-colhidos, não foi possível o desenvolvimento de nenhum dos experimentos em sequência aos do ano anterior. As precipitações incessantes, altas umidades relativas e temperaturas ambientais que ocorreram no verão (fevereiro - março), podem ter ocasionado a contaminação precoce dos embriões em desenvolvimento.

Os embriões mostraram alta sensibilidade aos pré e pós tratamentos (em relação ao isolamento) às concentrações mais elevadas do fungicida Benlate (6 g/l) e aos antibióticos penicilina (80 a 100.000 U), ampicilina e garamicina (50 mg/l). Concentrações menores não foram efetivas.

5.1.2. Meios Básicos

A ação dos nutrientes minerais do MS, foi considerada sob dois aspectos:- influência no número de brotos formados e crescimento dos mesmos. Os resultados são apresentados nas Tabelas 6 a 9, com as médias obtidas de 20 explantes por tratamento, com os dados transformados pela Raíz Quadrada de $Y + 0,5$.

O NH_4NO_3 , fonte de nitrogênio através dos seus íons NH_4^{2+} e NO_3^{2-} , foi focalizado de maneira particular. Sua efetividade é questionada por alguns autores, com redução da sua concentração (NITSCH, 1969, para 720 mg/l; MCCOWN e SELLMER, 1987, para 400 mg/l); substituição pelo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (de GREEF e JACOB, 1979) e desconsiderado por GAMBORG (1968). VELIKY e ROSE (1973), determinaram, para o melhor crescimento das células de *Daucus carota*, uma proporção de 80:20 dos íons NO_3^{2-} e NH_4^{2+} .

TABELA 6. INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS CONFORME O MEIO MS, NO NÚMERO DOS BROTOS FORMADOS EM EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE.

*A	B	AB	AC	AD	AE	AF	ABC	ABCD	ABCDE	ABCDEF
1,6	1,8	2,1	1,6	1,4	2,0	2,0	1,6	1,7	2,0	1,6
**1,4	1,5	1,6	1,4	1,4	1,6	1,6	1,4	1,4	1,6	1,4

* nutrientes minerais (em mg/l) do meio MS: A: NH_4NO_3 , 1650; B: KNO_3 , 1900; C: H_3BO_3 , 6,20 + KH_2PO_4 , 170 + $\text{Na}_2\text{Mo}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,025 + $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025; D: CaCl_2 , 440; E: $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 370 + $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 16,90 + $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,60 + $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025; F: FeSO_4 , 27,8 + NaEDTA, 37,30.

** dados transformados por Raíz Quadrada de $Y + 0,5$.

Pela análise de variância (Tabela 41), houve diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 95% de probabilidade. A comparação das médias pelo teste de Duncan (Tabela 7), mostrou que:

TABELA 7. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE BROTOB OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE, CONFORME OS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS.

Meios*	Média de Brotos	95%
AB	1,59	a
AE	1,59	a
ABCDE	1,57	a
AF	1,56	ab
B	1,50	ab
ABCD	1,46	ab
AC	1,44	ab
ABCDEF	1,41	ab
ABC	1,41	ab
A	1,40	ab
AD	1,37	b

* nutrientes minerais (em mg/l) do meio MS: A: NH_4NO_3 , 1650; B: KNO_3 , 1900; C: H_3BO_3 , 6,20 + KH_2PO_4 , 170 + $\text{Na}_2\text{Mo}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,025 + $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025; D: CaCl_2 , 440; E: $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 370 + $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 16,90 + $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,60 + $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025; F: FeSO_4 , 27,8 + NaEDTA, 37,30.

Portanto, a diferença significativa entre os tratamentos decorreu do menor efeito da solução A (NH_4NO_3) em combinação com a solução D (CaCl_2), que pode ter sido causado pela sensibilidade da araucária aos íons Cl^- , conforme constatado para outras espécies por MCCOWN e SELLMER (1987). O melhor desempenho na formação dos brotos foi o do efeito combinado das duas fontes de nitrogênio, comprovando a já determinada importância do teor total do N na morfogênese *in vitro*.

Pelas Tabelas 8 e 9, encontram-se os resultados relativos ao crescimento

dos brotos formados.

TABELA 8. INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS NO CRESCIMENTO (ALTURA EM CM) DOS BROTOS FORMADOS EM EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE.

*A	B	AB	AC	AD	AE	AF	ABC	ABCD	ABCDE	ABCDEF
1,1	1,9	1,4	2,1	1,8	1,8	1,3	1,4	1,2	1,7	1,1
**1,2	1,5	1,4	1,6	1,5	1,5	1,3	1,4	1,3	1,4	1,2

* nutrientes minerais (em mg/l) do meio MS: A: NH_4NO_3 , 1650; B: KNO_3 , 1900; C: H_3BO_3 , 6,20 + KH_2PO_4 , 170 + $\text{Na}_2\text{Mo}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,025 + $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025; D: CaCl_2 , 440; E: $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 370 + $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 16,90 + $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,60 + $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025; F: FeSO_4 , 27,8 + NaEDTA, 37,30.

** Dados transformados em Raíz Quadrada de $y+0,5$.

TABELA 9. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTOS AXILARES ORTOTRÓPICOS DA *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*, FORMADOS EM SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE DOIS - TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADOS CONFORME OS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS.

Meios*	Média de Brotos	95%
AC	1,62	a
AE	1,49	ab
B	1,48	ab
AD	1,47	abc
ABCDE	1,44	bc
AB	1,36	bcd
ABC	1,35	bcd
AF	1,34	bcd
ABCD	1,30	cd
A	1,24	cd
ABCDEF	1,23	d

* nutrientes minerais (em mg/l) do meio MS: A: NH_4NO_3 , 1650; B: KNO_3 , 1900; C: H_3BO_3 , 6,20 + KH_2PO_4 , 170 + $\text{Na}_2\text{Mo}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,025 + $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025; D: CaCl_2 , 440; E: $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 370 + $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 16,90 + $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,60 + $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025; F: FeSO_4 , 27,8 + NaEDTA, 37,30.

Pela análise de variância (Tabela 42) e teste de Duncan, houve diferenças significativas entre os tratamentos com melhor desempenho do NH_4NO_3 em

combinação com os micronutrientes da solução C (B, I, K, M, Co juntamente com o fosfato de K). Considerando o efeito do NH_4NO_3 isolado, 1,24 cm, comparado ao seu efeito combinado, a diferença significativa foi devido à integração com os componentes da solução C. O efeito menor de todos os nutrientes combinados, com diferenças significativas quando comparado com os apresentados pelas combinações AC, AE, AD e ABCDE, pode significar que a concentração total dos íons minerais não foi adequada para o crescimento dos brotos, ou que ocorreram reações de quelação dos íons de Fe^{2+} com outros micronutrientes (TEASDALE, 1987).

Por esta razão, dentro das devidas proporções, adotou-se o MS/2 como meio básico dos experimentos subsequentes.

Da mesma maneira, verificou-se que das duas fontes de N, o KNO_3 foi o mais eficiente para o crescimento dos brotos (solução B), que o NH_4NO_3 (solução A), embora o efeito combinado de ambos tenha proporcionado, de maneira significativa, maior número de brotos.

A atuação de alguns dos componentes orgânicos do MS, foi verificada por ZANETTE *et al* (1987), utilizando a concentração mineral do MS reduzida à metade. Foram constatadas influências significativas do mioinositol a 250 mg/l e da glicina 4 mg/l em contraposição aos usuais 100 mg/l e 2 mg/l.

Estes componentes orgânicos passaram a ser utilizados nestas concentrações, juntamente com a concentração mineral reduzida à metade.

O menor número formado pelos explantes basais, ao contrário do que foi encontrado por ZANETTE *et al* (1987), pode ter decorrido da idade das mudas, quatro meses utilizadas neste experimento, as utilizadas pelos autores foram

mudas de aproximadamente dois meses.

Nas Tabelas 10 e 11 encontram-se os resultados relativos à influência da pressão osmótica do meio MS/2 na formação dos brotos.

Mudas de quatro meses de plantios diretos de povoamentos de Quedas do Iguaçu, PR, da empresa Giacommet-Marodin Indústria de Madeiras S.A., apresentavam aspecto mais lignificado e menos suculento que as cultivadas em casa de vegetação Van der Hoeven.

Devido ao aparente menor teor de água, decidiu-se pela verificação simultânea da ação da pressão osmótica do meio básico, determinada pela sacarose 30 g/l, do meio MS e, pelo aumento da mesma pelo acréscimo de 10 g/l, e de 3 e 6 g/l de manitol. O experimento envolveu também a imersão das mudas em solução 6 g/l do fungicida Benlate, por duas horas, após desidratação parcial à temperatura ambiente (quatro a seis horas). Os resultados foram obtidos pela observação do comportamento dos três tipos de explantes caulinares possíveis de mudas muito jovens;- basais, medianos e subapicais, 12 explantes/tratamento. Média transformadas por Raíz Quadrada de $y+0.5$. As análises estatísticas não foram efetuadas pelos valores transformados.

TABELA 10. NÚMERO MÉDIO DE BROTO DOS EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO MESES DE IDADE, CONFORME POSIÇÃO NO CAULE E PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO MS/2.

Sacarose 30 g/l			Sacarose 40 g/l			Sacarose 30 + Manitol 3 g/l			Sacarose 30 + Manitol 6 g/l		
Basais	Mediana	Subap.	Basais	Mediana	Subap.	Basais	Mediana	Subap.	Basais	Mediana	Subap.
2,33	2,3	2,58	1,91	2,41	2,58	1,75	2,0	2,08	1,5	1,75	1,16
*1,58	1,65	1,65	1,48	1,69	1,71	1,44	1,55	1,6	1,28	1,42	1,22

* dados transformados pela raiz quadrada de $y + 0,5$.

TABELA 11. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS NÚMEROS DE BROTONS OBTIDOS DOS EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO MESES DE IDADE CONFORME A PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO MS/2.

Efeitos de A (osmoreguladores)		95%
Sacarose 40	1,63055	a
Sacarose 30	1,63055	a
Sacarose30 Manitol 3	1,53333	a
Sacarose 30 Manitol 6	1,31111	b
Efeito de B: (tipos de explantes)		
Medianos	1,58125	
Subapicais	1,55000	
Basais	1,44790	
Interação AB (osmoreguladores x tipos de explantes)		
Sacarose 40 Subapicais	1,71667	a
Sacarose 40 Medianos	1,69166	a
Sacarose30 Subapicais	1,65833	a
Sacarose30 Medianos	1,65000	a
Sacarose30 Manitol 3 Subapicais	1,60000	ab
Sacarose30 Basais	1,58333	ab
Sacarose30 Manitol 3 Medianos	1,55833	abc
Sacarose40 Basais	1,48333	abc
Sacarose30 Manitol 3 Basais	1,44166	abc
Sacarose30 Manitol 6 Medianos	1,42500	abc
Sacarose30 Manitol 6 Basais	1,28330	bc
Sacarose 30 Manitol 6 Subapicais	1,22500	c

Observou-se diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 43), com efeito significativo do fator A, ou seja dos componentes osmoreguladores utilizados com o meio MS/2. O melhor desempenho na formação dos brotos, foi apresentado pelo aumento da concentração de sacarose de 30 para 40 g/l, confirmando, em parte, o pressuposto teor menor de água das mudas de quatro meses. O manitol como osmoregulador às concentrações de 3 e 6 g/l, não foi muito benéfico, comparado ao controle e de modo significativo. A atuação do manitol como osmoregulador se fez notar quando comparadas as médias das

interações entre segmentos apicais (mais tenros) com a sacarose 40 g/l e o mesmo tipo de segmento com o manitol 6 g/l com o menor índice de brotação ocorrido: em concentrações mais baixas (6 g/l) que a sacarose (10 g/l) a diferença entre as médias destes dois tratamentos foi significativa a 99% de probabilidade. Embora não significativos, seus efeitos também foram negativos para os segmentos basais e medianos, mais lignificados e com menor teor de água que os subapicais.

O papel desempenhado pelo manitol, quando incorporado ao meio básico, é discutível sob o ponto de vista metabólico. TRIP *et al*, 1964, verificaram que em muitas plantas superiores, mesmo não sendo um componente natural, o manitol é metabolizado e utilizado na respiração, como no caso de *Fraxinus americana* e *Syringa vulgaris*, pela sua oxidação a frutose, via intermediários fosforilados. TEASDALE (1987), o considera como elemento causador da deficiência do B, pela sua afinidade com o mesmo.

THOMPSON e THORPE (1987), relatam que embora os efeitos de uma alta pressão osmótica afete a absorção dos nutrientes, pela modificação das propriedades das paredes celulares e alterando o balanço iônico celular, sua exata participação na morfogênese ainda não é conhecida. Consideram, aqueles autores, que o aumento da atividade das mitocôndrias isoladas, causado pelo aumento da pressão osmótica do meio e, devido ao manitol, sugere a produção de maior quantidade de energia, necessária à atividade meristemática e dos processos de diferenciação envolvidos na formação dos brotos nas culturas *in vitro*. Outro possível meio de transferência do mesmo, seria simplesmente através dos aumentos dos potenciais de pressão osmótica e de água, que sempre

ocorrem quando do desenvolvimento dos processos formativos dos brotos. Estes altos potenciais são sempre determinados pela metabolização dos carboidratos.

5.1.3. Reguladores do Crescimento e Multiplicação

Ao contrário do que foi verificado por HANDRO e FERREIRA (1980); PENCHEL (1986) e, PENCHEL e KIRBY (1986), nos testes iniciais, talvez por não terem sido estiolados, os segmentos caulinares das mudas de dois - três meses, não responderam bem às citocininas BA, K, Z, 2iP, PBA e adenina sulfato, às concentrações de 0,5 - 2 mg/l. Os segmentos apresentaram grande dilatação em diâmetro e completa inibição da brotação.

Devido às dificuldades encontradas também com o enraizamento dos brotos obtidos de segmentos cultivados em meio MS/2 básico; ao fato de ser trabalhoso e moroso, o isolamento dos segmentos; disponibilidade das mudas da mesma idade por três a quatro meses no máximo, ao ano; disponibilidade, na época, de apenas duas das citocininas citadas e, à convicção (pelos testes iniciais) de que a multiplicação deveria ser estudada com maiores detalhes e como objetivo específico, poucos experimentos foram efetuados neste sentido. Decidiu-se pelos cultivos dos segmentos caulinares, preferencialmente em meio básico somente, para os experimentos de enraizamento dos brotos obtidos. Estes resultados possibilitariam a idéia real da influência dos efeitos residuais das citocininas no enraizamento dos brotos obtidos, quando utilizadas na fase de multiplicação.

Foram testados, em experimentos maiores, os efeitos das citocininas BA,

Kin e Z às concentrações de 0,08 e 0,24 mg/l, combinadas com dois tipos de meios básicos, MS/2 e MCM, além do carvão ativado, 5 g/l. Os resultados obtidos podem ser vistos nas Tabelas 12 a 16, com a concentração das citocininas 0,08 mg/l, e Tabelas 18 a 21, para a concentração 0,24 mg/l. Para ambos os casos foram examinados o número de brotos e o crescimento dos mesmos nos próprios explantes.

TABELA 12. INFLUÊNCIA DAS CITOCININAS BA, KIN E Z, (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO ÍNDICE DE BROTAÇÃO DOS EXPLANTES SUBAPICAIS E MEDIANOS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE. (28 EXPLANTES/TRATAMENTO).

Controle		BA				K				Z					
CAO		CAS		CAO		CAS		CAO		CAS		CAO		CAS	
MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM
1,7	1,8	1,6	1,6	1,2	1,53	1,3	1,53	1,61	1,53	1,53	1,71	1,36	1,61	1,71	1,57
0,63	0,68	0,61	0,63	0,51	0,60	0,60	0,62	0,63	0,62	0,62	0,64	0,57	0,62	0,63	0,61
1,8	2,11	1,5	2,1	1,5	1,5	1,54	1,54	1,71	1,0	1,68	2,0	1,4	1,46	1,82	1,71
0,65	0,74	0,60	0,74	0,60	0,60	0,63	0,63	0,66	0,46	0,66	0,69	0,57	0,59	0,65	0,64

* dados transformados pela raiz quadrada de $y + 0,5$

Foram considerados como fatores:-

- A - citocininas (C, BA, Kin e Z)
- B - carvão ativado (0,5 g/l)
- C - meios básicos (MS/2 e MCM)
- D - tipos de segmentos (subapicais e medianos).

Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos; efeitos significativos dos fatores isolados e das interações entre os mesmos. As comparações das médias também não apresentaram diferenças significativas (Tabela 44).

TABELA 13. EFEITO DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS PELOS EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

Sem Carvão ativado								Com Carvão ativado							
Controle		BA		K		Z		Controle		BA		K		Z	
MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM
0,9	1,0	0,8	1,1	0,8	0,9	0,9	1,1	1,7	1,2	1,6	1,5	1,5	1,1	1,4	1,1

TABELA 14. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIOS MS/2 E MCM COM CARVÃO ATIVADO, 5 G/L, CITOCININAS (0,08 MG/L).

Efeito de A (carvão ativado)		95%
CA 5g/l	1,363	a
CA 0	0,904	b
Efeito de B (citocininas)		
BA	1,204	a
Controle	1,173	a
Kin	1,100	a
Z	1,058	a
Efeito de C (meios)		
MS/2	1,175	a
MCM	1,092	a
Interação AB (carvão ativado x citocininas)		95%
CA5 X BA	1,550	a
CA5 X Controle	1,413	ab
CA5 x Z	1,266	abc
CA5 x Kin	1,225	bcd
CAO x Kin	0,975	cde
CAO x Controle	0,933	de
CAO x BA	0,855	e
CAO x Z	0,850	e
Interação AC (carvão ativado x meios)		
CA5 x MS/2	1,512	a
CA5 x MCM	1,215	b
CAO x MCM	0,970	c
CAO x MS/2	0,837	c
Interação BC (citocininas x meios)		
Controle x MS/2	1,250	a
BA x MS/2	1,216	a
BA x MCM	1,191	a
Kin x MS/2	1,125	a
Z x MS/2	1,108	a
Controle x MCM	1,096	a
Kin x MCM	1,075	a
Z x MCM	1,008	a
Interação ABC (carvão ativado x citocininas x meios)		
CA5 x Controle x MS/2	1,650	a
CA5 x BA x MS/2	1,600	ab
CA5 x BA x MCM	1,500	abc
CA5 x Z x MS/2	1,450	abcd
CA5 x Kin x MS/2	1,350	abcde
CA5 x Controle x MCM	1,176	bcde
CA5 x Kin x MCM	1,100	cdef
CA5 x Z x MCM	1,083	cdef
CAO x Kin x MCM	1,050	cdef
CAO x Controle x MCM	1,016	def
CAO x Z x MCM	0,933	ef
CAO x Kin x MS/2	0,900	ef
CAO x BA x MCM	0,883	f
CAO x Controle x MS/2	0,850	f
CAO x BA x MS/2	0,833	f
CAO x Z x MS/2	0,766	f

Ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, com efeito significativo do fator A (carvão ativado, 5 g/l) e, interação significativa entre a presença de carvão ativado e os tipos de meios (AC) (Tabela 45).

A presença de carvão ativado 5 g/l pelas comparações entre as médias, demonstrou ser o elemento primordial para o crescimento dos brotos axilares, quando comparados os seus efeitos em relação ao das citocininas e tipos de meios.

O tratamento que teve menor efeito sobre o crescimento dos brotos foi da zeatina, nos meios MCM e MS/2 sem carvão ativado.

Na Tabela 15, são mostrados os resultados obtidos quanto ao crescimento dos brotos, pelo cultivo dos segmentos caulinares em meio MCM contendo as citocininas BA, Kin e Z (0,08 mg/l) e carvão ativado (5 g/l).

TABELA 15. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DA *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIO MCM COM AS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L).

Efeito do fator A (carvão ativado - 0,5 g/l)		95%
CA5	1,215	a
CAO	0,970	b
Efeito do fator B (citocininas)		
BA	1,191	a
Controle	1,096	a
Kin	1,075	a
Z	1,068	a
Interação AB (carvão ativado x citocininas)		
CA5 x BA	1,500	a
CA5 x Controle	1,176	ab
CA5 x Kin	1,100	ab
CA5 x Z	1,083	ab
CAO x Kin	1,050	b
CAO x Controle	1,016	b
CAO x Z	0,933	b
CAO x BA	0,833	b

Pela análise de variância (Tabela 46), o crescimento dos brotos foi promovido pelo carvão ativado (5 g/l).

De acordo com o efeito de A, o meio MCM com 5 g/l de carvão ativado foi mais eficiente que sem o mesmo. (interação AB). Com diferença significativa entre as médias, o melhor índice de crescimento foi proporcionado pelo MCM + carvão ativado + Benzilaminopurina, 0,08 mg/l, contra o menor, proporcionado pelo mesmo tratamento sem carvão ativado.

Os efeitos dos mesmos fatores, mas com relação ao meio MS/2, encontram-se na Tabela 16.

TABELA 16. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIO MS/2 COM AS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L).

Efeito do carvão ativado - 0,5 g/l (A)		95%
CA5	1,512	a
CAO	0,837	b
Efeito das citocininas (B)		
Controle	1,250	a
BA	1,216	a
Kin	1,125	a
Z	1,108	a
Interação AB (carvão ativado x citocininas)		
CA5 x Controle	1,650	a
CA5 x BA	1,600	a
CA5 x Z	1,450	a
CA5 x Kin	1,350	a
CAO x Kin	0,900	b
CAO x Controle	0,850	b
CAO x BA	0,830	b
CAO x Z	0,760	b

Pela análise de variância (Tabela 47), ocorreram diferenças entre os tratamentos e efeito altamente significativo do carvão ativado (5 g/l) (A).

Pela comparação das médias, além do efeito significativo do carvão ativado (5 g/l) (fator A), verificou-se, a significância das médias MS/2 com carvão ativado em relação às do MS/2 sem o mesmo (interação AB); das citocininas, 0,08 mg/l, não diferindo do MS/2 com carvão ativado. O melhor desempenho no crescimento dos brotos foi proporcionado pela 6-benzilaminopurina, com carvão ativado, diferindo significativamente, nos dois níveis de probabilidade, de todos os tratamentos do MS/2 sem carvão ativado.

Na mesma sequência de abordagem, são mostrados os resultados com uma concentração maior das mesmas citocininas (0,24 mg/l), quanto ao número de brotos obtidos e crescimento dos mesmos (Tabelas 17 a 20).

TABELA 17. EFEITO DOS MEIOS MS/2 E MCM, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO NÚMERO E CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS EM SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE. (8 EXPLANTES/TRATAMENTO).

	Sem Carvão Ativado						Com Carvão Ativado					
	BA		Z		K		BA		Z		Kin	
	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM	MS/2	MCM
NTB	11	9	14	17	15	12	15	14	13	17	13	12
NMB	5,0	4,5	7,0	8,5	7,5	6,0	7,5	7,0	6,5	8,5	6,5	6,0
AltM	2,0	1,5	1,8	0,72	1,05	1,5	1,8	1,8	2,0	1,7	2,0	2,0

NTB = Número total de brotos

NMB = Número médio de brotos

AltM = altura média (cm)

Pela análise de variância (Tabela 48), foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, com efeitos significativos do fator B (citocininas) e das interações AB e BC.

TABELA 18. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE BROTO FORMADOS EM SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIOS MS/2 E MCM, COM AS CITOCININAS BA, KIN E Z E CARVÃO ATIVADO 5 G/L.

Efeito de A (carvão ativado 5 g/l)		95%
CA5	7,000	a
CAO	6,500	a
Efeito de B (citocininas 0,24 mg/l)		
Z	7,625	a
Kin	6,500	b
BA	6,125	b
Efeito de C (meios de cultura básicos)		
MCM	6,750	a
MS/2	6,750	a
Interação AB (carvão ativado x citocininas)		
CAO x Z	7,750	a
CA5 x Z	7,500	ab
CA5 x BA	7,250	ab
CAO x Kin	6,750	ab
CA5 x Kin	6,250	bc
CAO x BA	5,000	c
Interação AC (carvão ativado x meios básicos)		
CA5 x MCM		a
CA5 x MS/2		a
CAO x MS/2		a
CAO x MCM		a
Interação BC (citocininas x meios básicos)		
MCM x Z	8,500	a
MS/2 x Kin	7,000	b
MS/2 x Z	6,750	b
MS/2 x BA	6,500	b
MCM x Kin	6,000	b
MCM x B	5,750	b
Interação ABC (carvão ativado x citocininas x meios)		
CA5 x MCM x Z	8,500	a
CAO x MCM x Z	8,500	a
CA5 x MS/2 x BA	7,500	ab
CAO x MS/2 x Kin	7,500	ab
CAO x MS/2 x Z	7,000	abc
CA5 x MCM x BA	7,000	abc
CA5 x MS/2 x Z	6,500	bc
CA5 x MS/2 x Kin	6,500	bc
CA5 x MCM x Kin	6,000	bcd
CAO x MCM x Kin	6,000	bcd
CAO x MS/2 x BA	5,500	cd
CAO x MCM x BA	4,500	d

Pela comparação das médias ficou evidente a atuação significativa da zeatina na formação de maior número de brotos (efeito de B, interação AB, interação BC, em combinação com o meio MCM, e em presença ou ausência do carvão ativado 5 g/l - interação ABC).

Pela análise de variância (Tabela 49), não foram significativas as diferenças entre os tratamentos para a formação de maior número de brotos, considerando-se o efeito de MS/2 com as citocininas BA, Kin e Z (0,24 mg/l) e carvão ativado (5 g/l).

Para as mesmas combinações, em relação ao MCM, foram significantes as diferenças entre os tratamentos (Tabela 50). Foram considerados como fatores: A - carvão ativado (5 g/l); B - citocininas (BA, Kin e Z, 0,24 mg/l). Foram significativos os efeitos de A, B e a interação AB.

A comparação das médias pelo teste de Duncan encontra-se na Tabela 19.

TABELA 19. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO NÚMERO DE BROTOS FORMADOS PELOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DAS MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE, EM MEIO MCM, COM CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L).

Efeito do carvão ativado - 5 g/l (A)		95%
CA5	7,16	a
CAO	6,33	b
Efeito das citocininas (B)		
Z	8,50	a
Kin	6,00	b
BA	5,75	b
Interação AB (carvão ativado x citocininas)		
CAO x Z	8,50	a
CA5 x Z	8,50	a
CA5 x BA	7,00	b
CA5 x Kin	6,00	b
CAO x Kin	6,00	b
CAO x BA	4,50	c

Através destas análises, confirmou-se, em particular, os resultados obtidos através do conjunto de todos os tratamentos. Na formação dos brotos, o MCM foi melhor que o MS/2, ressaltando-se neste meio, efeito significativo do carvão ativado (5 g/l), efeito altamente significativo da zeatina (0,24 mg/l) uma vez que sua atuação se fez notar apesar da presença do carvão ativado. Pela interação dos fatores AB, as diferenças significativas, a 95% de probabilidade, entre o tratamento MCM + CAS + BA 0,24 mg/l (7,0) e MCM + BA 0,24 mg/l (4,5), evidenciou e pode significar que o carvão ativado amenizou o efeito inibitório da 6 - benzilaminopurina constatada para concentrações superiores a 0,5 mg/l, nos testes iniciais.

Para o crescimento dos brotos formados (Tabela 51), não foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos; efeitos significativos do carvão ativado (5 g/l) e das citocininas BA, Kin e Z (0,24 mg/l) no crescimento dos brotos obtidos, considerando-se os meios MS/2 e MCM em conjunto, e o MS/2 isoladamente (Tabela 52). Com o meio MCM, foi significativo o efeito de A (Tabela 53). A comparação das médias encontra-se na Tabela 20.

TABELA 20. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO CRESCIMENTO DOS BROTOS OBTIDOS DE SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADOS EM MEIO MCM COM 0,24 MG/L DE BA, KIN E Z E CARVÃO ATIVADO 5 G/L.

Efeito do fator A (carvão ativado)		95%
CA5	1,816	a
CAO	1,206	b
Efeito do fator B (citocininas)		
Kin	1,675	a
BA	1,650	a
Z	1,210	a
Interação AB (carvão ativado x citocininas)		
CA5 x Kin	1,950	a
CA5 x BA	1,800	a
CA5 x Z	1,700	a
CAO x BA	1,500	a
CAO x Kin	1,400	ab
CAO x Z	0,720	b

Pela comparação das médias, constatou-se que o carvão ativado teve efeito positivo no crescimento dos brotos; das citocininas, a cinetina foi a que teve maior influência no crescimento dos brotos, não significativa, quando comparada isoladamente com o efeito das outras duas; significativo pela interação com o carvão ativado, quando comparado ao efeito dela própria em meio MCM sem carvão e, em relação à zeatina, em MCM sem carvão.

Da mesma maneira que o constatado para a 6-benzilaminopurina, o carvão ativado parece adsorver a cinetina, amenizando seu efeito negativo no crescimento dos brotos quando em meio sem carvão ativado.

Consideradas as análises estatísticas (Tabelas 17 a 20), dos efeitos dos meios básicos MS/2 e MCM, das citocininas, BA, Kin e Z a 0,24 mg/l e, do carvão ativado 5 g/l, ficaram evidentes; para a formação dos brotos: atuação significativa da zeatina, 0,24 mg/l, no meio MCM, sem carvão ativado e com carvão ativado,

5 g/l; para o crescimento dos brotos: atuação significativa do carvão ativado 5 g/l, e da cinetina 0,24 mg/l em meio MCM com 5 g/l de carvão ativado.

Confirmou-se, portanto, mais um dos aspectos básicos, ressaltado por MCCOWN e SELLMER, 1987, do efeito da composição do meio básico sobre a ação dos reguladores do crescimento.

O meio MCM, "medium for conifer morphogenesis" (Tabela 3), formulada por BORNMAN, 1981, após três anos de intensivas pesquisas na morfogênese de *Picea abies* e *Pinus sylvestris*, tem a concentração mineral total menor que o de MURASHIGUE e SKOOG, 1962, (Tabela 2), utiliza o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (400 mg/l) em vez do NH_4NO_3 (1.650 mg/l); tem adicionalmente aos componentes orgânicos do MS, pantotenato de Ca; ácido fólico e biotina, além de uma concentração 17 vezes maior de tiamina.

Conforme GEORGE (1993), o meio MS tem baixo teor de fosfato (170 mg/l), que é insuficiente para manter o crescimento de muitas culturas. É possível que este composto tenha influência na formação dos brotos pelos segmentos caulinares da *Araucaria angustifolia*.

ZANETTE *et al.* (1987), mostraram que o mioinositol e a glicina utilizados em quantidades maiores que os usuais 100 mg/l e 2 mg/l, aumentaram significativamente o número de brotos formados pelos segmentos caulinares da espécie.

Estes aspectos finais, poderão ser o ponto de partida para o estudo mais específico, como objetivo maior, da multiplicação da araucária, através dos segmentos caulinares, propostos nas consideração iniciais.

Outro aspecto importante a ser considerado é o método de aplicação das

citocininas, com o objetivo de se obter brotos múltiplos.

Entre os métodos utilizados, já são conhecidos os tratamentos indutivos (tratamento "pulse"), dos explantes com altas concentrações de citocininas. Com os mesmos, BORMMAN (1983 e 1987), obteve brotos múltiplos de *Pinus sylvestris* e *Picea abies*, e ZEL *et al.* (1988) também de *Pinus sylvestris*. Contudo, GEORGE (1993), apesar de recomendá-lo, alerta contra os perigos de uma super exposição dos explantes aos reguladores.

A multiplicação da araucária com a obtenção de brotos múltiplos a partir dos meristemas axilares dos caules das mudas de dois a três meses de idade, será objeto de estudos específicos em projeto de pesquisa, apoiado financeiramente pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

A Figura 1 mostra um segmento caulinar de dois meses de idade, com 90 dias de cultivo, com um broto dominante e dois dominados.

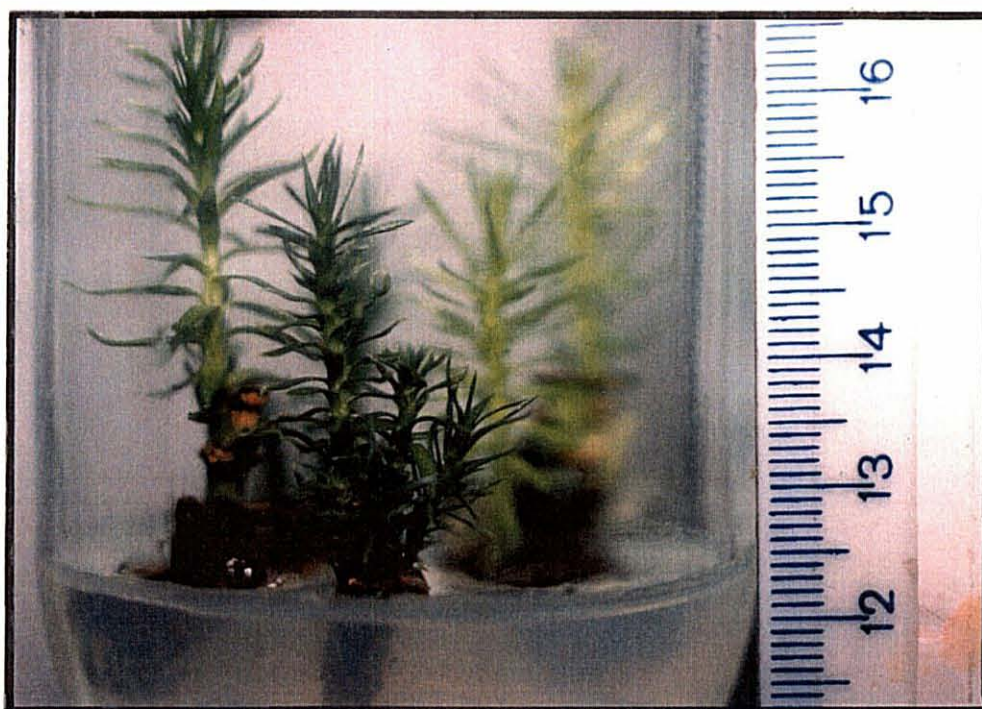


FIGURA 1. SEGMENTO CAULINAR DE UMA MUDA DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS 2 MESES DE IDADE, CULTIVADO EM MS/2 AOS 90 DIAS, COM UM BROTO DOMINANTE E DOIS DOMINADOS.

5.1.4. Reguladores do Crescimento e Gemas Apicais

Este aspecto foi desenvolvido com o objetivo de se obter o crescimento das gemas apicais das mudas e dos brotos obtidos *in vitro*, para a manutenção de fontes de segmentos caulinares para subcultivos sucessivos. Os resultados obtidos são apresentados através das Tabelas 21 a 28.

TABELA 21. SOBREVIVÊNCIA (S) E ALONGAMENTO (A) DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS - TRÊS MESES EM MS/2, SEM E COM CARVÃO ATIVADO (10 g/L), GA₃ (2 mg/L), BA (0,1 e 0,2 mg/L), AIB (3 e 6 mg/L). 20 EXPLANTES/TRATAMENTO. ALTURA EM CM.

Trat	Cont		GA ₃ (1)		BO.1 (2)		BO.2 (3)		AIB3 (4)		AIB6 (5)		12	
	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10
S	5,0	4,25	5,0	5,0	3,25	3,5	5,0	4,25	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,5
A	0	2,5	0,5	3,75	0,29	2,25	0	2,0	1,5	2,0	2,0	2,75	0	3,0

Trat	13		14		15		124		125		134		135	
	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10	CAO	CA10
S	2,75	4,25	3,5	3,75	5,0	5,0	5,0	4,25	4,75	4,0	4,25	4,5	4,0	4,5
A	0	2,75	0	1,5	0	1,5	0	2,0	0	2,5	0	2,5	0	3,25

Foram considerados como fatores:-

A:- Reguladores do crescimento:

MS/2 - controle

(1) GA₃ 2 mg/l

(2) BA 0,1 mg/l

(3) BA 0,2 mg/l

(4) AIB 3 mg/l

(5) AIB 6 mg/l

(12) GA₃ 2 mg/l + BA 0,1 mg/l

(13) GA₃ 2 mg/l + BA 0,2 mg/l

(14) GA₃ 2 mg/l + AIB 3 mg/l

(15) GA₃ 2 mg/l + AIB 6 mg/l

(124) GA₃ 2 mg/l + BA 0,1 mg/l + AIB 3 mg/l

(125) GA₃ 2 mg/l + BA 0,1 mg/l + AIB 6 mg/l

(134) GA₃ 2 mg/l + BA 0,2 mg/l + AIB 3 mg/l

(135) GA₃ 2 mg/l + BA 0,2 mg/l + AIB 3 mg/l.

B:- Carvão ativado: - 0 e 10 g/l.

Pela análise de variância da sobrevivência das gemas (Tabela 54), constatou-se diferenças significativas entre os tratamentos devidas ao fator A.

A comparação das médias (Tabelas 22) evidenciaram que:-

TABELA 22. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE SOBREVIVÊNCIA DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE DOIS-TRÊS MESES DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*, CULTIVADAS EM MS/2, COM E SEM CARVÃO ATIVADO (10 G/L), GA₃ (2 MG/L), BA (0,1 E 0,2 MG/L) E AIB (3 E 6 MG/L) (EFEITOS DE A E B).

Efeito de A (reguladores de crescimento)		95%
15	5,000	a
AIB6	5,000	a
AIB3	5,000	a
G3 2mg	5,000	a
12	4,750	ab
124	4,625	ab
BO.2	4,625	ab
Controle	4,625	ab
125	4,375	abc
135	4,250	bcd
134	4,250	bcd
13	3,875	cde
14	3,625	de
BO.1	3,500	e
Efeito de B (carvão ativado)		
CAO	4,535	a
CA10	4,392	a
Interação AB (reguladores X carvão ativado)		
BO.2 x CAO	5,00	a
GA3 2 x CAO	5,00	a
Controle X CAO	5,00	a
12 CAO	5,00	a
AIB6 x CA10	5,00	a
AIB6 x CAO	5,00	a
AIB3 x CA10	5,00	a
124 x CAO	5,00	a
15 x CA10	5,00	a
15 x CAO	5,00	a
AIB3 x CAO	5,00	a
GA3 2 x CA10	5,00	a
125 x CAO	4,75	ab
135 x CA10	4,50	ab
12 x CA10	4,50	ab
BO.2 x CA10	4,25	abc
134 x CA10	4,25	abc
134 x CAO	4,25	abc
13 CA10	4,25	abc
124 x CA10	4,25	abc
Controle x CA10	4,25	abc
135 x CAO	4,00	abc
125 x CA10	4,00	bc
14 x CA10	3,75	bc
14 x CAO	3,50	c
13 x CAO	3,50	c
BO.1 x CA10	3,50	c
BO.1 x CAO	3,50	c

O efeito significativo de A ocorreu devido aos menores resultados dados pelos tratamentos 13 (MS/2 + GA₃ 2 mg/l + BA 0,2 mg/l), 14 (MS/2 + GA₃ 2 mg/l + AIB 3 mg/l) e 2 (MS/2 + BA 0,1 mg/l).

Dos meios de cultura utilizados, foram mais adequados à sobrevivência das gemas: MS/2 + GA₃ 2 mg/l + AIB 6 mg/l; MS/2 + AIB 6 mg/l; MS/2 + AIB 3 mg/l; MS/2 + GA₃ 2 mg/l.

As diferenças significativas devido à interação AB, foram determinadas pelos piores desempenhos dos tratamentos:-

MS/2 + GA₃ 2 mg/l + AIB 3 mg/l, com e sem carvão ativado, 10 g/l; MS/2 + GA₃ 2 mg/l + BA 0,2 mg/l; sem carvão ativado; MS/2 + BA 0,1 mg/l com e sem carvão ativado 10 g/l.

No que se refere ao alongamento das gemas apicais, foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos: efeito significativo do carvão ativado (B), e das interações do mesmo com os meios de cultura (AB) (Tabela 55).

Nas Tabelas 23 são apresentados os resultados obtidos pela comparação das médias.

Dos reguladores utilizados, foi mais atuante no alongamento das gemas apicais, o ácido giberélico, 2 mg/l; seguido do ácido indol-3-butírico, 3 mg/l e combinação entre o ácido giberélico, 6-benzilaminopurina, 0,2 mg/l e ácido indol-3-butírico, 6 mg/l; ácido giberélico, 2 mg/l com 6-benzilaminopurina, 0,1 mg/l. Foi significativo o efeito do carvão ativado (10 g/l).

TABELA 23. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MÊSES DE IDADE, CULTIVADAS EM MS/2, COM E SEM CARVÃO ATIVADO (10 g/L), GA₃ (2 mg/L), BA (0,1 E 0,2 mg/L) E AIB (3 E 6 mg/L). (EFEITOS DE A E B).

Efeito de A (reguladores)		95%
GA ₃ 2 mg	2,125	a
135	1,625	ab
AIB 3 mg	1,625	ab
12	1,500	abc
15	1,375	bcd
AIB 6 mg	1,375	bcd
13	1,375	bcd
134	1,250	bcd
125	1,250	bcd
Controle	1,250	bcd
BO. 1	1,250	bcd
124	1,000	bcd
BO.2	0,875	cd
14	0,750	d
Efeito de B (carvão ativado 0 e 10 g/l).		
CA0	2,500	a
CA10	0,160	b
Interação AB		
		95%
GA3 2 x CA10	3,75	a
135 x CA10	3,25	ab
12 x CA10	3,00	abc
13 x CA10	2,75	bc
15 x CA10	2,75	bc
AIB 6 x CA10	2,75	bc
125 x CA10	2,50	bcd
134 x CA10	2,50	bcd
Controle x CA10	2,50	bcd
BO.1 x CA10	2,25	bcde
124 x CA10	2,00	cde
AIB 3 x CA10	1,75	de
BO.2 CA10	1,75	de
AIB3 x CAO	1,50	f
14 x CA10	1,50	f
GA3 2 x CAO	0,50	f
BO.1 x CAO	0,25	f
135 x CAO	0	f
134 x CAO	0	f
125	0	f
124	0	f
15	0	f
14	0	f
13	0	f
12	0	f
AIB 6	0	f
BO.2	0	f
Controle x CAO	0	f

Portanto, verificou-se que a presença do carvão ativado é imprescindível no estímulo do crescimento das gemas apicais de araucárias de dois - três meses. A atuação do ácido giberélico, 2 mg/l, apesar de discutível, mostrou ser significativa, quando comparada a sua média, em presença do carvão ativado 10 mg/l (3,75 cm), com as médias do controle com carvão (2,5 cm) e sem carvão (0,5 cm).

Considerou-se discutível a sua atuação, devido a dois aspectos: sua decomposição na esterilização do meio de cultura em autoclave, ou seja, ele é termoinstável e, possibilidade da sua adsorção pelo carvão ativado, como constatado para alguns reguladores do crescimento (EBERT e TAYLOR, 1990; EBERT *et al*, 1993). Usualmente o ácido giberélico é acrescentado ao meio de cultura, através de ultra-filtração, o que não foi o caso neste experimento. Entretanto, neste caso, o ácido giberélico, 2 mg/l, pode ter atuado em concentrações mínimas, entre 0,02 e 0,2 mg/l.

Na seqüência, foi feito novo experimento, com o intuito de se verificar novamente a atuação do ácido giberélico (incluído no meio de cultura, esterilizado a 120 °C, 20 minutos) e carvão ativado, 5 g/l, nos meios básicos MS/2 e MCM. Os resultados encontram-se na Tabela 24.

TABELA 24. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA BÁSICO (MS/2 E MCM), ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE. (25 EXPLANTES/TRATAMENTO; ALTURA EM CM).

MS/2		MCM	
CA5	CA5 + GA ₃ 2	CA5	CA5 + GA ₃ 2
4,94	4,50	4,10	4,04

Pela análise de variância (Tabela 56) foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos. Não foi significativa a ação do ácido giberélico 2 mg/l, mas foi significativa a atuação do MS/2 em relação ao MCM, como pode se verificar pela Tabela 25 e 26.

TABELA 25. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE NO MEIOS MS/2 E MCM, COM CARVÃO ATIVADO (5 g/L) E GA₃ (2 mg/L).

Efeito de A (meios básicos)		95%
MS/2	4,72	a
MCM	4,07	b
Efeito de B (carvão ativado 5 g/l)		
CA5 + GA3 0	4,52	a
CA5 + GA3 2	4,27	a
Efeito de AB (meios x carvão ativado)		
MS/2 x CA5	4,94	a
MS/2 x CA5 x GA3 2	4,50	ab
MCM CA5	4,10	b
MCM x CA5 x GA3 2	4,04	b

TABELA 26. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES EM MEIO MS/2, COM CARVÃO ATIVADO (5 g/L) E GA₃ (2 mg/L).

MS/2 CA5	4,94	a
MS/2 CA5 + GA3 2	4,50	b

O alongamento das gemas apicais foi significativamente maior no MS/2 + carvão ativado, 5 g/l, do que no mesmo meio com 2 mg/l de ácido giberélico, com 95% de probabilidade. As análises de variância dos efeitos do meio MS/2 e MCM encontram-se nas Tabelas 57 e 58.

A Figura 2 ilustra os resultados obtidos com os experimentos de alongamento e a Figura 3, a possibilidade de multiplicação das gemas alongadas.



FIGURA 2. GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADAS EM MS/2 + 10 G/L DE CARVÃO ATIVADO. 60 DIAS DE CULTIVO.



FIGURA 3. GEMAS APICAIS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, COM BROTOS AXILARES, DEVIDO À DESTRUIÇÃO DO MERISTEMA APICAL. 90 DIAS DE CULTIVO.

As gemas apicais dos indivíduos mais velhos de araucária, somente foram isoladas em pequenas quantidades e pelos poucos experimentos realizados foram constatados os seguintes aspectos:- 1º - As gemas apicais dos indivíduos de quatro - oito anos de idade, sobreviveram bem em meio MS/2 sem carvão ativado, mas permanecem inertes por longo tempo; a manifestação máxima obtida foi a abertura das mesmas, em função de um pequeno alongamento. Há formação de calo friável em grande quantidade em suas bases. Repicadas para novo meio básico, com a retirada do calo e mais acículas externas para exposição de nova superfície de contacto com o meio de cultivo, estas gemas, responderam com um novo surto de atividade do meristema apical com o conseqüente alongamento das novas regiões formadas, formando-se um broto apical de proporções menores, perfeitamente distinguível das acículas maiores da base da gema; 2º - As gemas apicais de indivíduos de 16 - 25 anos, apresentaram maior taxa de contaminação, ou seja, são mais difíceis de serem descontaminadas e apresentam problemas de oxidação que ocasionam alta taxa de mortalidade nos cultivos *in vitro*, quando inoculadas em meio MS e MS/2.

Obteve-se melhor sobrevivência e redução da oxidação em meio MS/5. Não se obteve respostas de alongamento com a repicagem, mas nas gemas que perderam o meristema apical por necrose natural, em função do cultivo, ocorreu o desenvolvimento de alguns brotos axilares, na base onde as acículas foram cortadas rentes ao córtex.

5.1.5. Reguladores de Crescimento e Brotos Dominados

Nos segmentos caulinares das mudas de dois-três meses, cultivados *in vitro*, notou-se que os brotos formados no apice (um a dois em média) dominam os que se formam mais abaixo (também um a dois em média). Os superiores se alongam no próprio explante, em 60 dias, atingindo 3 a 4 cm de altura. Os dominados não crescem, mesmo quando repicados para um meio básico, refletindo a inibição imposta pelos brotos superiores, mesmo em suas ausências. Em outras palavras, há um efeito residual da dominância dos superiores que impede o crescimento dos brotos formados mais abaixo, quando separados do explante e repicados para novos meios básicos.

Procurou-se, em vista do comportamento das gemas apicais em presença do carvão ativado, verificar se este último poderia eliminar o efeito residual da dominância nos brotos não desenvolvidos dos segmentos cultivados. Os resultados encontram-se nas Tabelas 27 e 28.

TABELA 27. EFEITOS DO CARVÃO ATIVADO (10 g/L) E DO ÁCIDO GIBERÉLICO (2 mg/L) EM MEIO MS/2 NO CRESCIMENTO DOS BROTOS DOMINADOS DOS SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE. (ALT. EM CM; DADOS TRANSFORMADOS POR RAÍZ QUADRADA DE $Y+0,5$).

Controle	MS/2	
	Carvão Ativado	Carvão Ativado + GA ₃
*0	1,5	1,6
**0,7	1,3	1,4

* Média de 12 explantes

** dados transformados $\sqrt{y+0,5}$

Ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, pela análise de variância dos efeitos do carvão ativado (10 g/l) e ácido giberélico (2 mg/l) em meios MS/2 no crescimento dos brotos dominados formados nos segmentos caulinares de mudas de dois-três meses (Tabelas 59 e 60).

Não foram significativas as diferenças devidas à presença do ácido giberélico.

A comparação das médias de crescimento dos brotos devido à presença do carvão ativado e GA₃ encontra-se na Tabela 28.

TABELA 28. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DOS BROTOS DOMINADOS FORMADOS POR SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, CULTIVADOS EM MEIO MS/2, COM CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E GA₃ (2 MG/L).

Carvão ativado + GA ₃	1,4	a
Carvão ativado	1,3	a
Controle	0,7	b

Pelos experimentos com as gemas apicais e os brotos dominados, ficou evidente que o carvão ativado estimula o alongamento, que deve ocorrer pelo crescimento das células, mais do que pela formação de novas células. A gema apical da araucária é composta de inúmeros nós de distribuição alterno-espinalada, dispostos de maneira compacta. Sua ação pode ter ocorrido pelo desdobramento da sacarose em frutose e glicose, aumentando a disponibilidade do substrato energético imediato, conforme verificado por DRUART e DE WULF (1993), para frutíferas e/ou adsorção de compostos inibidores liberados pelos brotos, conforme constatado por FRIDBORG *et al* (1978).

As mesmas considerações são válidas para o carvão ativado; no estímulo

do alongamento das gemas apicais.

5.1.6. Enraizamento dos Brotos Obtidos

Pelas Tabelas 29 a 32, verificou-se que houve uma evolução na determinação do método mais adequado para o enraizamento dos brotos axilares, obtidos de segmentos caulinares cultivados em meio básico somente (MS/2) sem reguladores do crescimento.

Os resultados retratam os resultados dos experimentos realizados nos anos 1991-2 a 1994-5.

O enraizamento *in vitro* dos brotos obtidos, através dos tratamentos contínuos com a inclusão do AIB (1 e 2 mg/l) ao meio básico, MS/2 e MS/4, não foi efetivo. Ocorreram variações de 0% a 40%-50%, mostrando uma dependência quase que total da capacidade de enraizamento conforme a capacidade individual. A Tabela 29 ilustra os resultados de um desses experimentos.

A Tabela 30, mostra os resultados dos primeiros testes realizados com os tratamentos indutivos, com várias concentrações de AIB (2, 4, 6, 8 e 10 mg/l) com período de indução de sete dias para todas as concentrações utilizadas. Constatou-se que a concentração de AIB (10 mg/l) foi a mais promissora, com os maiores índices de enraizamento (36,6% e 18,8%).

Desdobraram-se, no experimento seguinte, os tratamentos indutivos em duas concentrações 6 e 12 mg/l e dois períodos de indução (6 e 12 dias) com o objetivo de se verificar o efeito de uma concentração menor por período de indução maior e o vice-versa.

TABELA 29. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DOS BROTOS AXILARES DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS CONTÍNUOS COM AIB (1 E 2 MG/L). PERÍODOS DE ENRAIZAMENTO = 45 DIAS. R = 45 BROTOS/TRATAMENTO (270).

M.C.		MS/2						MCM					
Proc		SJ		ES		C.T.		SJ		ES		C.T.	
AIB	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%	
1	03	6,6	07	15,5	-	-	-	-	02	4,4	-	-	
2	02	4,4	05	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Total	05	5,5	12	13,3	-	-	-	-	02	2,2	-	-	

SJ=São João do Triunfo; ES=Espirito Santo, PR; C.T.=Campo do Tenente, PR

TABELA 30. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DOS BROTOS AXILARES DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS INDUTIVOS COM AIB (MG/L). MEIO DE ENRAIZAMENTO: MS/2. PERÍODO DE ENRAIZAMENTO = 45 DIAS. R = 30 BROTOS/TRATAMENTO (450).

Proc	SJ		ES		C.T.		Totais	
AIB	E	%	E	%	E	%	E	%
2	-	-	02	6,6	-	-	02	2,2
4	01	3,3	01	3,3	-	-	02	2,2
6	05	16,6	03	10,0	-	-	08	8,9
8	04	13,3	07	23,3	-	-	11	12,2
10	05	16,6	11	36,6	01	3,3	17	18,8
Totais	15	12,0	24	20,0	01	0,6	40	0,8

SJ=São João do Triunfo; ES=Espirito Santo, PR; C.T.=Campo do Tenente, PR

TABELA 31. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DOS BROTOS AXILARES DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS INDUTIVOS COM AIB (6 E 12 MG/L). MEIO DE ENRAIZAMENTO: MS/2 E MS/4. PERÍODO DE ENRAIZAMENTO = 45 DIAS. R = 15 BROTOS/TRATAMENTO (120).

Meio Cult		MS/2				MS/4				Totais	
Procedência		SJ		ES		SJ		ES			
AIB	T.Trt	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%
6	6 dias	02	13,3	06	40,0	04	26,6	01	6,6	13	21,6
	12 dias	05	33,3	-	-	05	33,3	01	6,6	11	18,3
Total		07	23,3	06	20,0	09	30,0	02	6,6	24	20,0
12	6 dias	03	20,0	07	46,6	06	40,0	03	20,0	19	31,6
	12 dias	-	-	01	6,6	05	33,3	01	6,6	08	13,3
Totais		03	10,0	08	26,6	11	36,6	04	13,3	27	22,5

Pela Tabela 31, verificou-se que os dois tipos de tratamentos pareceram ser equivalentes, com período de indução de seis dias em 12 mg/l de AIB, apresentando índices de enraizamento de até 46,6% e o de 6 mg/l por 12 dias, 33%.

A Tabela 32 mostra os resultados de um experimento maior, abrangendo brotos axilares de três tipos de segmentos caulinares (basais, medianos e subapicais) e gemas apicais de mudas de duas diferentes procedências (Espírito Santo, Município de Quitandinha, Paraná, e Angai, Município de Teixeira Soares, Paraná).

TABELA 32. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTOS AXILARES DE TRÊS TIPOS DE EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE. TRATAMENTOS INDUTIVOS: 6 E 12 MG/L AIB; 6 E 12 DIAS. MEIOS DE ENRAIZAMENTO MS/2 E MS/4, EM DUAS FASES A SUPERIOR COM VERMICULITA. R = 15 BROTOS/TRAT. (TOTAL 840).

	Procedências			Esp.Santo	Angaí	Total	
	AIB	Dias	Meios	Enraizamentos (%)		Méd. %	
Brotos de Seg. Basais	6 mg	6	MS/2	40	-	20	
			MS/4	27	-	13,3	
	12 mg	12	MS/2	46,6	53,3	50,0	
			MS/4	53,3	6,6	30,0	
		12	MS/2	6,6	-	3,3	
			MS/4	66,6	-	33,3	
	12 mg	12	MS/2	66,6	20,0	43,3	
			MS/4	73,3	26,6	50,0	
Brotos de Seg. Medianos		6 mg	6	MS/2	-	46,6	23,0
				MS/4	53,3	46,6	50,0
	12 mg	12	MS/2	53,3	60,0	56,6	
			MS/4	60,0	66,6	63,3	
		12	MS/2	60,0	53,3	56,6	
			MS/4	60,0	53,3	56,6	
	12 mg	12	MS/2	66,6	80,0	73,3	
			MS/4	40,0	60,0	50,0	
Brotos de Seg. Subapical		6 mg	6	MS/2	-	-	-
				MS/4	-	6,6	3,3
	12 mg	12	MS/2	6,6	60,0	33,3	
			MS/4	66,6	66,6	66,6	
		12	MS/2	-	6,6	3,3	
			MS/4	-	40,0	23,3	
	12 mg	12	MS/2	-	66,6	33,3	
			MS/4	26,6	60,0	43,3	
Gemmas alongada		6 mg	12	MS/2	53,3	66,6	60,0
				MS/4	20,0	66,6	43,3
	12 mg	12	MS/2	26,6	73,3	50,0	
			MS/4	66,6	53,3	60,0	

Nos tratamentos indutivos o estímulo foi dado em meio gelosado, contendo somente sacarose (30 g/l) e o AIB. A emergência das raízes ocorreu

em meio MS/2 ou MS/4.

Em todos os experimentos com o MS/2 ou MS/4, verificou-se a formação excessiva de calos friáveis. Uma vez que nas estacas de ramos de araucária, de quatro anos, observou-se que as raízes adventícias se formam no calo basal compacto (IRITANI *et al*, 1986), cogitou-se a possibilidade de que um meio de cultura básico, que proporcionasse maior arejamento para as base dos brotos, levaria à redução da friabilidade e do excesso de formação do calo nas mesmas, permitindo um maior índice de enraizamento.

Por este motivo, sobre a base já solidificada do MS/2 ou MS/4 com 6 g/l de ágar (1 cm) em capela de fluxo laminar, foi colocada uma outra camada constituída de vermiculita esterilizada em mistura com MS/2 ou MS/4 com 4,5 g de ágar. Os brotos, após o tratamento de indução, foram inoculados com as bases inseridas nesta mistura.

Embora não se tenha comprovação estatística, os resultados da Tabela 32, mostraram que o pressuposto procedeu, assim como a constatação anterior quanto à efetividade dos tratamentos pulse com 6 e 12 mg/l.

Os traços, na Tabela 32, referem-se mais a parcelas perdidas (85%) do que ausência de enraizamento, razão porque não foi feita a análise estatística dos dados. Comprovou-se, portanto, para a araucária, a eficácia dos tratamentos indutivos, de acordo com os verificados por RANCILLAC (1979), para brotos axilares de *Pinus sylvestris* e BEKKAOUI *et al* (1983) e BALL (1987), para brotos de *Sequoia sempervirens*, DUMAS e MONTEUUIS (1995), para *Pinus pinaster*.

As Figuras 4 a 10 mostram os resultados dos experimentos realizados.



FIGURA 4. BROTOS AXILARES DOMINANTES, OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, EM MEIO MS/2, APÓS TRATAMENTO INDUTIVO COM AIB, 6 MG/L, 12 DIAS. NOTE FORMAÇÃO EXCESSIVA DE CALO.



FIGURA 5. BROTOS AXILARES DOMINANTES, OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADES, EM MEIO MS/2, EM DUAS FASES (A SUPERIOR COM VERMICULITA), PARA ENRAIZAMENTO APÓS TRATAMENTO INDUTIVO COM AIB, 12 MG/L, 6 DIAS. NOTE AUSÊNCIA DE CALO EXCESSIVO.



FIGURA 6. BROTOS AXILARES DOMINANTES OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, ENRAIZADOS EM MEIO MS/2, EM DUAS FASES (A SUPERIOR COM ALGODÃO PICADO), APÓS TRATAMENTO INDUTIVO, 6 MG/L AIB, 12 DIAS. NOTE AUSÊNCIA DE CALO EXCESSIVO.



FIGURA 7. BROTOS AXILARES DOMINANTES OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, ENRAIZADOS EM MEIO MS/2, EM DUAS FASES (A SUPERIOR COM ALGODÃO PICADO), APÓS TRATAMENTO INDUTIVO, 6 MG/L AIB, 12 DIAS. NOTE AUSÊNCIA DE CALO EXCESSIVO.



FIGURA 8. BROTOS DOMINANTES OBTIDOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, ENRAIZADOS APÓS TRATAMENTO INDUTIVO, UM ANO APÓS ENRAIZAMENTO.



FIGURA 9. PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE.



FIGURA 10. PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, UM ANO APÓS O TRANSPLANTE.

5.2. CULTIVO DOS EMBRIÕES DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*

Os melhores resultados obtidos com o cultivo de embriões maduros da espécie se encontram nas Tabelas 33 a 37. Não foram feitas as análises estatísticas destes experimentos devido ao baixos índices de multiplicação dos meristemas apicais verificados. Este foi o principal objetivo dos cultivos. Acredita-se que foram esgotadas as possibilidades com a utilização da citocinina 6-benzilaminopurina, como pode se verificar pelas tabelas. As outras citocininas mencionadas, 2iP, Kin, PBA, apresentaram resultados semelhantes. Com a zeatina, não foram feitos os tratamentos pulse com altas concentrações, devido ao seu alto custo, 1g, US\$ 1.000,00, mais despesas de importação que duplicam

o seu preço.

Verificou-se que, ao contrário de outras espécies de coníferas, os embriões maduros da araucária não têm competência para a organogênese direta ou indireta, considerando-se cotilédones e hipocótilo, em função dos tratamentos dados.

É provável que respostas mais promissoras possam ser obtidas mediante a utilização da zeatina, tendo por base os resultados verificados com os segmentos caulinares, através dos quais a sensibilidade da espécie a este regulador ficou significativamente evidenciada.

Outro aspecto a ser verificado, seria a utilização de embriões jovens.

A embriogênese somática da espécie está sendo tentada por GUERRA *et al* (1993), desde 1991, através de pró-embriões de pinhas nos estágios iniciais de desenvolvimento.

TABELA 33. EFEITO DO MEIO MS E DIFERENTES TIPOS DE TRATAMENTOS NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*. 40 DIAS DE CULTIVO.

Tratamento	Cotilédones vivos		Desenv. Merist. Apical		Multiplic. Merist. Apical	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Controle(MS)	21	88,0	-	-	-	-
MS+BA9	07	29,1	-	-	-	-
MS+CA 10g/l + BA9	24	100,0	17	70,8	-	-
25 BA 1h + MS	14	58,3	03	12,5	-	-
60 BA 1h + MS	08	33,3	-	-	-	-

MS = Meio de MURASHIGUE e SKOOG, 1962

BA9 = Benzilaminopurina - 9 mg/l; CA = Carvão Ativado

25 BA e 60 BA = Benzilaminopurina 25 e 60 mg/l, em solução para tratamento indutivo de 1 hora.

TABELA 34. EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS COM BENZILAMINOPURINA 9 E 18 MG/L, NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*. 40 DIAS DE CULTIVO. R = 24 EMBRIÕES/TRATAMENTO (144). MEIO DE CULTURA = MS/2.

Tratamento	Cotilédones Vivos		Desenv. Meristema Apical		Multipl. Merist. Apical	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
BA9 1 h	-	-	02	8,3	-	-
BA9 2 h	-	-	05	21,0	-	-
BA9 3 h	-	-	02	8,3	-	-
BA18 1 h	-	-	06	25,0	1 triplo	4,1
BA18 2 h	-	-	01	4,1	1 triplo	4,1
BA18 3 h	-	-	06	25,0	1 triplo	4,1

TABELA 35. EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS COM BENZILAMINOPURINA 9 E 18 MG/L, NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*. 40 DIAS DE CULTIVO. R = 24 EMBRIÕES/TRATAMENTO (144). MEIO DE CULTURA = MS/2.

Tratamentos		Cotilédones Vivos		Desenv. Merist. Apical		Multipl. Merist. Apical	
BA	M.C.	Nº	%	Nº	%	Nº	%
	MS/2	-	-	06	25,0	-	-
25 2h	MS/3	-	-	04	16,6	-	-
	MS/4	-	-	08	33,3	1 duplo	4,1
60 2 h	MS/2	-	-	11	45,8	-	-
	MS/3	-	-	09	37,5	-	-
	MS/4	-	-	12	50,0	-	-
Meios básicos com 16 g/l amido solúvel.							
25 2 h	MS/2	-	-	08	33,3	-	-
	MS/3	-	-	19	79,1	-	-
	MS/4	-	-	19	79,1	-	-
60 2 h	MS/2	-	-	19	79,1	2 triplos	8,2
	MS/3	-	-	07	29,1	2 duplos	8,2
	MS/4	-	-	11	45,8	-	-

MS/2; MS/3 e MS/4 = Meio de MURASHIGUE e SKOOG, 1962, com concentração mineral reduzida à 1/2, 1/3 e 1/4, respectivamente.

BA = Benzilaminopurina = 25 mg/l e 60 mg/l; solução para tratamento dos embriões, duas horas.

TABELA 36. EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS, BA (60 MG/L), UMA HORA E TRINTA MINUTOS E TRÊS HORAS NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*, CULTIVADOS EM DIVERSOS TIPOS DE MEIOS BÁSICOS. 40 DIAS DE CULTIVO. R = 12 EMBRIÕES/TRATAMENTO. (360).

TP	Meios de Cultura			Cotilédones Vivos		Desenv. Merist. Apical		Mult. Merist. Apical	
	M.C.	CA	BA	Nº	%	Nº	%	Nº	%
60 BA 1,5 hs	MS	-	-	01	8,3	-	-	-	-
	MS	10	-	01	8,3	03	25,0	-	-
	MS	10	2	-	-	-	-	-	-
	MS	10	3	02	16,6	02	16,6	-	-
	MS	10	4	04	33,3	04	33,3	1 duplo	8,3
	MS/2	-	-	01	8,3	03	25,0	-	-
	MS/2	10	-	01	8,3	06	50,0	brot. ax.	8,3
	MS/2	10	2	03	25,0	04	33,3	1 duplo	8,3
	MS/2	10	3	03	25,0	04	33,3	-	-
	MS/2	10	4	03	25,0	07	58,0	-	-
	MS/3	-	-	01	8,3	03	25,0	-	-
	MS/3	10	-	01	8,3	03	25,0	-	-
	MS/3	10	2	-	-	03	25,0	1 duplo	8,3
	MS/3	10	3	01	8,3	03	42,0	-	-
	MS/3	10	4	02	16,6	03	42,0	-	-
60 BA 3 hs	MS	-	-	-	-	02	16,6	-	-
	MS	10	-	-	-	04	25,0	-	-
	MS	10	2	-	-	01	8,3	-	-
	MS	10	3	-	-	01	8,3	-	-
	MS	10	4	-	-	-	-	-	-
	MS/2	-	-	03	25,0	03	25,0	-	-
	MS/2	10	-	03	25,0	04	33,3	-	-
	MS/2	10	2	03	25,0	06	50,0	-	-
	MS/2	10	3	-	-	03	25,0	3 duplos	25,0
	MS/2	10	4	01	8,3	11	92,0	1 duplo	8,3
	MS/3	-	-	01	8,3	02	16,6	-	-
	MS/3	10	-	02	16,6	05	42,0	-	-
	MS/3	10	2	02	16,6	06	50,0	-	-
	MS/3	10	3	-	-	04	33,3	-	-
	MS/3	10	4	03	25,0	08	66,7	-	-

TABELA 37. EFEITO DOS TRATAMENTOS INDUTIVOS, BA (120 MG/L) E 10 G/L DE CARVÃO ATIVADO (CA) NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES MADUROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*, CULTIVADOS EM DIVERSOS TIPOS DE MEIOS BÁSICOS. 40 DIAS DE CULTIVO. R = 12 EMBRIÕES/TRATAMENTO. (360).

TP	Meios de Cultura			Cotilédones Vivos		Desenv. Merist. Apical		Mult. Merist. Apical	
	M.C.	CA	BAP	Nº	%	Nº	%	Nº	%
120 BA + CA 1,5 hs	MS	-	-	01	8,3	-	-	-	-
	MS	10	-	01	8,3	01	8,3	-	-
	MS	10	2	-	-	-	-	-	-
	MS	10	3	-	-	-	-	-	-
	MS	10	4	01	8,3	-	-	-	-
	MS/2	-	-	03	25,0	04	33,0	-	-
	MS/2	10	-	02	16,6	03	25,0	-	-
	MS/2	10	2	-	-	01	8,3	-	-
	MS/2	10	3	-	-	02	16,6	-	-
	MS/2	10	4	-	-	-	-	-	-
	MS/3	-	-	02	16,6	07	58,0	-	-
	MS/3	10	-	01	8,3	03	25,0	-	-
	MS/3	10	2	-	-	-	-	-	-
	MS/3	10	3	03	25,0	03	25,0	-	-
MS/3	10	4	-	-	01	8,3	-	-	
120 BA + CA 3 hs	MS	-	-	01	8,3	-	-	-	-
	MS	10	-	-	-	-	-	-	-
	MS	10	2	-	-	-	-	-	-
	MS	10	3	01	8,3	01	8,3	-	-
	MS	10	4	01	8,3	01	8,3	-	-
	MS/2	-	-	04	33,3	06	50,0	-	-
	MS/2	10	-	06	50,0	06	50,0	-	-
	MS/2	10	2	03	25,0	08	66,6	-	-
	MS/2	10	3	01	8,3	03	25,0	1 duplo	8,3
	MS/2	10	4	02	16,6	07	58,3	-	-
	MS/3	-	-	03	25,0	07	58,3	-	-
	MS/3	10	-	02	16,6	05	41,6	-	-
	MS/3	10	2	03	25,0	08	66,6	-	-
	MS/3	10	3	01	8,3	01	8,3	1 D.B.ax	8,3
MS/3	10	4	06	50,0	07	58,3	-	-	

TP = Tratamento pulse; M.C. = Concentração Mineral; CA = Carvão ativado; BA = Benzilaminopurina.
DBax = Desenvolvimento de brotos axilares.

As Figuras 11 a 13 mostram a multiplicação dos meristemas apicais dos embriões maduros e a possibilidade da eliminação da dominância apical através dos tratamentos citocinínicos, permitindo o desenvolvimento dos brotos axilares.



FIGURA 11. BROTOS OBTIDOS POR MULTIPLICAÇÃO DO MERISTEMA APICAL DE EMBRIÕES MADUROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*. TRATAMENTO: BA 18 MG/L, TRATAMENTO INDUTIVO, DUAS HORAS.



FIGURA 12. BROTOS OBTIDOS POR MULTIPLICAÇÃO DO MERISTEMA APICAL DE EMBRIÕES MADUROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*. TRATAMENTO: BA 18 MG/L, TRATAMENTO INDUTIVO, DUAS HORAS. BROTO DUPLICADO.

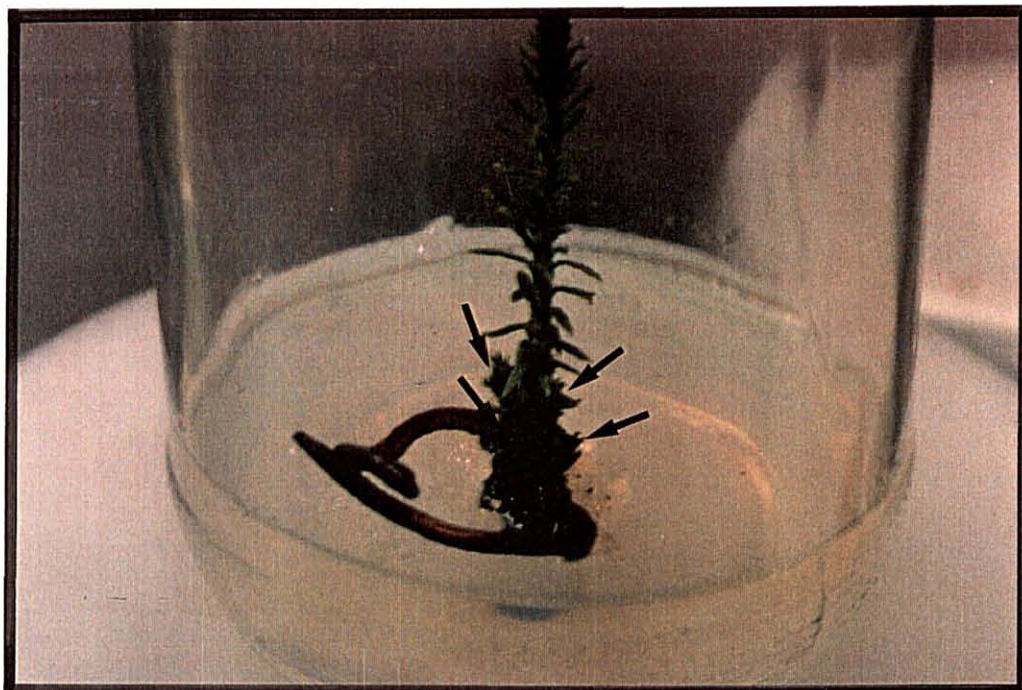


FIGURA 13. BROTO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* ORIGINADO PELO MERISTEMA APICAL DE EMBRIÃO MADURO, MOSTRANDO DESENVOLVIMENTO DE BROTO AXILARES NA BASE PELA QUEBRA DA DOMINÂNCIA APICAL. TRATAMENTO INDUTIVO COM BA 60 MG/L, UMA HORA E TRINTA MINUTOS.

5.3. ARMAZENAMENTO DE MUDAS

O armazenamento das mudas recém-germinadas, de no máximo com 30 dias, e alturas do caule, excluídas as gemas apicais, de no máximo 4 cm (alturas totais, 6-8 cm), em baixas temperaturas para inibir o crescimento, é um aspecto importante a ser considerado.

Para os experimentos de laboratório e para o rejuvenescimento de indivíduos adultos, o maior obstáculo encontrado foi o crescimento muito rápido das mudas, limitando o trabalho de pesquisa ao período de agosto - novembro a cada ano, em função da época de frutificação da espécie e da germinação dos pinhões.

A utilização de mudas de quatro meses, já foi suficiente para a constatação de problemas de manuseio e de respostas aos tratamentos dados, devido à variável idade das mudas, tanto para o cultivo dos segmentos caulinares como para os enxertos.

As Tabelas 38 e 39, apresentam os resultados obtidos nos experimentos efetuados a 4 °C, em balcões refrigeradores Engelfrio.

TABELA 38. CRESCIMENTO MÉDIO (95 E 185 DIAS) DAS MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, ARMAZENADAS A 4 °C, COM ALTURAS INICIAIS DE 8,9 E 6,2 CM, COMPARADAS AO CONTROLE (9,1 CM. R = 88 MUDAS/TRAT.)

	Controle	T1	T2
H.I.	9,1 cm	8,9 cm	6,2 cm
H 95	24,4 cm	12,2 cm	6,83 cm
H 185	-	13,1 cm	7,6 cm

TABELA 39. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE CRESCIMENTO DAS MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE ARMAZENADAS A 4 °C (95 E 185 DIAS).

		95%
Controle	15,3	a
4°C 8,9 cm	3,3	b
4°C 6,2 cm	0,625	c

Foram altamente significantes as diferenças entre as médias, com efeito comprovado da temperatura (4 °C) na parada do crescimento das mudas e, do efeito do tamanho das mudas para o armazenamento (Tabelas 61 e 62).

Notou-se, contudo, que após o período de 95 dias, o crescimento médio das mudas maiores (8,9 cm) armazenadas a 4 °C igualou-se ao das mudas menores (6,2 cm) em torno de 0,8 - 0,8 cm, aos 185 dias.

Utilizadas para reenxertos, estas mudas não apresentaram comportamento diferente do observado para mudas não submetidas ao armazenamento.

5.4. ARMAZENAMENTO DE PINHÕES

Além do armazenamento a frio, das mudas de dois a três meses de idade, outra possibilidade para se ter mudas da mesma idade, por períodos maiores que três-quatro meses/ano, talvez mais indicada (pelo menor volume e menor área requerida) seria o armazenamento das sementes.

Considerando o conhecido fato da perda da viabilidade das mesmas, num período de até seis meses (ALVES, 1965; SUITER FILHO, 1966), mesmo com armazenamento em câmara fria, 5 °C, (RAMOS e CARNEIRO, 1988), tentou-se verificar o efeito de temperaturas menores, próximas a 0 °C, ou abaixo para a

manutenção da viabilidade das sementes para períodos maiores que três a quatro meses. Optou-se pela temperatura $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, devido às observações iniciais após 10 dias de armazenamento: os embriões não apresentaram danos visíveis, tais como congelamento ou desidratação, devido à proteção do endosperma primário abundante e, proteção dos pinhões em embalagens triplas de papel grosso. Após 4,5 e 5,5 meses de armazenamento (26.06.95), os pinhões foram retirados e após 12 horas à temperatura ambiente, em aberto, a análise morfológica dos mesmos foi feita. Praticamente, não houve perdas devido à deterioração ou outros danos decorrentes das condições de armazenamento. Os testes de germinação foram conduzidos de maneira similar às condições dadas para os pinhões recém-coletados ou adquiridos, com a embalagem das sementes em plástico grosso.

De maneira similar à verificada com os pinhões frescos, a germinação dos submetidos ao armazenamento, não foi homogênea e, abrangeu um período de 60 dias. Foi feita uma contagem intermediária no 30º dia e uma final no 60º dia. Os resultados foram verificados pelos índices de germinação obtidos e, podem ser vistos na Tabela 40.

TABELA 40. GERMINAÇÃO DOS PINHÕES ARMAZENADOS EM FREEZER, $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, APÓS 4,5 E 5,5 MESES. ARMAZENAMENTO INICIADO EM 26.06.95. TOTAL SEMENTES/TRATAMENTO = 1.122.

Procedência	% germinação 4,5 meses	% germinação 5,5 meses
Quitandinha	86	80
General Carneiro	79,8	76,6
Média	82,5	78,3

Não foram detectadas diferenças significativas entre as médias de germinação dos pinhões, considerando-se os dois períodos de armazenamento e as duas procedências (Tabela 63).

Comparados aos índices de germinação em torno de 2% e 48%, aos 6 meses, obtidos por MONTEIRO e SPELTZ (1980), em seus experimentos de armazenamento em geladeira e vidros fechados, os resultados obtidos podem ser considerados bons, demonstrando a viabilidade do processo. As mudas obtidas, em primeira instância, não apresentaram perdas visíveis da qualidade e vigor. Isoladas, mostraram alto grau de contaminação endógena, devido às condições dadas para a germinação, mas este aspecto é controlável pela esterilização da terra a ser utilizada para os plantios e aplicação periódicas de Benlate. Utilizadas para enxertos, não apresentaram comportamento diferente do observado para mudas obtidas de sementes frescas.

5.5. REJUVENESCIMENTO *IN VIVO*

Devido à falta de habilidade manual inicial, não foram realizados experimentos diferenciais para o estabelecimento do melhor método de enxertia, para o objetivo proposto.

Contudo, o enxerto tipo garfagem, em fenda terminal, foi o que, a priori, se apresentou como o mais viável e, em condições *ex vitro*. Não se optou pela enxertia *in vitro* devido às dificuldades de manuseio e maiores custos, verificados através de algumas tentativas, com mudas recém-germinadas.

Devido às diferenças entre o diâmetro das mudas de dois a três meses de

idade e, os das gemas apicais dos indivíduos de 16-25 anos, foi necessária a redução drástica destas últimas, com a retirada de grandes proporções de acículas externas, córtex e boa parte do cilindro central. Com a exposição das regiões mais tenras e altamente hidratadas, estas gemas mostraram grande sensibilidade às altas temperaturas e baixa umidade relativa (25% de pegamento).

Os pegamentos das primeiras enxertias realizadas, em condições controladas de temperatura, $17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, umidade relativa ambiental de 70% - 90%, foram de 80%-95%.

Foram feitas duas tentativas para a segunda enxertia e, constatou-se a existência de três problemas a serem resolvidos:- o primeiro, relativo às gemas já enxertadas e limpas para os reenxertos, que tiveram seus tamanhos mais reduzidos; o segundo, a sensibilidade destas gemas às altas umidades relativas, (mantidas pela evaporação de água do substrato dos leitos de enraizamento, constantemente umedecido pelo sistema de nebulização intermitente), e ao envoltório plástico de proteção e fixação dos enxertos; o terceiro, relativo à falta de mudas de tamanho adequado para os reenxertos. Mudanças com alturas superiores a 15-20 cm já apresentam, nas bases do caule, grau de lignificação relativamente avançado, que impede a fusão com as regiões relativamente indiferenciadas das gemas a serem reenxertadas. Nos enxertos realizados nas regiões subapicais de mudas de quatro meses de idade (por falta de mais jovens) verificou-se menor índice de pegamento e de reações de crescimento, além do que, para o rejuvenescimento, a juvenilidade máxima dos porta enxertos é condição essencial.

Em todos os experimentos realizados, (cerca de oito), verificou-se que o pegamento ocorreu em torno de 20 dias, após os quais, as reações de

crescimento exigiram temperaturas maiores que $17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme observado em estufa Van der Hoeven.

Apesar das exigências mais específicas, sobretudo para as reenxertias, o rejuvenescimento *ex vitro* dos indivíduos adultos de araucária, através do efeito cascata de enxertias *ex vitro*, pelos resultados obtidos, afigura-se como um processo viável.

Estes resultados são apresentados através das Figuras 14 a 20.



FIGURA 14. PONTEIROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE 20 ANOS. (QUEDAS DO IGUAÇÚ - PR. GIACOMET-MARODIM INDÚSTRIA DE MADEIRAS S.A.).



FIGURA 15. GEMAS APICAIS DOS PONTEIROS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE 16 ANOS, 40 DIAS APÓS O ENXERTO EM MUDAS DE UM-DOIS MESES DE IDADE.



FIGURA 16. COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DAS GEMAS APICAIS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE 16 ANOS, ENXERTADAS CONFORME A IDADE DA MUDA E POSIÇÃO DO ENXERTO. ESQUERDA: ENXERTO FEITO NA REGIÃO SUBAPICAL DE MUDA DE QUATRO MESES. DIREITA: ENXERTO EFETUADO NA REGIÃO BASAL DE MUDA DE UM MÊS. 60 DIAS APÓS O ENXERTO.

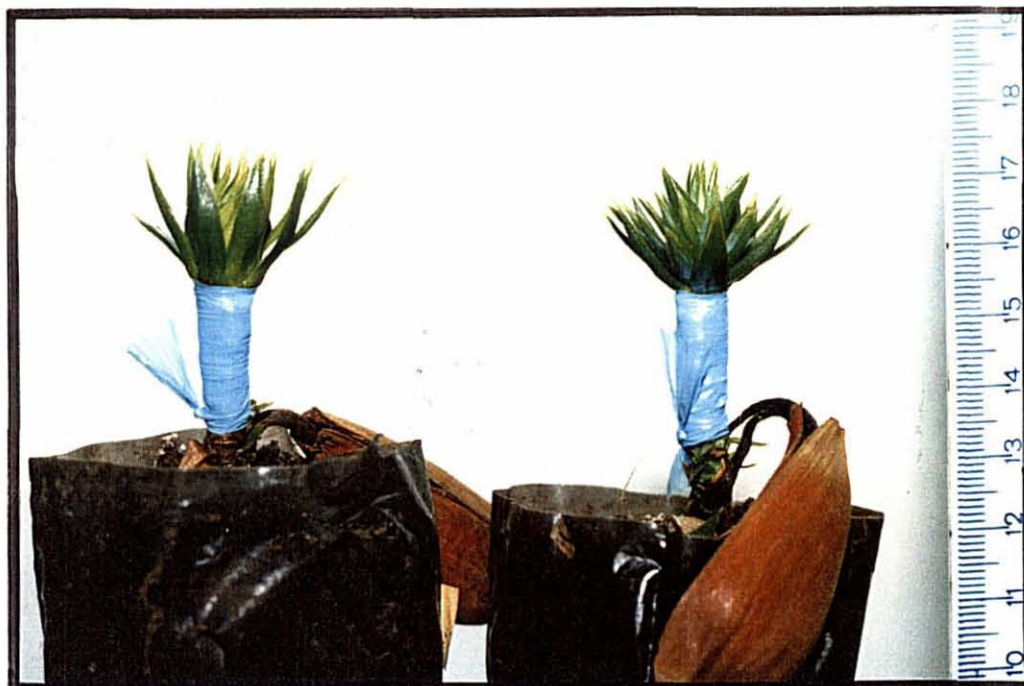


FIGURA 17. GEMAS APICAIS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE 20 ANOS, NO 1º REENXERTO. NOTE APARÊNCIA PARCIALMENTE REJUVENESCIDA EM RELAÇÃO ÀS DAS FOTOS 14 E 16. 30 DIAS APÓS REENXERTO.



FIGURA 18. GEMAS APICAIS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO ANOS REENXERTADAS EM MUDAS DE UM MÊS. 30 DIAS APÓS REENXERTO.



FIGURA 19. À ESQUERDA, REENXERTO DE INDIVÍDUOS DE QUATRO ANOS; À DIREITA:- REENXERTO DE INDIVÍDUOS DE 20 ANOS (DIREITA DA FOTO 18).



FIGURA 20. BROTOS AXILARES OBTIDOS *IN VITRO* DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS MESES DE IDADE, NÃO ENRAIZADOS E ENXERTADOS EM MUDAS DE UM MÊS. 40 DIAS.

5.6. ASPECTOS ANATÔMICOS

Os brotos axilares obtidos *in vitro* tiveram origem nos meristemas residuais axilares do caule das mudas. Estes meristemas axilares são constituídos por um pequeno grupo de células, que entram em atividade somente na ausência da gema apical, organizando-se, com a formação de novas células, num ápice caulinar que se desenvolve formando brotos ortotrópicos.

Estes brotos, após alongamento (4 cm, em média), devem formar raízes adventícias, para que se tenha plântulas ou novos indivíduos e, obtidos *in vitro*. Estas raízes devem ser induzidas, e com a formação "de novo" de primórdios radiciais, através dos estímulos auxínicos.

Estes primórdios, de maneira semelhante ao meristema residual axilar, se organizam e formam os ápices radiciais, a partir dos quais se tem o desenvolvimento das raízes adventícias.

A seqüência dos eventos anatômicos foi estudada para os 2 processos morfogênicos e, são apresentados através das fotos.

5.6.1. Organização e Desenvolvimento dos Meristemas Axilares

O meristema axilar ortotrópico é formado por um pequeno número de células meristemáticas de 5 micra de diâmetro, situado em um grupamento celular de conformação circular muito característico (10 micra de diâmetro). Frontal e lateralmente o grupo meristemático está cercado por células parenquimáticas bem maiores (Figuras 21).

Não há, na literatura botânica básica referências sobre estes meristemas. Conforme FINK (1983), esses meristemas são iniciais de gemas axilares que se formam a partir de células meristemáticas dermatogênicas e subdermatogênicas, 2-3 mm abaixo do ápice meristemático. Essas células mais externas, se suberificam e as imediatamente abaixo se tornam parenquimáticas, e na base, algumas permanecem meristemáticas. Com o alongamento do eixo, expansão da base das folhas e a formação do córtex, estes primórdios ficam imersos no parênquima cortical, 1-2 mm abaixo da epiderme (ou periderme).

CUTTER (1987), faz menção aos chamados meristemas destacados, regiões do meristema apical que ficam isolados, devido à vacuolização e diferenciação das células intermediárias e, que permanecem dormentes ou inibidas até serem estimulados ao desenvolvimento em gemas. Salienta que, sem dúvida, existem causas hormonais nesse estímulo, mas que não fornecem respostas completas nem estão completamente elucidadas. Cita a interferência de ações correlativas entre a folha e a respectiva gema axilar completa, quando a folha jovem pode estimular o seu desenvolvimento. Essas correlações entre estruturas de plantas em desenvolvimento, são apresentadas e discutidas por CHAMPAGNAT (1974).

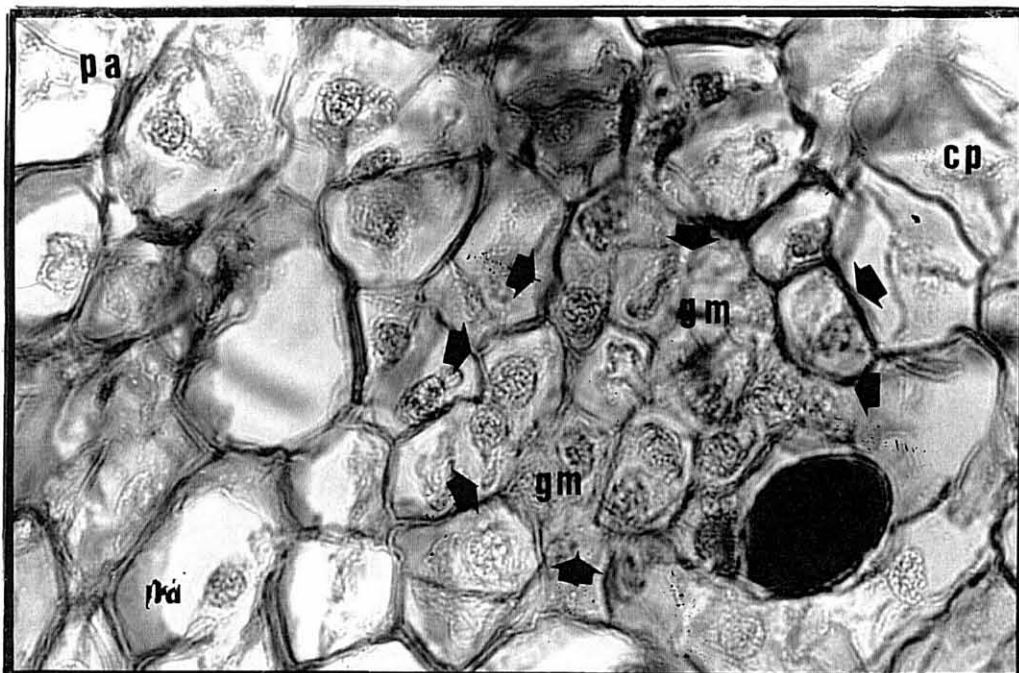


FIGURA 21. MERISTEMA ORTOTRÓPICO DE SEGMENTO CAULINAR DE MUDA DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 100X. GM - GRUPO MERISTEMÁTICO; CP - CÉLULAS PARÊNQUIMÁTICAS; PA - PARENQUIMA CORTICAL.

No caso das araucárias, estas correlações são claramente de dominância do meristema apical, como pode se observar pelas brotações de caules decepados: FINK (1983), verificou que os meristemas axilares da araucária permanecem embutidos na casca secundária, na base das cicatrizes foliares de indivíduos adultos e, que podem ser estimulados ao desenvolvimento pela defoliação das árvores por parasitas.

ZANETTE *et al* (1987), verificaram que a variação da concentração do mioinositol, considerado como fator de crescimento, implica na variação do número de meristemas axilares que se desenvolvem em um segmento, conforme a posição no caule, mas em função da variação na concentração de glicina. O assunto, na realidade é muito complexo, se tivermos em conta que, existe também

uma correlação de dominância entre os meristemas axilares: os superiores inibem o desenvolvimento dos situados mais abaixo (Figura 22); que outros fatores como: teor endógeno de hormônios naturais, estações, hora do dia, fatores ambientais de cultivo, possivelmente exerçam influências nas respostas desses segmentos. Entretanto, em meio MS/2, os meristemas se desenvolvem de maneira que pode ser considerada normal, podendo se esperar a obtenção de plântulas e posteriormente, indivíduos normais, a partir dos brotos obtidos *in vitro* de segmentos cultivados em MS/2.

Pelo verificado, o meristema axilar entra em atividade logo nos primeiros dias de cultivo, os situados na parte superior dos segmentos sendo os mais precoces (Figuras 23 a 28). Nestas, observa-se o aumento do número de células meristemáticas. Nas Figuras 23 a 25, que retratam o desenvolvimento médio, entre os 4º e 6º dias, pode-se constatar que o primeiro tecido meristemático que se diferencia é a protoderme. O aumento do número das suas células ocorre, preferencialmente, por divisões anticlinais, verificadas pelas posições dos núcleos muito próximos, resultantes da orientação das divisões. Em média, no 7º e 8º dias cultivo, o meristema apical dos futuros gema e broto, já está praticamente organizado, podendo-se notar que a protoderme não está ligada às células parenquimáticas adjacentes. Neste estágio já se verifica: protoderme, uma região periférica e uma central, pontos laterais subprotodérmicos onde serão formados os primórdios foliares e início de procâmbio; participação de células parenquimáticas do córtex, na formação da região basal do meristema apical (Figuras 25 a 29).

Até esta etapa de desenvolvimento, não se reconhece ainda todas as

considerações feitas por GRIFFITH (1952), ESAU (1972), e CUTTER (1987), sobre a estrutura do meristema apical caulinar de Ginospermas, em geral, e araucariáceas em particular.

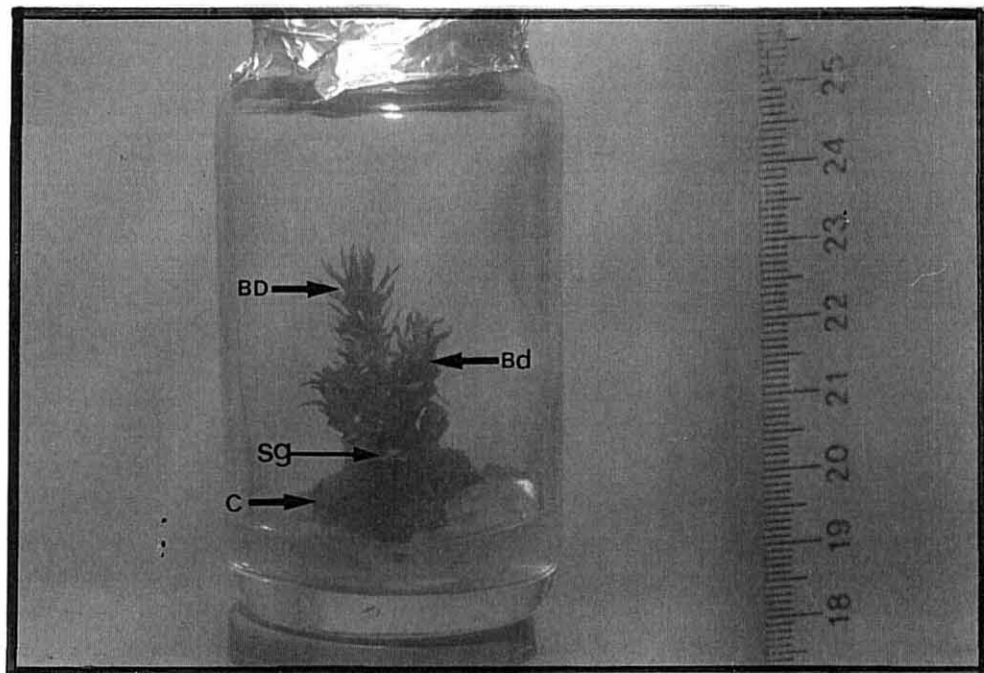


FIGURA 22. SEGMENTO CAULINAR DE MUDA DA *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, APÓS 45 DIAS DE CULTIVO. SG - SEGMENTO; C - CALO FRIÁVEL; BD - BROTO AXILAR DOMINANTE; Bd - BROTO AXILAR DOMINADO.

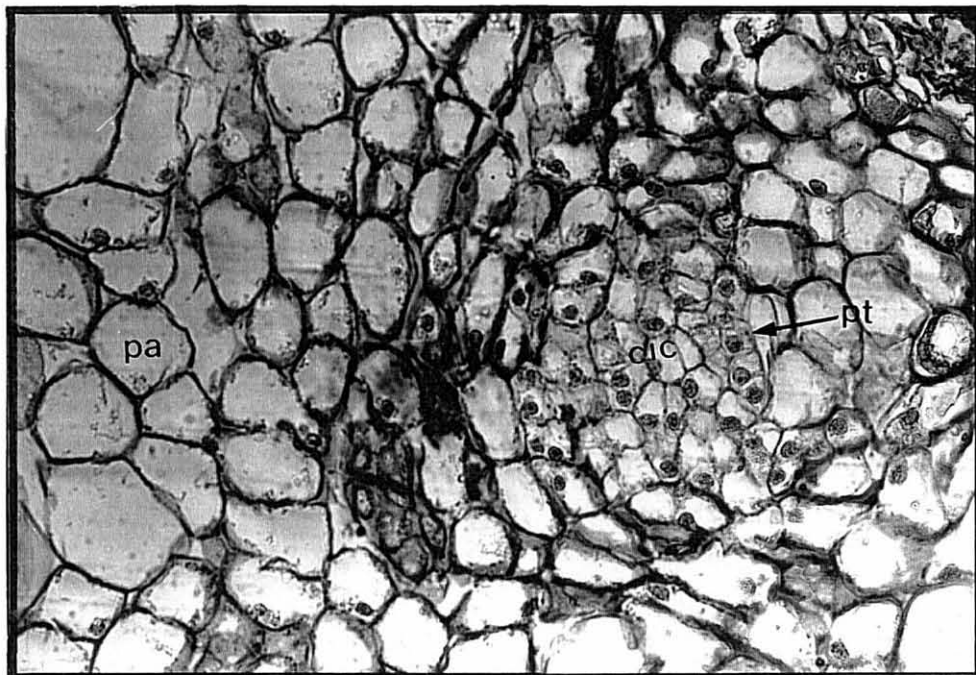


FIGURA 23. MERISTEMA AXILAR DE UM SEGMENTO DE MUDA DE *ARAUCARIA ANGSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, EM FASE POUCO MAIS AVANÇADA DE DESENVOLVIMENTO. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 100X. PT - PROTODERME. CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS. PA- PARENQUIMA CORTICAL.

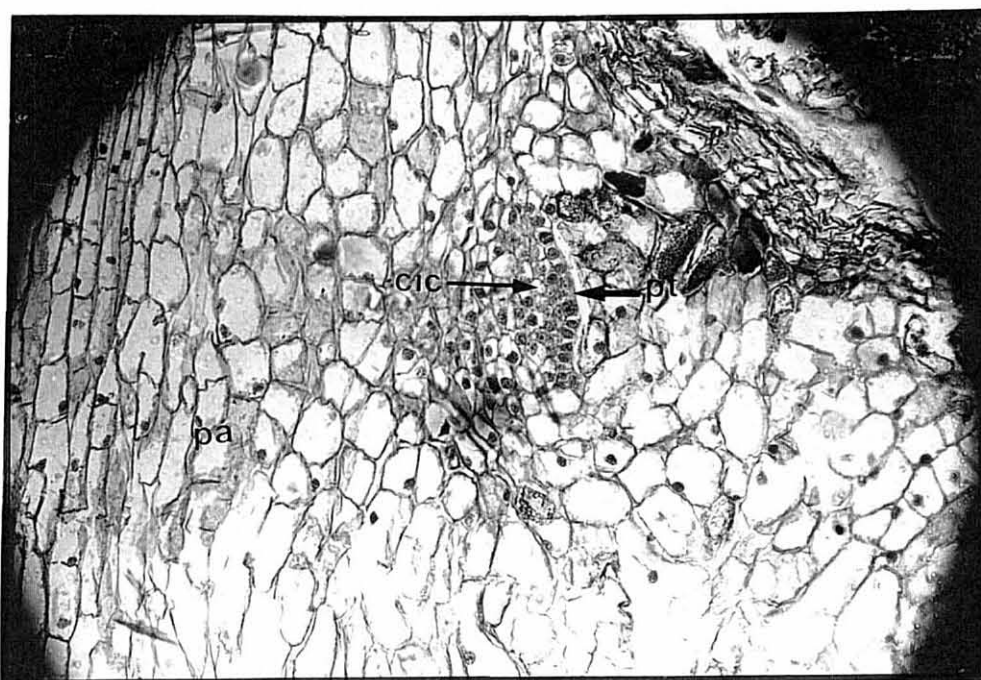


FIGURA 24. FASE MAIS AVANÇADA NA ORGANIZAÇÃO DO MERISTEMA AXILAR. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 100X. PT - PROTODERME; CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS; PA - PARÊNQUIMA CORTICAL.

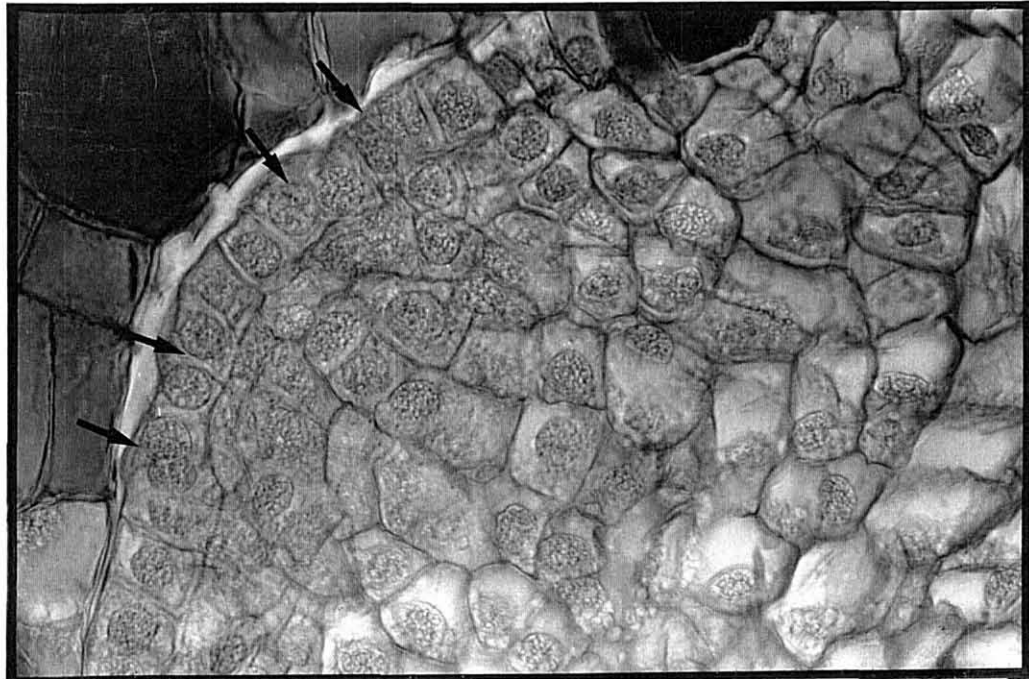


FIGURA 25. MERISTEMA AXILAR JÁ QUASE TOTALMENTE ORGANIZADO EM MERISTEMA APICAL DE GEMA E BROTO AXILAR. PT - TU - TÚNICA; CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS; RP - REGIÃO PERIFÉRICA DO CORPUS; RC - REGIÃO CENTRAL DO CORPUS. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 400X.

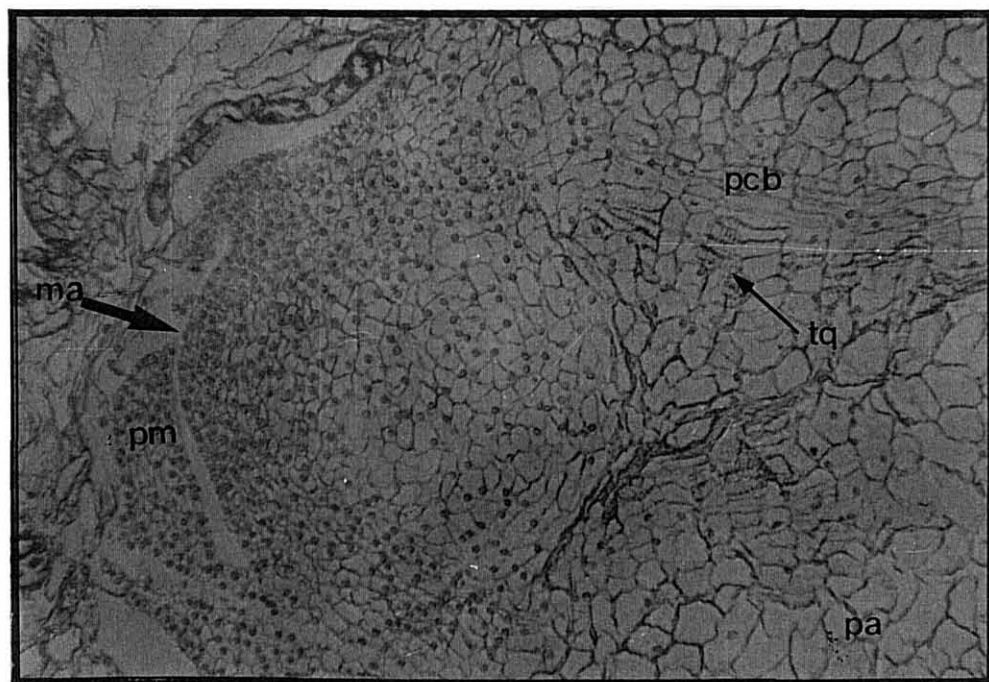


FIGURA 26. GEMA PARCIALMENTE ORGANIZADA. MA - MERISTEMA APICAL; PM - PRIMÓRDIO FOLIAR. PCB - PROCÂMBIO; PA - PARÊNQUIMA CORTICAL. TQ - TRAQUEÓIDES. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 160X.

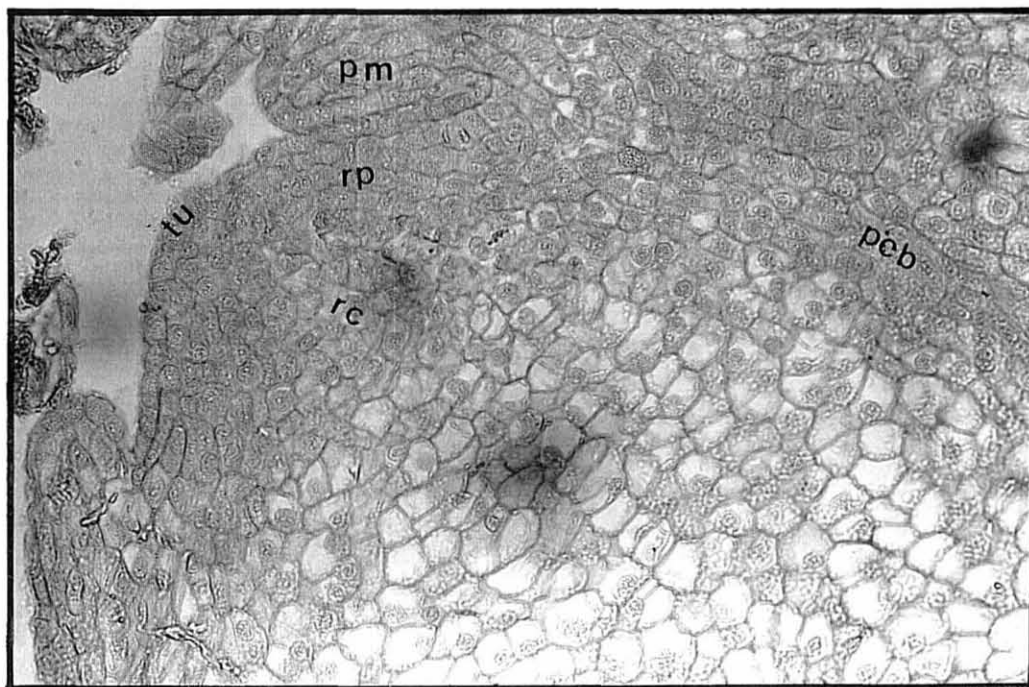


FIGURA 27. MERISTEMA APICAL COM PRIMÓRDIOS FOLIARES. TU - TÚNICA; RP - REGIÃO PERIFÉRICA DO CORPUS; RC - REGIÃO CENTRAL DO CORPUS; PCB - PROCÂMBIO; PM - PRIMÓRDIO FOLIAR. SECÇÃO LONGITUDINAL TANGENCIAL. 160X.

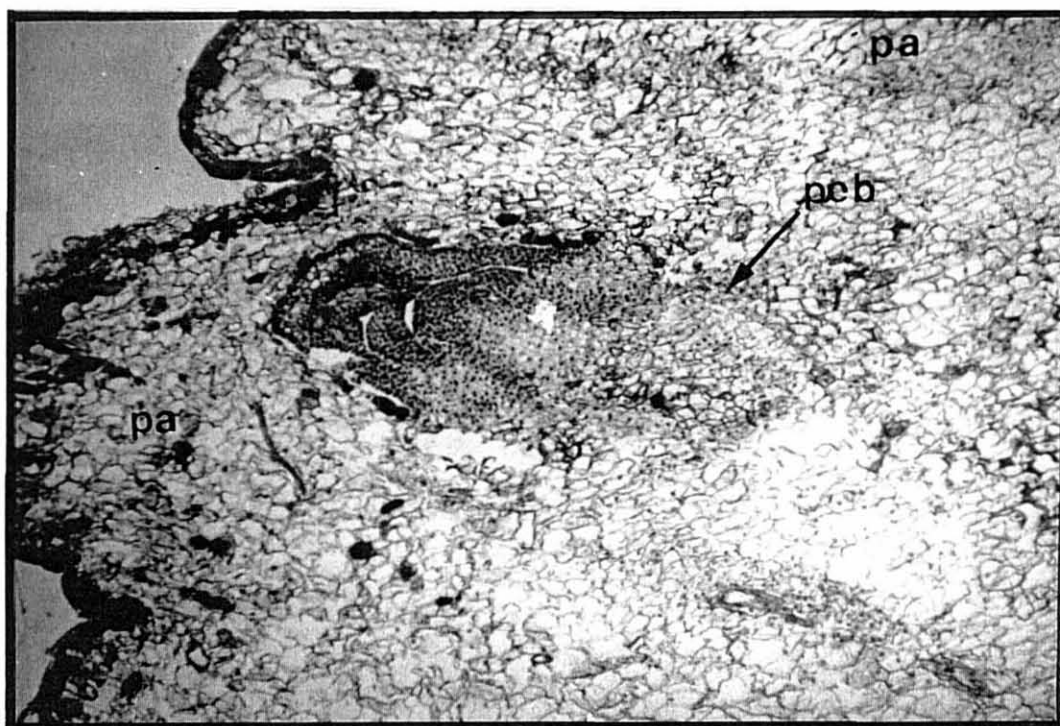


FIGURA 28. FOTOMACROGRAFIA DE GEMA AXILAR - 10º DIA DE CULTIVO. PA - PARÊNQUIMA CORTICAL. PCB - PROCÂMBIO. 60X.

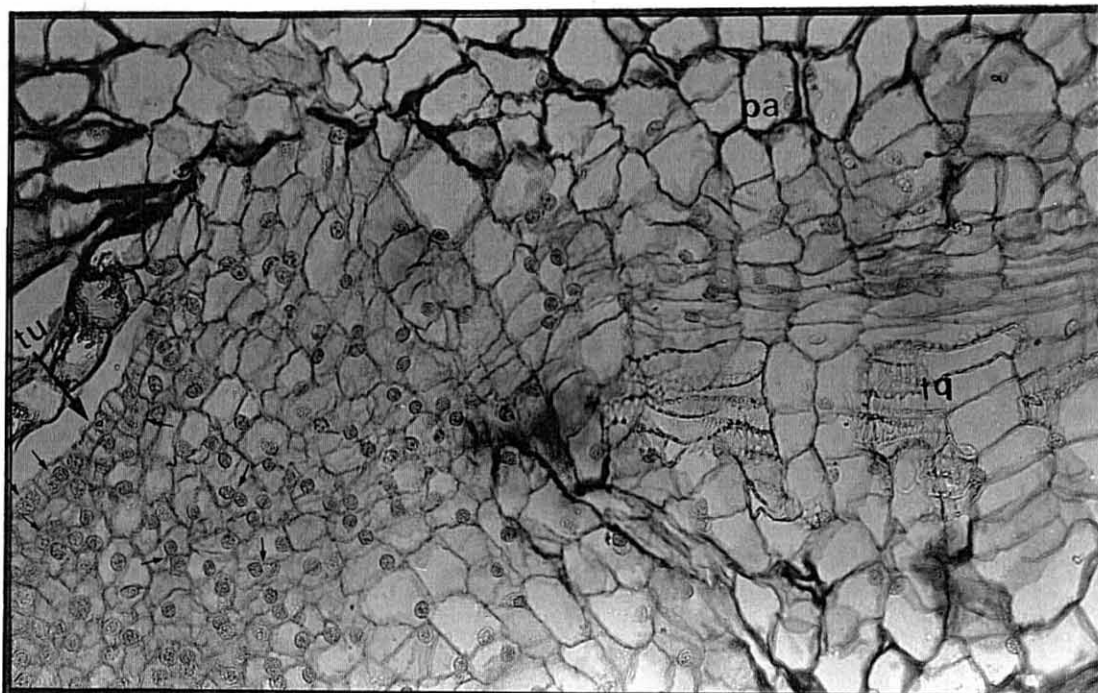


FIGURA 29. DETALHE, MOSTRANDO PROCÂMBIO E TRAQUEÓIDES DIFERENCIADOS. NOTE À ESQUERDA UM GRANDE NÚMERO DE DIVISÕES CELULARES PERICLINAIS QUE INICIAM A FORMAÇÃO DE UM PRIMÓRDIO FOLIAR; AS DIVISÕES ANTICLINAIS NA TÚNICA; AS SETAS ASSINALAM EXEMPLOS DE AMBOS OS CASOS. TU - TÚNICA; PCB - PROCÂMBIO; PA - PARÊNQUIMA CORTICAL. 400X.

De acordo com ESAU (1972), e CUTTER (1987), os ápices caulinares de muitas Ginospermas não possuem uma camada celular cujos componentes se dividam somente por divisões anticlinais, razão porque sua estrutura não pode ser descrita através dos conceitos **túnica-carpus** de SCHMIDT (1924). Nestas espécies, o meristema apical seria composto por: um grupo de iniciais apicais (duas-três células centrais de duas-três camadas celulares superficiais); células mães centrais - abaixo das primeiras e, constituindo um grupamento pouco maior; as células centrais e basais do mesmo dariam origem às células da medula; as periféricas, a uma região cujas derivadas têm núcleos grandes e, apresentam maior afinidade por corantes e, irão propiciar a formação dos tecidos

do futuro córtex.

GRIFFITH (1952), verificou, para quatro espécies - *A. araucana*, *A. bidwillii*, *A. excelsa* e *A. cunninghamii*, que na protoderme ocorrem somente divisões anticlinais, sendo a mesma passível de ser a **túnica** e, portanto, a teoria de SCHMIDT (1924), perfeitamente aplicável a estas espécies. ESAU (1972), cita trabalhos de diversos autores que concordam com esta opinião e, outras ginospermas com esta característica: espécies dos gêneros *Cupressus* e *Agathis*. A estrutura do meristema apical, apresentada anteriormente, passa a ser constituída por:- **túnica**, com as suas iniciais situadas no centro do ápice (protoderme); e o **corpus** abrangendo o grupamento correspondente às células mães centrais; a região periférica (meristema fundamental do córtex, FOSTER, 1949); região central (meristema fundamental do cilindro central, com o procâmbio, FOSTER, 1949). A mesma autora, conclue que, por apresentarem organização meristemática semelhante ao das Angiospermas, estas espécies de Ginospermas seriam as mais evoluídas dentro deste grupo.

Na Figura 29, podem ser vistas divisões periclinais e anticlinais das células situadas abaixo da túnica.

O que foi exposto pode ser reconhecido para a araucária nas Figuras 30 e 31 (meristema em fase final de organização).

As Figuras 27, 28 e 30 ilustram as fases finais de organização do meristema apical e a formação da gema, do 9º ao 14º dia de cultivo do segmento.

Pode se verificar que estão sendo formadas saliências laterais para a formação dos primórdios foliares, denunciando a exteriorização próxima da gema, aos 15º-18º dia, rompendo através do córtex, devido ao início do alongamento,

quando tem-se a formação do broto. Ainda, nas Figuras 30 e 31, pode-se notar a formação do procâmbio, partindo dos primórdios foliares que, como se verá mais tarde, irá estabelecer a conexão vascular com o sistema de condução do segmento, por diferenciação direcionada das células parenquimáticas corticais do segmento caulinar (Figura 29).

O meristema apical do futuro broto e caule da plântula e do novo indivíduo obtido, está completo nas Figuras 28 e seguintes, através das quais se verifica, pela formação de grande número de folhas, que o mesmo apresenta grande atividade, com a gema completamente formada ainda incluída no córtex.

Nas Figuras 30 e 31, aglomerados nucleares laterais e subprotodérmicos, maiores ou menores, são resultantes de divisões celulares locais e, são causa das saliências mais ou menos pronunciadas, que representam primórdios foliares em estágios avançados ou iniciais de desenvolvimento. Nos mais avançados, as divisões são periclinais e anticlinais; nos iniciais, predominantemente periclinais. As gemas, nas Figuras 27, 28, 30 e 31, têm cerca de 2mm de diâmetro, representando um aumento médio de 400 a 500 vezes o volume inicial: o meristema axilar tem em média 5-6 micra de diâmetro.

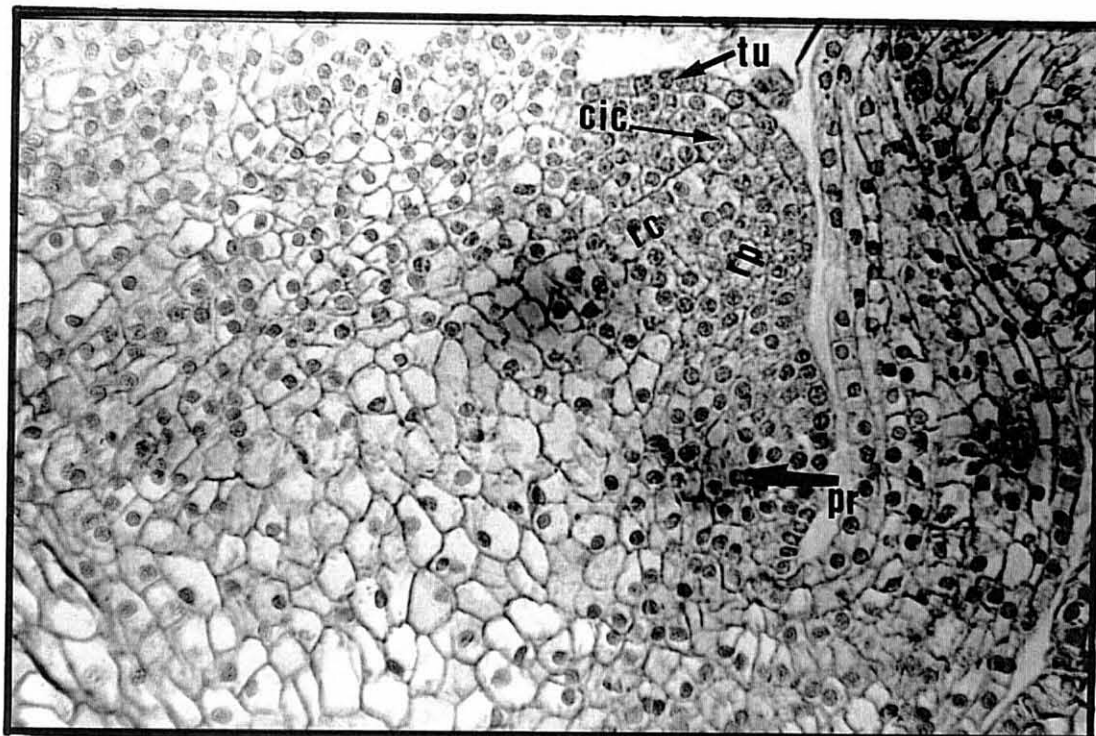


FIGURA 30. DETALHE DE GEMA COM PRIMÓRDIOS FOLIARES EM ESTÁGIOS INICIAIS DE FORMAÇÃO E ZONEAMENTO HISTOLÓGICO EVIDENTE. TU - TÚNICA; CIC - CÉLULAS INICIAIS DO CORPUS; RP E RC - REGIÕES PERIFÉRICA E CENTRAL DO MESMO. 200X.

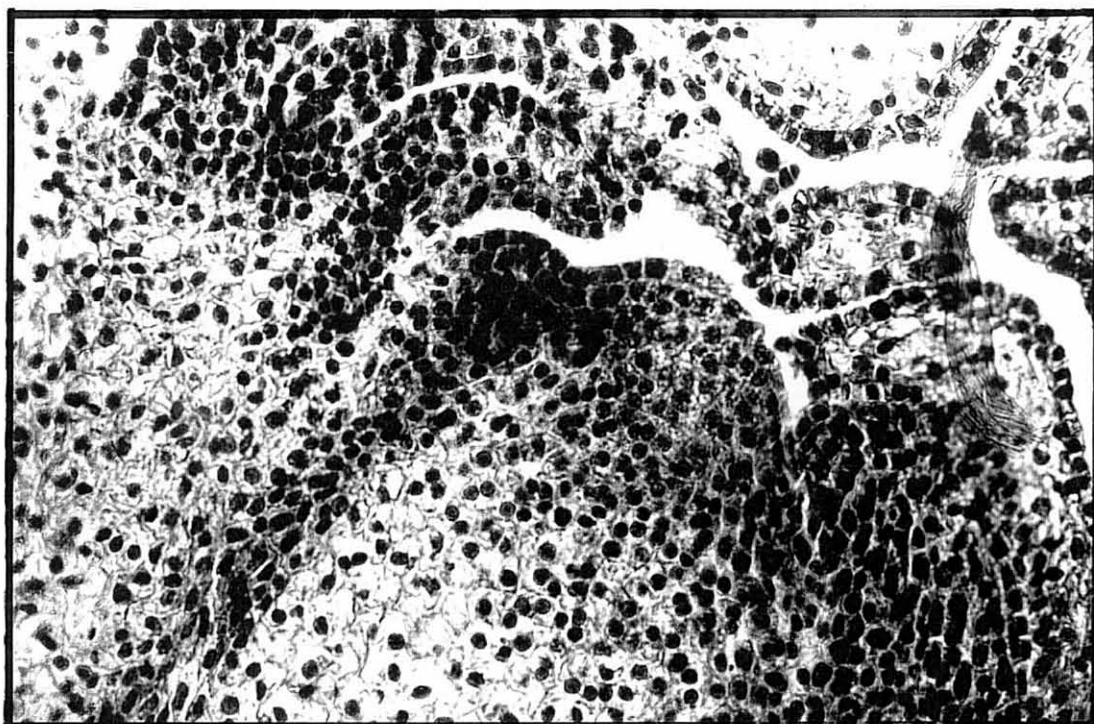


FIGURA 31. GEMA PRESTES A IRROMPER PELO CÓRTEX, AOS 15-16º DIA DE CULTIVO DO SEGMENTO. INÍCIO DA FASE DE ALONGAMENTO QUE PRECEDE A FORMAÇÃO DO BROTO. 400X.

5.6.2. Formação e Desenvolvimento das Raízes.

Dos experimentos feitos ao longo de três anos, 1986-1989, tendo sempre por base brotos de segmentos caulinares de mudas de 30-60 dias, época - dezembro-fevereiro, verificou-se que esta é uma etapa difícil, obtendo-se baixas porcentagens de enraizamento e muito variável conforme o ano (0-50%).

Tendo em vista que em cada um dos anos mencionados as sementes foram obtidas de diferentes procedências, este fator pode ser uma das variáveis responsáveis pelas diferentes taxas de enraizamento obtidas. Em meio básico sem AIB, a taxa de enraizamento foi sempre 0%.

O calo formado na base dos brotos axilares cultivados, atinge grandes proporções (Figuras 32, 33), sendo mais firme enquanto nas etapas iniciais de desenvolvimento. À medida que novas células vão sendo acrescentadas, as mais velhas se distanciando da base, formam saliências de aspecto poroso e se desmancham com facilidade, sendo, portanto, do tipo friável. É possível que o tempo de vida dessas células seja curto e, suas lamelas médias facilmente desintegráveis após determinado período. Este tipo de calo também é formado na base de segmentos de caule cultivados para se obter as brotações, em meio básico com ou sem reguladores do crescimento e, na base de brotos dominados postos a crescer no meio básico, mas com carvão ativado e ácido giberélico.

Várias referências sobre o enraizamento de estacas, entre as quais, REINES e MACALPINE (1959); HARTMANN e KESTER (1967); KOMISSAROV (1969); DALGAS (1973) e BROWN (1974), atestam que as raízes em estacas de muitas espécies, principalmente coníferas, são formadas a partir de primórdios que

se originam de um câmbio que envolve ninhos de traqueóides formados no calo. Em todos os casos, as estacas foram postas a enraizar sob nebulização intermitente e em substrato de areia, os calos obtidos sendo do tipo compacto. Todos estes aspectos foram constatados por IRITANI e SOARES (1983); IRITANI *et al* (1986) (Figuras 37, 38 e 39).



FIGURA 32. BROTOS AXILARES DE MUDAS DE *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA* DE 30 - 60 DIAS, APÓS 30 - 35 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS/2, COM 1 - 2 MG DE ÁCIDO INDOL-3-BUTI'RICO, DOIS DELES ENRAIZADOS E, DOIS COM CALOS MUITO VOLUMOSOS.

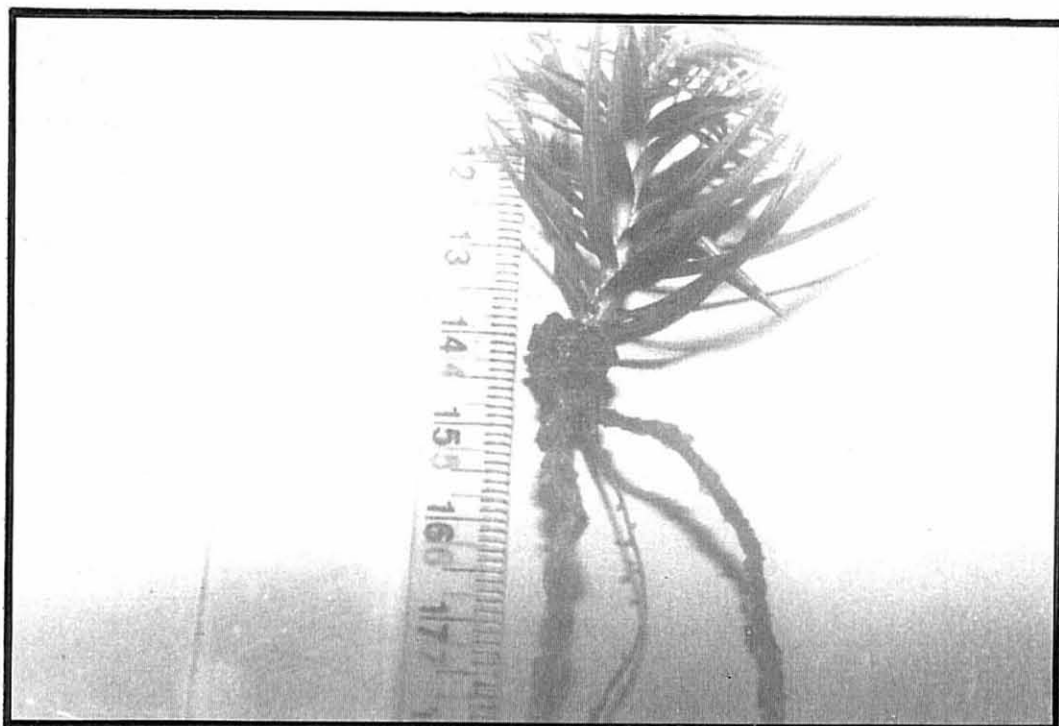


FIGURA 33. BROTO AXILAR DE MUDA DE *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA* DE 30-60 DIAS, COM TRÊS RAÍZES BEM DESENVOLVIDAS, APÓS 50 DIAS DE CULTIVO E PRESTES A SER TRANSPLANTADO PARA O SOLO. NOTE CALO VOLUMOSO.

Não há muitas referências quanto aos aspectos morfológicos do enraizamento *in vitro* de microestacas de coníferas, talvez devido aos muitos e complexos aspectos da micropropagação. Raízes obtidas *in vitro* e a partir do calo da base de brotos são mencionadas por BIGOT e ENGELMAN (1987), para *Cunninghamia lanceolata*, HORGAN (1987), para *Pinus radiata*.

É lógico esperar que os processos de enraizamento em estacas e microestacas sejam semelhantes além do que, há inúmeras constatações da capacidade morfogênica de calos cultivados isoladamente.

A microtomização transversal e longitudinal do material coletado, revelou que muito próximo, praticamente na base dos brotos, o calo é do tipo compacto e, é onde ocorre a iniciação radicial (Figuras 34, 35 e 36). As Figuras 34 e 35 e

36, mostram aspectos da estrutura do calo das microestacas que são iguais aos da estaca: - desdiferenciação de células parenquimáticas formando câmbios isolados que dão origem a ninhos de traqueóides e células parenquimáticas calosas. Na periferia deste calo, as saliências maiores apresentam suas partes distais em processo de desintegração.

Um primórdio radicial pode ser visto na Figura 36. É clara a ligação da iniciação do mesmo ao câmbio do ninho de traqueóides. Esta associação também é vista sem maiores dificuldades na conexão direta do sistema vascular de uma micro estaca com o ninho de traqueóides formado muito próximo e, deste com o sistema vascular da raiz formada. Esta é a situação encontrada em todos os casos de estacas enraizadas.

A diferença de textura entre os calos de microestacas cultivados *in vitro* e estacas cultivadas em areia, pode ser vista comparando-se a Figura 36, com as de números 37, 38 e 39. Na primeira, o primórdio radicial foi formado um tanto distante da base, apresenta configuração irregular, devido à dificuldade de microtomização; nas segundas, os primórdios formados praticamente na periferia do calo firme das estacas, apresentam configuração muito regular e a compactação dos tecidos é evidente.

Esta situação, aliada ao fato de que a microtomização de calos volumosos sem raízes resultou na constatação da ausência de primórdios radiciais nos mesmos, leva a crer que a iniciação radicial nas microestacas cultivadas *in vitro*, ocorre preferencialmente nas regiões proximais da base e de calos não muito desenvolvidos e mais compactos.

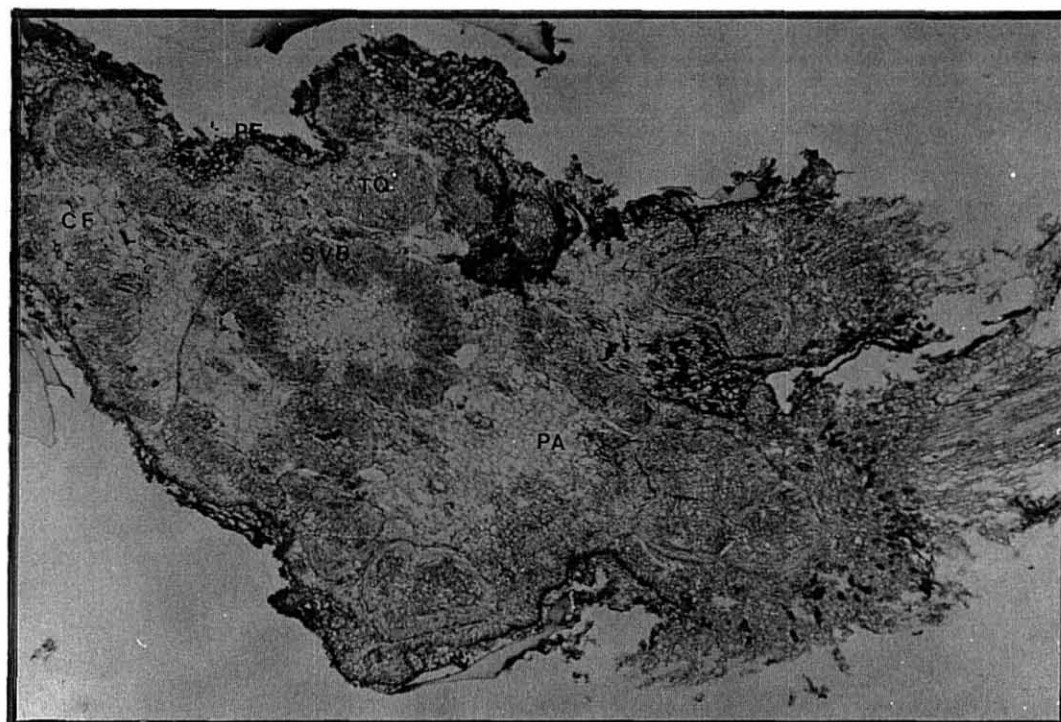


FIGURA 34. CORTE TRANSVERSAL DA BASE DE BROTO AXILAR CULTIVADO EM MEIO DE ENRAIZAMENTO, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO. FOTOMACROGRAFIA, 60X. SVB - SISTEMA VASCULAR DO BROTO; TQ-NINHO DE TRAQUEÓIDES; PE-PERIDERME; CF-CALO FRIÁVEL; PA-PARENQUIMA CALOSO.



FIGURA 35. DETALHE DE NINHO DE TRAQUEÓIDES. CORTE TRANSVERSAL, 400X. TQ-TRAQUEÓIDES; CC-CÂMBIO DO NINHO DE TRAQUEÓIDES; PA-PARÊNQUIMA CALOSO.

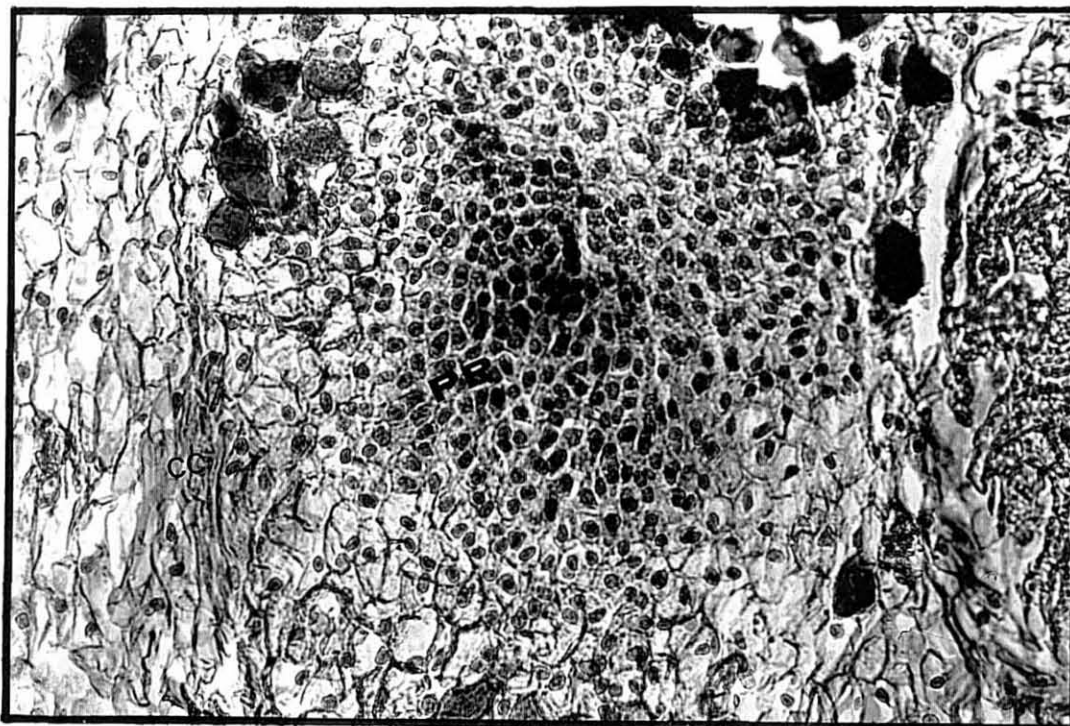


FIGURA 36. CORTE TRANSVESAL DE CALO DE BROTO AXILAR CULTIVADO EM MEIO DE ENRAIZAMENTO, APÓS 32 DIAS DE CULTIVO. PR - PRIMÓRDIO DE RAÍZ; PA - PARÊNQUIMA CALOSO; TQ - NINHO DE TRAQUEÓIDES. SECÇÃO TRANSVERSAL, 400X.

Entretanto, convém ressaltar que as estacas utilizadas como termo de comparação, eram de ramos plagiotrópicos e com diâmetros bem maiores; mesmo com calos compactos, também o enraizamento obtido foi em taxas baixas - 25%. Não há, até o momento, nenhuma referência quanto ao processo de enraizamento de estacas de caule de mudas, para que se possa ter melhor compreensão do processo. Fatores tais como: capacidade individual de enraizamento, conforme as procedências (populações), estações do ano, são variáveis que podem ser, em grande parte, responsáveis pelos resultados a serem obtidos.

A friabilidade do calo das microestacas parece ser, a priori, resultante das condições de arejamento do substrato - o meio gelosado e os frascos vedados, não são fatores que facilitem as trocas gasosas entre as bases das microestacas

e o meio exterior.

Todos estes aspectos serão objeto de pesquisas próximas, as microestacas sendo postas a enraizar, sob diferentes tratamentos auxinícos, juntamente com estacas apicais de caule de mudas, sob nebulização intermitente e considerando os fatores: idade, indivíduo, procedência e dentro das possibilidades, estações do ano e em dois anos consecutivos. Estas possibilidades são relativas ao período necessário para o enraizamento das estacas de caule, que em testes preliminares girou em torno de 90 - 120 dias.

A funcionalidade morfológica e fisiológica é inegavelmente dada pela conexão vascular das microestacas com os traqueóides do calo e a raiz formada, além da sobrevivência muito boa das plântulas obtidas quando transplantadas para o solo.

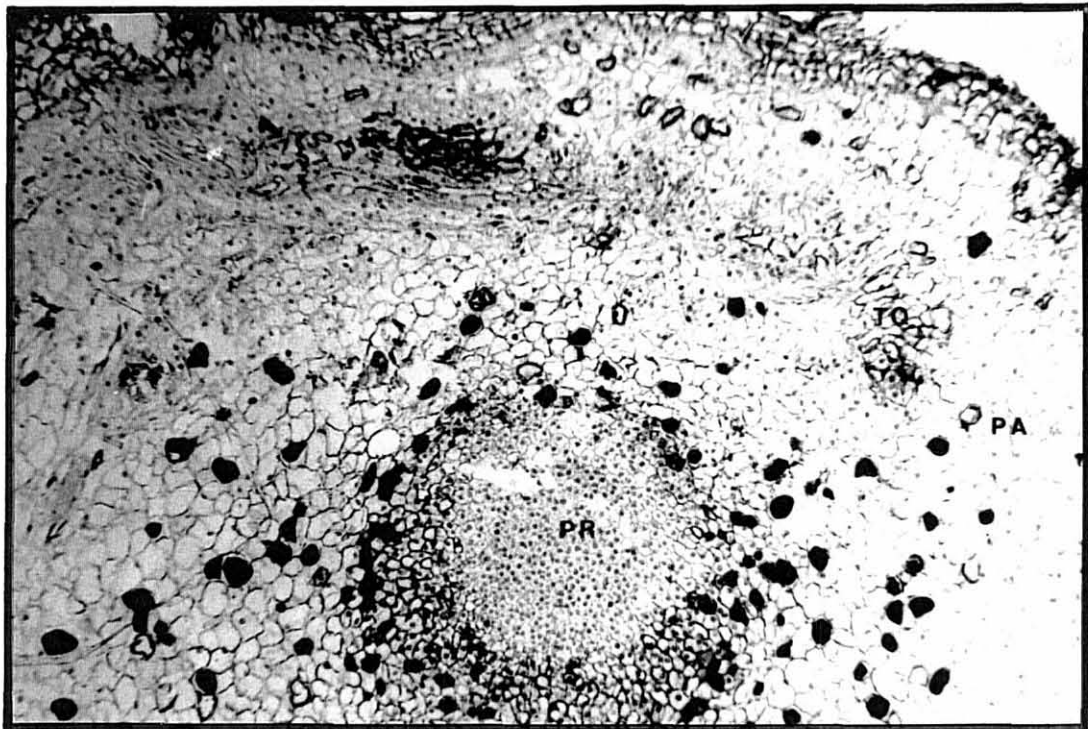


FIGURA 37. SECÇÃO TRANSVERSAL DE CALO DE ESTACA DE RAMO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO ANOS DE IDADE. PR -PRIMÓRDIO RADICAL; PA - PARÊNQUIMA CALOSO; TQ - NINHO DE TRAQUEÓIDES. NOTE TEXTURA FIRME DO PARÊNQUIMA CALOSO. 60X.

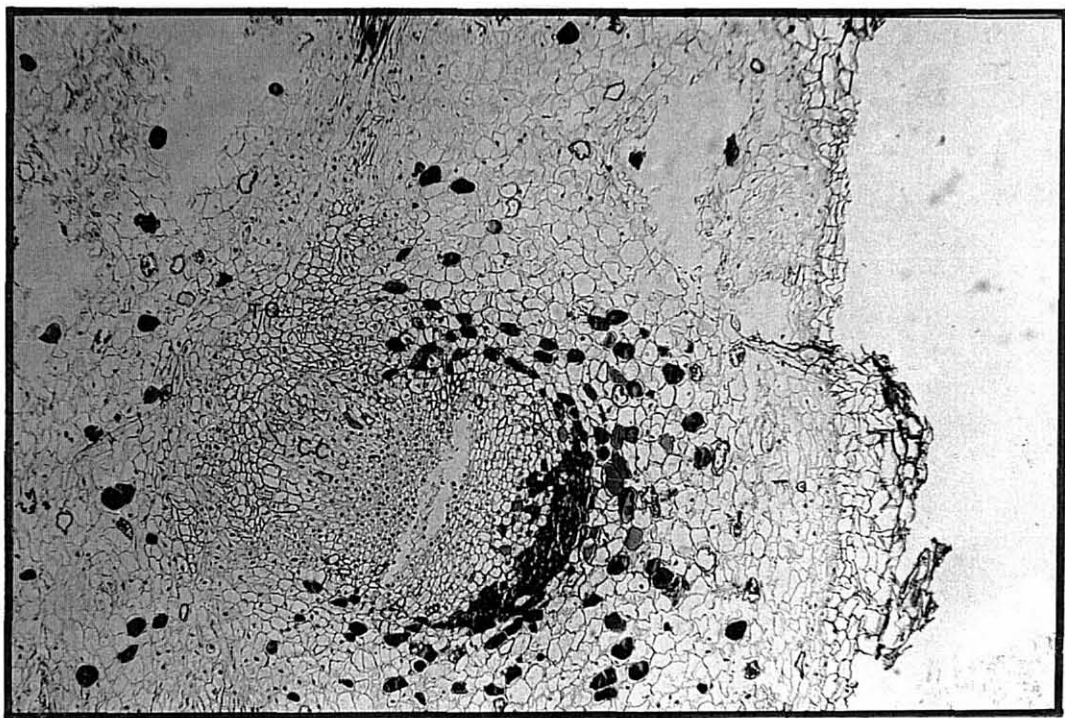


FIGURA 38. SECÇÃO TRANSVERSAL DE CALO DE ESTACA DE RAMO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO ANOS DE IDADE, COM O PRIMÓRDIO DE RAIZ EM INÍCIO DE ALONGAMENTO E NÍTIDA ORIGEM A PARTIR DO CÂMBIO QUE ENVOLVE UM NINHO DE TRAQUEÓIDES. 60X.

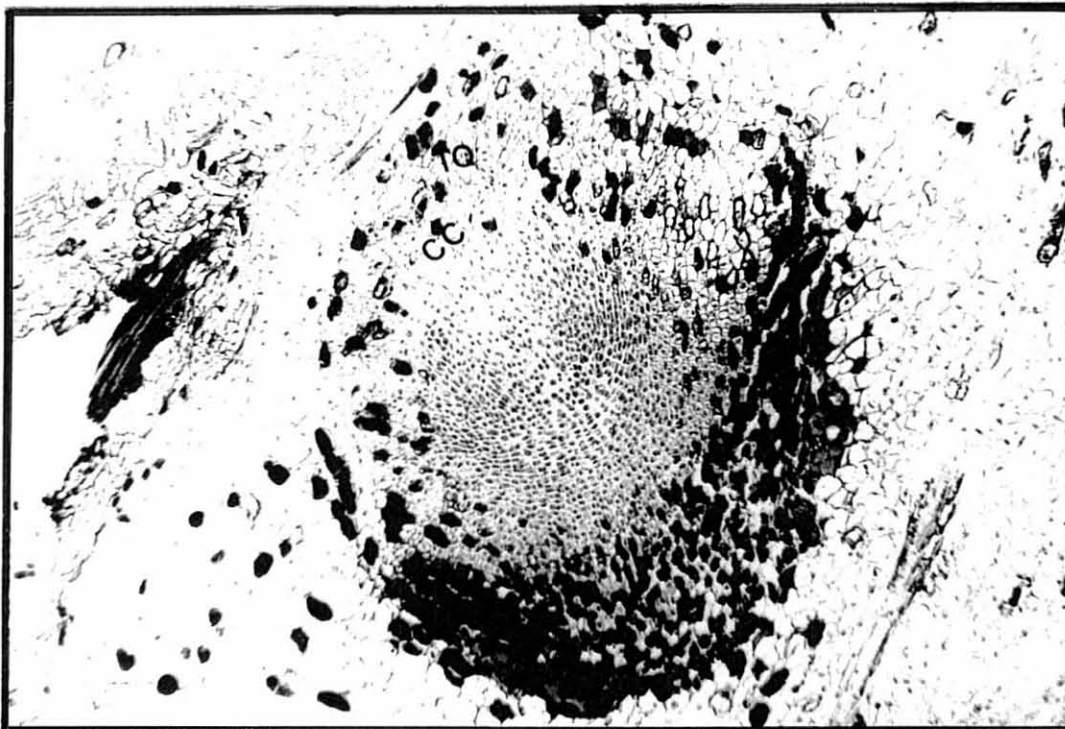


FIGURA 39. SECÇÃO TRANSVERSAL DE CALO DE ESTACA DE RAMO DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO ANOS DE IDADE, COM O PRIMÓRDIO DE RAIZ EM FASE DE ALONGAMENTO E ZONEAMENTO HISTOLÓGICO. 60X.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. Os pré-tratamentos com o fungicida Benlate (6 g/l), aplicados após a desidratação das mudas de *Araucaria angustifolia* de dois-três meses de idade, foram eficientes como meio auxiliar na obtenção da assepsia dos segmentos caulinares tratados com NaOCl (5-6% de cloro livre), 25%, por 40 a 50 minutos.
- 6.2. A concentração mineral total do meio de cultura básico de MURASHIGUE e SKOOG, 1962, teve influência significativa na formação e crescimento dos brotos axilares dos segmentos caulinares de mudas de *Araucaria angustifolia* de dois-três meses de idade, com melhor desempenho do teor total de N no número de brotos formados e do KNO₃ e das combinações do NH₄NO₃ e CaCl₂ e NH₄NO₃ com H₃BO₃, KH₂PO₄, KI, NaMoO₄.
- 6.3. A inclusão do manitol, 6g/l, aumentou a pressão osmótica do meio MS/2, que reduziu significativamente o número de brotos formados pelos segmentos caulinares de mudas de *Araucaria angustifolia* de quatro meses de idade.

- 6.4 Das citocininas utilizadas, a zeatina foi a que teve efeito significativo no estímulo da formação dos brotos axilares pelos segmentos caulinares da *Araucaria angustifolia* de dois-três meses de idade, na concentração de 0,24 mg/l e, meio básico MCM. Há necessidade de maiores estudos relativos a multiplicação *in vitro* da espécie usando segmentos caulinares, diversificando-se as concentrações e modos de aplicação das citocininas, principalmente da zeatina.
- 6.5 Os segmentos caulinares das mudas de *Araucaria angustifolia* de dois-três meses de idade, mostraram grande sensibilidade ao carvão ativado, às concentrações de 5, 10 e 20 g/l, que estimularam significativamente o crescimento dos brotos axilares formados, o alongamento das gemas apicais das mudas de dois-três meses de idade e o crescimento dos brotos dominados subcultivados.
- 6.6 O ácido giberélico, 2 mg/l, em interação com o carvão ativado, 5 g/l, mostrou atuação significativa no estímulo do alongamento das gemas apicais de mudas de 2-3 meses.
- 6.7 A composição do meio básico MS/2, apresentou efeito significativo no estímulo do alongamento das gemas apicais das mudas de dois-três meses de idade da *Araucaria angustifolia*, quando comparado ao meio MCM, e em associação com o carvão ativado.

- 6.8 O enraizamento dos brotos axilares das mudas *Araucaria angustifolia* de dois-três meses de idade, obtidos *in vitro*, foi estimulado pelos tratamentos indutivos com o ácido indol-3-butírico, 6 e 12 mg/l, por 6 e 12 dias, em meio básico solidificado, contendo somente 30 g/l de sacarose; a emergência e o desenvolvimento das raízes ocorreram em meio básico MS/2 ou MS/4, com duas fases, uma inferior composta pelo meio puro, e outra superior composta pela mistura do meio com vermiculita. A vermiculita quebrou a continuidade do meio solidificado e propiciou a formação de calos basais menores e mais compactos, mais adequados à formação das raízes.
- 6.9 Embriões maduros da *Araucaria angustifolia* não foram competentes para a organogênese (cotilédones e hipocótilos) em função dos tratamentos contínuos (2 - 10 mg/l) ou tratamentos indutivos (10 - 150 mg/l) com a 6-benzilaminopurina, cinetina e isopenteniladenina.
- 6.10 O meristema apical dos embriões maduros da *Araucaria angustifolia* multiplicou-se em baixas porcentagens (4 a 8%) com os tratamentos indutivos com as citocininas benzilaminopurina, cinetina e isopenteniladenina (10-150 mg/l).

- 6.11 Verificou-se ser viável o rejuvenescimento *ex vitro* dos indivíduos adultos da espécie, através do efeito cascata por enxertias (garfagem em fenda terminal) em mudas de *Araucaria angustifolia* de dois-três meses de idade, e em condições ambientais controladas de temperatura e umidade relativa ($17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60%-90%).
- 6.12 Foi obtido o armazenamento das mudas de *Araucaria angustifolia* de dois meses de idade, com a inibição do crescimento, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pelo período de 6 meses, para a utilização na entressafra, em laboratório ou enxertias.
- 6.13 Com a média de 80% de germinação, foi bem sucedido o armazenamento das sementes de *Araucaria angustifolia* em freezer, a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pelo período de 6 meses, para a produção de mudas na entressafra, para uso em laboratório ou enxertias.
- 6.14 O estudo anatômico da organização e dos meristemas residuais ortotrópicos do caule em brotos, revelou que a capacidade de regeneração da *Araucaria angustifolia* é alta, devido a rapidez do processo (15 dias), e da desdiferenciação das células do córtex para originar o tecido pró-vascular de conexão entre os brotos em desenvolvimento e o segmento caulinar.

- 6.15 Comprovou-se a formação de raízes funcionais a partir de tecidos pró-vasculares do calo, que possibilitaram boa sobrevivência e o bom desenvolvimento das plântulas obtidas *in vitro* e transplantadas para o solo.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABOEL-NIL, M.M. Tissue culture of douglas-fir and Westen North American conifers. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. v.3, p. 80-100. 1987.
- AHUJA, M.R. In vitro propagation of poplar and aspen. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. v.3, p. 261-271. 1987.
- AMMIRATO, Philip V.; STEWARD, F.C. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. **Bot. Gaz.** v. 132, p. 149-158. 1971.
- AMMIRATO, Philip V. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.) **Bot. Gaz.** v. 135, p. 328-337. 1974.
- AMMIRATO, Philip V. Hormonal control of somatic embryos development from cultured cells of caraway: interaction of abscisic acid, zeatin and giberellic acid. **Plant Physiol.** v. 59, p. 579-586. 1977.
- AMMIRATO, Philip V. Patterns of development in culture. In: **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**, HENKE, Randolph R.; HUGHES, Karen W.; CONSTANTIN, Milton J.; HOLLAENDER, Alexander. New York. Plenum Press. p. 9-22. 1985.
- ANON, F. Amazonia, onde está a verdade. **Veja**. São Paulo. v. I, nº 26, p. 4-7. 1989.
- ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Embryogeny of Gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 35, p. 1-35. 1993.
- ALVES, G.M. Métodos de germinação de *Araucaria angustifolia* (BERT) O. Ktze. Curitiba. 20 p. Mimeografado. 1965.
- BALL, E.A. Tissue culture multiplication of Sequoia. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. The Netherlands. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. v. 3, p. 146-158. 1987.
- BAGNI, N.; BIONDI, S. Polyamines. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht. p. 113-124. 1987.
- BARALDI, R.; ROSSI, F.; LESCARI, B. In vitro shoot development of *Prunus* GF 655-2: interaction between light and benzyladenine. **Physiol. Plant.** v. 74, p. 440-443. 1988.

- BATES, S.; PREECE, J.E.; NAVARRETE, N.E.; VAN SAMBECK, J.W.; GAFFNEY, G.R. Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 31, p. 21-29. 1992.
- BEKKAOUI, F.; ARNAUD, Y.; LARRIEU, C.; MAGINIAC, E. Étude comparative de la rhizogenèse in vitro du *Sequoia sempervirens* chez deux clones d'âge différent. Ann. AFOCEL, 5-25P. 1983.
- BERGMANN, B.A.; STOMP, A.M. Effect of genotype on rooting of hypocotils and in vitro produced shoots of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 39, p. 195-202. 1994.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAM, M.K. **Plant Tissue Culture, Theory and Practice**. The Netherlands. Elsevier Science Publishers. 500 p. 1983.
- BIGOT, C.; ENGELMANN, F. Vegetative propagation in vitro of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb) Hook. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. v. 3, p. 114-127. 1987.
- BONGA, J.M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Tissue Culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 387-412. 1985.
- BONGA, J.M.; VON ADERKAS, P. In vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 236 p. 1992.
- BORNMAN, C.H. In vitro regeneration potential of the conifer phylomorph. In: Symposium on Clonal Forestry. Swedish. p. 43-56. 1981.
- BORNMAN, C. Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro. **Physiol. Plant**. 57. p. 5-16. 1983.
- BORMANN, C.H. *Picea abies*. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. v. 3, p. 2-29. 1987.
- BRASIL. Portaria 006/92-N de 15 de janeiro de 1992. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Jan. 1992.
- BREHPOL, D. A contribuição econômica da exportação da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze, à economia paranaense. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do genero *Araucaria*. Curitiba. p. 347-350. 1980.
- BOULAY, M. Conifer micropropagation: applied research and commercial aspects. In: BONGA, J. M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 185-206p. 1987.

- BROWN, A.G. Comparison of early growth in radiata pines, raised by cuttings from parents of different ages with that of seedlings trees. **Austr. For. Sci.** 6(3). p 43-47. 1974.
- BROWN, L.R. Outlining a global action plan in state of the world. **World Watch Inst.** New York. p. 174-184. 1989.
- BUDIMIR, S.; VUJICIC. R. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pancic) Purk. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 31, p. 89-94. 1992.
- BUSBACHER, R.J. Abandoned pasture land in Eastern Amazonia. II. Nutrients stocks in the soil and vegetation. **Journal of Ecology**. v. 31, p. 2-8. 1989.
- CAMPBELL, R.A.; DURZAN, D.J. Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca*. **Can. J. Bot.**, v. 53, p. 1652-1657. 1975.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies Florestais Brasileiras. Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. EMBRAPA-CNPQ. Colombo, PR. 640p. 1944.
- CARMAN, J.G. Embryogenic cells in plant cultures: occurrence and behaviour. **In Vitro Cell Dev. Biol.** v. 26, p. 746-753. 1990.
- CASSELS, A.C. Problems in tissue culture: contamination. In: DEBERGH, R.H.E.; ZIMMERMAN, P.C. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 31-44. 1991.
- CHALUPA, V. Organogenesis in Norway spruce and Douglas fir tissue cultures. Commun. Inst. Czechoslov. 10:"79-87p. 1977.
- CHALUPA, V. European Hardwoods. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht. The Netherlands. 207-223p. 1987.
- CHAMPAGNAT, P. Introduction à l'étude des complexes des correlations. Rev. Cyt. et Biol. Veg. 37: 175-208p. 1974.
- CHESIK, E.E.; MOHN, C.A.; HACKETT, W.P. Plantlet multiplication from white pine (*Pinus strobus* L.) embryos in vitro: bud induction and rooting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 26, p. 107-114. 1991.
- CHRISTIANSON, M.L; WARNICK, D.A. Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis. **Devel. Biol.** V. 101, P. 382-390. 1984.
- COLEMAN, G.D.; ERNST, S.G. Shoot induction competence and callus determination in *Populus deltoides*. **Plant Science**. Ireland. v. 71, p. 83-92. 1990.

- CUTTER, E.G. Anatomia Vegetal. Parte III. Órgãos. Experimentos e interpretação. Ed. Livraria Roca Ltda. São Paulo, 336 p.
- DAVID, A.; DAVID, H.; MATEILE, T. In vitro adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles. **Physiol. Plant.** v. 56, p. 102-107. 1982.
- DALGAS, K.F. Anatomical studies on cuttings of norway spruce (*Picea abies* L. Karst) undergoing the rooting process. **For. Tree Improvement.** 5. p. 503-20. 1982.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, O.; GROUT, B.; VON ARNOLD, S.; ZIMMERMANN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. v. 30, p. 135-140. 1992.
- DE GREEF, W.; JACOBS, M. *Plant Science Letters*, 17, 55. 1979.
- DEHBERG, P.C.; READ, P.E. **Micropropagation.** In: DEHBERG, P.C. e ZIMMERMANN, R.H. **Micropropagation. Technology and application.** Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 1-14. 1991.
- DE MARCH, G.; GRENIER, E.; MIANNAY, N.; SULMONT, G.; DAVID, H.; DAVID, A. Potential of somatic embryogenesis in *Prunus avium* immature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. v. 34. p. 209-215. 1993.
- DIETRICH, S.M.C. Inibidores do crescimento. In: FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal 2. Ed. Univ. São Paulo. São Paulo, p. 193-215. 1979.
- DODDS, J.R.; ROBERTS, L.W. *Experiments in Plant Tissue Culture.* Cambridge University Press. New York. 177p. 1982.
- DRUART, Ph.; DE WULF, O. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. 32. p. 97-99. 1993.
- DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. 40. p. 231-235. 1995.
- DUNSTAN, D.I.; THORPE, T.A. Regeneration in Forestry trees. In: VASIL, I.K. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics in Plants.** New York. Academic Press. v. 3. p. 223-241. 1986.
- DUNSTAN, D.; BEKKAOUI, F.; PILON, M.; FOWKE, L.C.; ABRAMS, S.R. Effects of abscisic acid and analogues in the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. **Plant Science,** Ireland. v. 58, p. 77-84. 1988.

- EBERT, A.; TAYLOR, H.F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 20. p. 165-172. 1990.
- EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2-4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 33. p. 157-162. 1993.
- ECONOMOU, A.S.; MALOUPA, E.M. Regeneration of *Elegnus angustifolia* from leaf segments of in vitro-derived shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 40. p. 285-288. 1995.
- ELLIS, D.D.; JUDD, R.C. SDS-PAGE analysis of bud forming cotyledons of *Pinus ponderosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 11, p. 57-65. 1987.
- ELLIS, D.D.; BILDERBACK, D.E. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds in vitro. **Amer. J. Bot.** v. 76(3), p. 348-355. 1989.
- ELLIS, D.D.; BARCZYNSKA, H.; McCOWN, B.H.; NELSON, N. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 27. p. 281-287. 1991.
- ELLIS, D.; WEBB, D.T. Light regimes used in conifer tissue culture. In: AHUJA, M.R. Micropropagation of Woody Plants Kluwer Acad. Publishers. The Netherlands. p. 31-56. 1993.
- ESAU, K. **Anatomia Vegetal**. Ediciones Omega, S/A. Barcelona, 779 p. 1972.
- FEARNISDE, P.M. Agroforestry in Brazil's Amazonian. Development Policy: the role and limits of a potential use for degraded lands. **Inst. Nac. Pesq. Amaz. INPA** Manaus. 1989.
- FINK, S. The occurrence of adventitious and preventitious buds within the bark of some temperate and tropical trees. **Amer. J. Bot.** 70(4), p. 532-542. 1983.
- FINSTAD, K.; BROWN, D.C.; JOY, K. Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 34, p. 125-132. 1993.
- FIOLA, J.A.; HASSAN, M.A.; SWARTZ, H.J.; BORS, R.H.; MCNICHOLS, R. Effect of thidiazuron, light fluence and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 20, p. 223-228. 1990.

- FOSTER, A.S. Practical Plant Anatomy. VAN NOSTRAND D. CO. New York, 450 p.
- FRANCLET, A.; BOULAY, M.; BEKKAOUI, F.; FOURET, Y.; VERSCHOORE-MARTOUZET, B.; WALKER, N. Rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. p. 232-248. 1987.
- FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANSTROM, L-E.; TAGE, E. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiol. Plant**. 43. p. 104-106. 1978.
- FUERKRANS, H.A.; NOWAK, C.A.; MAYNARD, C. Light effects on *in vitro* adventitious root formation in axillary shoots of mature *Prunus serotina*. **Physiol. Plant**. v. 80. p. 337-341. 1990.
- FUPEF/EMBRAPA. Diagnóstico setorial de madeira no Sul do Brasil: Consumo, utilização e destino da produção.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. **Exp. Cell Res.** 50, 151. 1968.
- GASPAR, TH.; KEVERS, C.; DEHBERCH, P.; MAENE, M.L. Vitrification: morphological and ecological aspects. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. p. 152-166. 1987.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. v. 1. Exegetics Ltd. England. p. 1 - 382. 1984.
- GEORGE, E.F. Plant Propagation by Tissue Culture. The Technology. Exegetics Ltd. England. 2d. Ed. 574p. 1993.
- GRIFFITH, A.S. The structure and growth of the shoot apex in *Araucaria*. **Amer. J. Bot.** 30. p. 253-262. 1952.
- GO, N.E.; PEREZ-OROZCO, G.D.; HALOS, S.C. *In vitro* response of embryos from different provenances of *Pinus caribaea* var. *Hondurensis*. Morelet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 32, p. 1-7. 1993.
- GUERRA, M.P. Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (PALMAE). São Paulo, Tese de Doutorado em Botânica. Instituto de Biocências. Universidade de São Paulo. 1989.
- GUERRA, M.P.; de LUCCA, P.; NIETSCHKE, S.; KEMPER, S. Biotecnologia de coníferas: indução e estabelecimento de linhagens celulares poliembriogênicas de *Araucaria angustifolia* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*. In: 1º Congresso Florestal Panamericano, 7º Congresso Florestal Brasileiro. Curitiba. Anais. V.1. p. 87-90. 1993.

- GULATI, A.; JAIWAL, P.K. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 29, p. 199-205. 1992.
- GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. **Eucaptytus**. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 385-299. 1987.
- GUPTA, P.K.; SHAW, D.; DURZAN, D.J. Loblolly pine: micropropagation, somatic embryogenesis and encapsulation. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 101-108. 1987.
- GURGEL, J.T.A.; GURGEL FILHO, C.A. Métodos de enxertia para o pinheiro brasileiro - *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze, visando a formação de pomares de sementes. **Silvicultura**. São Paulo. v. 6, p. 153-55, 1967.
- HACKETT, W.P. Juvenility and maturity. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, p. 216-231. 1987.
- HACKETT, W.P.; MURRAY, J.R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M.R. Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, p. 93-103. 1993.
- HAKMAN, I.; FOWKE, E.; LARRY, C.; VON ARNOLD, S. ERIKSSON, T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Science. v. 38, p. 53-59. 1985.
- HAKMAN, I.; VON ARNOLD, S. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). **J. Plant Physiol.** v. 121, p. 149-158. 1985.
- HAKMAN, I.; FOWKE, L.C. Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce) and *Picea mariana* (black spruce). **Can. J. Bot.**, v. 65, p. 656-659. 1986.
- HALOS, S.C. e GO, N.E. Micropropagation of *Pinus caribaea*. Morelet. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.** 146-408-410p. 1993.
- HALPERIN, W.; WETHERELL, D.F. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot *Daucus carota*. **Amer. J. Bot.** v. 51, p. 274-283. 1964.
- HANDRO, W.; FERREIRA, C.W. Preliminary report in tissue culture of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Bol. Bot. USP.** v. 8, p. 71-74. 1980.
- HANDRO, W. *Araucaria* (*Araucaria* spp.) In: BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees. I. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. p. 310-315. 1986.

- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. Propagacion de Plantas: principios y practicas. 3 ed. México. Continelta. 692 p. 1967.
- HEAMANS, J.C.; OWENS, J.W. Callus formation and root initiation in stem cuttings of Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. **Can. J. For. Res.** 121. p. 121-134. 1972.
- HORGAN, K. *Pinus radiata*. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry.** v. 3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 128-145, 1987.
- HORGAN, K. Micropropagation of *Pinus radiata*. In: **Cell and Tissue Culture in Forestry.** Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 128-145. 1987.
- HRISTOFOROGLU, K.; SCHMIDT, J.; NORDENKAMPF, H.B. Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands, v. 40, p. 277-284. 1995.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands, v. 33, p. 105-119. 1993.
- HUNAUULT, G.; MAATAR, A. Enhancement of somatic embryogenesis frequency by giberellic acid in fennel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands, v. 41, p. 171-176. 1995.
- IRITANI, C.; SOARES, R.V. Ação de reguladores do crescimento no enraizamento das estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Silvicultura.** Anais do 4º Congresso Florestal Brasileiro. Ano VIII. Campinas. p. 313-317. 1983.
- IRITANI, C.; GOMES, A.V.; SOARES, R.V. Aspectos morfológicos da ação de reguladores do crescimento em estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Acta Biol. Par.** v. 15(1,2,3,4). p. 1-20. 1986.
- ISIKAWA, H. In vitro culture of *Cryptomeria* callus and organs. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry.** v. 3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 109-113. 1987.
- JAIN, M.S.; DONG, N.; NEWTON, R.J. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos culture in vitro. **Plant Science.** Ireland. v. 65, p. 233-241, 1989.
- JELASKA, S. European pines. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry.** v.3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 42-60. 1987.

- JOHN, A.; WEBB, K.J. Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr). In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 30-42. 1987.
- JOLY, A.B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. Cia. Ed. Univ. São Paulo. São Paulo. 760 p. 1973.
- JORDAN, M. In vitro culture of *Prosopis* species. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 3. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers. p. 370-384. 1987.
- KAGEYAMA, P.Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. Rev. IPEF. n. 12, p. 95-102. 1975.
- KISS, J.; HESZKY, L.E.; KISS, E.; GYULAI, G. High efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther, filament and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 30, p. 59-64. 1992.
- KLEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**. Itajaí. v. 12, n. 12. 17-44p. 1960.
- KLEIN, R.M. Espécies raras ou ameaçadas de extinção do Estado de Santa Catarina. **Estudos de Biologia**. Curitiba, n.31. 3-9p. 1993.
- KNEIFEL, W.; LEONHARDT, A.W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 29, p. 139-144. 1992.
- KOMISSAROV, D.A. **Biological Basis for Propagation of Woody Plants by Cuttings**. Israel Program of Scientific Translation. 250 p. 1969.
- KRIKORIAN, A.D. e KANN, R.P. Aceptic multiplication of chinese tallow (*Sapium sekeliferum* (L.) Roxb). Culture in Forestry. v.3. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 357-369p. 1987.
- KURTÉN, U.; NUUTILA, A.M.; KAUPPINEN, V.; ROUSI, M. Somatic embryogenesis in cell cultures fo birch (*Betula pendula* Roth.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 23, p. 101-105. 1990.
- KVAALEN, H.; VON ARNOLD, S. Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 27, p. 49-57. 1991.
- LAINE, E.; DAVID, A. Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. **Plant Science**. Ireland. v. 69, p. 215-224. 1990.

- LAMBARDI, M.; HARRY, I.S.; MENABENI, D.; THORPE, T.A. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Cupressus sempervirens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 40, p. 179-182. 1995.
- LEEGER, A.D.; TRIPEPI, R.R. Rapid adventitious shoot regeneration from leaf explants of European birch. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 32, p. 123-129. 1993.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITES, W.M. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 29, p. 153-160. 1992.
- LELU, M.A.; BASTIEN, C.; KLIMASZEWSKA, K.; WARD, C.; CHAREST, P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): part I. Somatic embryo maturation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 36, p. 107-115. 1994.
- LLOYD, J.B.; MCCOWN, B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Proc. Intern. Plant Propagators Soc.** 30. p. 421-437. 1980.
- LU, CHIN-YI; THORPE, T.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca*. **J. Plant Physiol.** v. 129, p. 197-302. 1987.
- LUGO, A.E. Countering the effects of tropical deforestation with modern technology. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. Plenum Press. New York. p. 289-296, 1991.
- LUIR, J.R.; SINK, K.C.; DENNIS, F.G. Plant regeneration from apple seed lings explants and callus cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 2, p. 293-304. 1983.
- MACEDO, J.H.P. Possibilidade do controle integrado da lagarta da araucária, *Dirphia araucariae* Jones. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do gênero **Araucaria**. Curitiba. p. 255-257. 1980.
- MAENE, L.; DEHBERG, P. **Araucaria**. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v.3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 176-184. 1987.
- MALINOWSKI, J.P.; STÖR, G.W.D. Influência da poda radicular na qualidade de mudas de *Araucaria angustifolia* (Bert) Ktze. In: Problemas Florestais do gênero **Araucaria**. Curitiba. p. 207-216. 1980.

- MARKS, T.R. e SIMPSON, S.E. Changes in the competence of *Quercus robur* "fastigiata" to grow in vitro as affected by seedling rootstock and differential pruning. **J. Hort. Sci.** 68, p. 815-824. 1993.
- MARLAND, G. The prospect of solving the CO₂ problem through global reforestation. **Dept. of Energy**. Office of En. Res. Report. DOE/NBB 0082, TR039. Washington D.C. 1988.
- MCCOWN, B.M.; SELLMER, J.C. General media and vessels for woody plant culture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 4-16. 1987.
- MCGRANAHAN, J.H.; DRIVER, J.A.; TULECKE, W. Tissue culture of *Juglans*. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 261-271. 1987.
- MEHRA-PALTA, A.; THOMPSON, D.G. Tissue Culture of eastern North American Pines. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 61-79. 1987.
- MERKLE, S.A.; HOEY, M.T.; WATSON-PAULEY, A.; SCHLARBAUM, S.E. Propagation of *Liriodendron* hybrids via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 34, p. 191-198. 1993.
- METIVIER, J.R. Citocininas. In: FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal 2. Univ. São Paulo. São Paulo, p. 93-128. 1979.
- METIVIER, J.R. **Giberelinas**. In: FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal 2. Univ. São Paulo. p. 129-161. 1979.
- MINOCHA, S.C. Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (*Pinus strobus*). **Can. J. Bot.**, v. 58. p. 366-370, 1980.
- MINOCHA, S.C. pH of the medium and the growth and the metabolism of cells in culture. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 1. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 50-66p. 1987.
- MONTEIRO, R.F.R.; SPELTZ, R.M. Ensaio de 24 procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do gênero **Araucaria**. Curitiba. p. 181-200. 1980a.
- MONTEIRO, R.F.R.; CORDEIRO, J.A.; CORDEIRO, L. Ensaio preliminar sobre tratamento da semente de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. para o combate à *Laspeyresia araucariae*. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do gênero **Araucaria**. Curitiba. p. 259-264. 1980b.
- MURASHIGUE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco culture. **Physiol. Plant**. 15: 473-497p. 1962.

- NANDWANI, D.; RAMAWAT, K.G. High frequency plantlets regeneration from seedlings explants of *Prosopis tamarugo*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 29, p. 173-178. 1992.
- NEUMAN, M.C.; PREECE, J.E.; VAN SABEEK, J.W.; GAFFNEY, G.R. Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 32, p. 9-18. 1993.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. **Science**. 169. 85. 1969.
- NUUTILA, A.M.; KURTEN, U.; KAUPPINEN, V. Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roth) callus cultures: a statistical approach. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v. 24, p. 73-77. 1991.
- OZIAS-AKINS, P. e VASIL, I.K. Nutrition of Plant Tissue Cultures. In: VASIL, I.K. Cell and Somatic Cell Genetics of Plants. v.2. Academic Press Inc. London. 150-201p. 1985.
- OWENS, L.D. Kamamycin promotes morphogenesis of plant tissues. **Plant Science Letters**. v. 16. p. 225-230.
- PARANJOTHY, K. Hevea tissue culture. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v. 3. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. p. 326-337. 1987.
- PENCHEL, R.M.; KIRBY, E.G. Organogenesis in cultures of juvenile explants of *Araucaria angustifolia* and *A. heterophylla*. Abst. 6th Int. Congr. Plant Tissue Culture. Minneapolis, n. 309. 1986.
- PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; SOMMER, H.E. Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliottii* (Engelmann) embryos cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 11, p. 25-35. 1987.
- PETERS, C.M. Valuation of an Amazonian rainforest. **Nature**. v. 339. p. 655--6. 1989.
- PHILIPS, R.; ARNOTT, S.M.; KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture:-rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant culture of *Helianthus tuberosus*. **Plant Science Letters**, 21, p. 235-240, 1981.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers, 343 p. 1987.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers, 343 p. 1991.

- PILASI, E.W.V. Ecological importance of natural and artificial stands of *Araucaria* in the Northeastern landscape of Argentina. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do gênero *Araucaria*. Curitiba. p. 102-111. 1980.
- PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; ASHBY, W.C. e ROTH, P.L. Micro and cutting propagation of *Silver maple*. I. Results with adult and juvenile propagules. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 116, p. 149-155. 1991.
- PULIDO, C.M.; HARRY, I.S.; THORPE, T.A. Optimization of bud induction on cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 29, p. 247-255. 1992.
- QUEIRÓZ, S.M.P. Aspectos legais e institucionais dos Estudos e Relatórios de Impacto Ambiental. In: Seminário sobre Avaliação e Relatórios de Impacto Ambiental FUPEF. Curitiba. p. 13-17. 1989.
- RADOJEVIC, L. Plant regeneration of *Aesculus hippocastanum* L. (horse chestnut) through somatic embryogenesis. **J. Plant. Physiol.** v. 132, p. 322-326. 1988.
- RAHMAN, S.M.; HOSSAIN, M.; BISWAS, B.K.; JOARDERS, O.I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of mature tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 32, p. 363-365. 1993.
- RAMOS, A. e CARNEIRO, J.G.A. Alterações fisiológicas em sementes da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze), armazenadas após secagem em estufa. In: **Anais do II Congresso Florestal do Paraná**. Curitiba. 628-643p. 1988.
- RANCILLAC, M.; FAYE, M.; DAVID, A. In vitro rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster*. **Physiol. Plant.** 56: 97-101p. 1982.
- REINES, M.; MCALPINE, R.G. The morphology of normal callused and rooted dwarf shoots of slash pine. **Botanical Gazette**. 12(2). p. 118-124. 1959.
- ROBERTS, J.A.; HOOLEY, R. Plant Growth Regulators. Chapman and Hall. New York. 190 p. 1988.
- ROSILLO-CALLE, F. A reciclagem do CO₂ por biomassa; bioprodutividade global e problemas de desmatamentos. In: Espaço, Ambiente e Planejamento. Cia. Vale do Rio Doce. GEAMAN, v. 2. nº 12. 40 p. 1990.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* - a multipurpose leguminous tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 42, p. 283-285. 1995.

- SAEBO, A.; KREKLING, T. e APPELGREN, M. Influence of light quality on in vitro photosynthesis, leaf morphometry, leaf anatomy and field performance in micropropagated *Betula pendula* Rooth. **Acta Hort.** 327, p. 97-98. 1992.
- SALATI, E.; NOBRE, A.A. Possible climatic impacts from tropical defforestation. Univ. São Paulo. Piracicaba. Manuscrito. Não Publ. 1989.
- SANTOS, I.; SALEMA, R. Penicillins and activity of nitrogen metabolism enzymes in plant tissue cultures. **Plant Science**, 59. p. 119-125. 1989.
- SHIMIZU, J.Y.; HIGA, A.R. Variação genética entre procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., estimada até o 6º ano de idade. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do gênero *Araucaria*. Curitiba. p. 78-82. 1980.
- SIGMA CHEM. CO. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. St. Louis. Missouri. USA. 2511 p. 1995.
- SPELTZ, R.M.; MONTEIRO, R.F.R.; CORDEIRO, J.A. Padrão de mudas para o plantio de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do gênero *Araucaria*. p. 201-206. 1980.
- SRIVASTAVA, P.S.; STEINHAEUER, A.; GLOCK, H. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch - *Betula pendula* Roth. **Plant Science**. v. 42. p. 209-214. 1985.
- STRAIN, B. Direct effect of increasing CO₂ on vegetation. **U.S. Dept. of Energy**. DOE/ER 0239. Whashington. 1985.
- SUHREMA, SUPERINTENDÊNCIA DE RECURSOS HIDRICOS E MEIO AMBIENTE Relatório de Impacto Ambiental: Reativação da Unidade Industrial de Papel e Celulose de Morro Verde S/A. Grupo Industrial Trombini. Engelmin Eng. e Geol. Ltda. v. 1., v. 2. 466 e 242 p. 1989.
- SUHREMA, SUPERINTENDÊNCIA DE RECURSOS HIDRICOS E MEIO AMBIENTE Relatório de Impacto Ambiental: Unidade Ind. de Celulose, Pasta de Alto Rendimento (CTMP) e Papel. INPACEL, Ind. de Papel e Celulose. Arapoti, Paraná. Engelmin. Eng. e Geol. Ltda. 169. 1989.
- SUHREMA, SUPERINTENDÊNCIA DE RECURSOS HIDRICOS E MEIO AMBIENTE Proj. FJ M - 01. Povinho de São Jorge. Campo Largo. Paraná. PLANNA - Plano Ambiental e Biotecnologia. 139 p. 1988.
- SUHREMA, SUPERINTENDÊNCIA DE RECURSOS HIDRICOS E MEIO AMBIENTE Relatório de Impacto Ambiental: Usina Hidrelétrica de Segredo. Rio Iguaçu. Paraná. MDK Eng. Prog. Ltda. Jul/87. 185 p.
- SUITER FILHO, W. Conservação de sementes de *Araucaria angustifolia*. Piracicaba. ESALQ. 1966. 15 p.

- TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Can. J. Bot.** v. 60, p. 1873-1899. 1991.
- TEASDALE, R.D. Micronutrients. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. v.1. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 17-49p. 1987.
- THOMPSON, M.K.; THORPE, A. Metabolic and non metabolic roles of carbohydrates. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 89-112. 1987.
- THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEHBERG, P.C. e ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation. Technology and application**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 311-336. 1991.
- THURSTON, K.C.; SPENCER, S.J.; ARDITTI, J. Phytotoxicity of fungicides and bactericides in orchid culture media. **Amer. J. Botany**. v. 66, nº 7, p. 825-835. 1979.
- TREMBLAY, F.M. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from seeds of *Picea glauca*. **Can. J. Bot.** v. 68, p. 236-242. 1990.
- TREMBLAY, L.; TREMBLAY, F. Effect of gelling agents ammonium nitrate and light on the development of *Picea mariana* Mill. B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg, (red spruce) somatic embryos. **Plant Science**. v. 77. p. 233.-242. 1991.
- TREMBLAY, L.; TREMBLAY, F. M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce *Picea mariana* (Mill) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 27, p. 95-103. 1991.
- TRIP, P.; KROTKOV, G; NELSON, C.D. Metabolism in Higher plants. **Amer. Jour. Bot.** 51(8). p. 828-835. 1964.
- TULECKE, W.; MCGRANAHAN, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. **Plant Science**. Ireland. v. 40. p. 57-63. 1985.
- VÁLIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal 2. Ed. Univ. São Paulo. São Paulo, p. 39-72. 1979.
- VALOBRA, C.P.; JAMES, D.J. In vitro shoot regeneration from leaf discs of *Betula pendula*, Alecarlica, EM 85. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 21, p. 51-55. 1990.

- VELIKY, I.A.; ROSE, D. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. **Can. J. Bot.** 51 p. 1837-1845. 1973.
- VERHAGEN, S.A.; WANN, S.R. Norway spruce somatic embryogenesis: high-frequency initiation from light-cultured mature embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. v. 16, p. 103-111. 1989.
- VIEITEZ, F.J.; SAN-JOSE, M.C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. **J. Plant Physiol.** v. 136, p. 253-256. 1990.
- VITÉ, J.P. Pests of **Araucaria**: risk and management. In: SIMPÓSIO IUFRO. Problemas Florestais do gênero Araucaria. Curitiba. p. 249-251. 1980.
- YEOMAN, M.M.; MACLEOD, A.J. Tissue (Callus) Culture Techniques. In: STREET, H.E. **Plant Tissue and Cell Culture.** Blackwell Scientific Publications. Oxford. p. 31-60. 1977.
- YOUNG, P.M.; HUTCHINS, A.S.; CANFIELD, M.L. Use of antibiotics to control bacteria in shoots of woody plants. **Plant Sci. Letters.** v. 34. p. 203-209. 1984.
- WERNICKE, W. PARK, H-Y. The apparent loss tissue culture competence during leaf differentiation in yams (*Dioscorea bulbifera* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. v. 34, p. 101-105. 1993.
- WINTON, L.L.; VERHAGEN, S.A. Shoots from Douglas-fir cultures. **Can. J. Bot.** v. 53, p. 1246-1250. 1976.
- WOODWELL, G.M. Global deforestation: contribution to atmospheric CO₂. **Science.** v. 222. p. 1081-1086. 1989.
- ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Tissue Culture in Forestry.** Martinus Nijhoff/ Dr. JUNK Publ. Dordrecht. p. 231-255. 1985.
- ZANETTE, F.; IRITANI, C.; PAULA, S.R. Aspectos básicos da cultura in vitro da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares. **Rev. Setor Ciênc. Agr.** v. 9. p. 7-13. 1987.
- ZEL, J.; GOGALA, N.; CAMLOH, M. Micropropagation of *Pinus sylvestris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. v. 14. p. 169-175. 1988.
- ZHOU, J.; MA, H.; GOU, F.; LOU, X. Effect of thidiazuron on somatic embryos of *Cayratia japonica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** The Netherlands. v. 36, p. 73-79. 1994.

ZIMMERMAN, R.H. Application of tissue culture propagation to woody plants. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. Plenum Press. New York. p. 165-178. 1985.

APÊNDICE

TABELA 41. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS, NO NÚMERO DE BROTO FORMADOS PELOS EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.

F.V	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	10	1,41	0,141	2.052*	1,91
Erro	209	14,37	0,065		
Total	219	15,701	0,072		

C.V. = 17,67%

TABELA 42. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES MINERAIS DO MEIO MS, NO CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS EM EXPLANTES SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.

F.V	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	10	2,818	0,282	4,560*	1,91
Erro	209	12,917	0,062		
Total	219	15,735	0,072		

C.V. = 17,02%

TABELA 43. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE BROTAÇÃO DOS EXPLANTES CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE QUATRO MESES DE IDADE, CONFORME POSIÇÃO NO CAULE E PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO MS/2.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	11	3,301	0,300	2,058*	1,91
A	3	2,451	0,817	5,604*	2,68
B	2	0,467	0,233	1,601	3,07
AB	6	0,383	0,064	0,438	2,17
Erro	121	17,644	0,146		
Total	143	28,320	0,198		

C.V. = 25,01%

TABELA 44. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, CARVÃO ATIVADO 5 G/L NO ÍNDICE DE BROTAÇÃO DE 2 TIPOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	31	9,899	0,319	0,497	1,55
A	3	2,234	0,745	1,159	2,68
B	1	0,611	0,611	0,951	3,92
C	1	0,386	0,366	0,600	3,92
AB	3	1,116	0,372	0,579	2,68
AC	3	2,383	0,461	0,717	2,68
BC	1	0,075	0,075	0,116	3,92
ABC	3	0,960	0,320	0,498	2,68
D	1	0,492	0,492	0,765	3,92
AD	3	0,414	0,138	0,215	2,68
BD	1	0,353	0,353	0,549	3,92
CD	1	0,099	0,099	0,153	3,92
ABD	3	0,298	0,099	0,155	2,68
ACD	3	1,011	0,337	0,525	2,68
BCD	1	0,294	0,294	0,458	3,92
ABCD	3	0,172	0,057	0,089	2,68
Erro	186	119,599	0,643		
Total	223	132,227	0,593		

C.V. = 32,26%

TABELA 45. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L), MEIOS MS/2 E MCM, E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS DOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	15	7,5246	0,5016	4,238*	1,84
A	1	5,0692	5,0692	42,838**	4,00
B	3	0,3204	0,1068	0,902	2,76
C	1	0,1617	0,1617	1,366	4,00
AB	3	0,6003	0,2001	1,691	2,76
AC	1	1,1137	1,1137	9,409*	4,00
BC	3	0,0581	0,194	0,164	2,76
ABC	3	0,2011	0,0670	0,566	2,76
Erro	75	0,8771	0,1184		
Total	90	16,4016	0,1787		

C.V. = 30,33%

TABELA 46. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DO MEIO MCM, DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,08 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	7	1,500	0,214	1,875	2,33
A	1	0,715	0,715	6,263*	4,17
B	3	0,207	0,069	0,604	2,92
AB	3	0,577	0,192	1,684	2,92
Erro	35	3,998	0,114		
Total	42	5,4970	0,128		

TABELA 47. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO MEIO MS/2, CITOCININAS BA, Z E KIN (0,08 MG/L) E CARVÃO ATIVADO 5 G/L, NO CRESCIMENTO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	7	5,863	0,838	6,180*	2,33
A	1	5,468	5,468	40,336*	4,17
B	3	0,172	0,057	0,422	2,92
AB	3	0,224	0,075	0,551	2,92
Erro	35	4,744	0,136		
Total	42	10,600	0,230		

C.V. = 31,33%

TABELA 48. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DOS MEIOS MS/2 E MCM, DAS CITOCININAS (0,24 MG/L) BA, KIN E Z, CARVÃO ATIVADO (5 G/L), NO NÚMERO DOS BROTOS FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	11	30,5000	2,7727	4,1590*	2,75
A	1	1,5000	1,5000	2,250	4,75
B	2	9,7500	4,8750	7,313**	3,89
C	1	0,0000	0,0000	0,000	4,75
AB	2	9,2500	4,6250	6,938*	3,89
AC	1	0,6667	0,6667	1,0000	4,75
BC	2	9,2300	4,6250	6,4380*	3,89
ABC	2	0,8333	0,0417	0,6630	3,89
Erro	12	8,0000	0,6667		
Total	23	38,5000	1,6739		

C.V. = 12,09%

Fatores:- A = carvão ativado; B = citocininas; C = meios básicos.

TABELA 49. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO MEIO MS/2, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NA FORMAÇÃO DE BROTOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	5	5,750	1,150	2,399	5,05
A	1	0,083	0,083	0,172	6,61
B	2	0,500	0,250	0,517	5,79
AB	2	5,167	2,583	5,345	5,79
Erro	5	2,417	0,483		
Total	10	8,167	1,114		

C.V. = 10,29%

Fatores: - A - carvão ativado
B - citocininas

TABELA 50. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO MEIO MCM, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO NÚMERO DE BROTO FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICIAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	5	24,750	4,950	17,411**	5,05
A	1	2,083	2,083	7,353*	6,61
B	2	18,500	9,250	32,647**	5,79
AB	2	4,167	2,083	7,353*	5,79
Erro	5	1,417	0,283		
Total	10	26,167	2,386		

C.V. = 7,80%

TABELA 51. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DOS MEIOS MS/2 E MCM, CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24, MG/L) E CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICIAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	11	3,6570	0,3325	1,274	2,85
A	1	1,1528	1,1528	4,417	4,84
B	2	0,2346	0,1173	0,449	3,98
C	1	0,3901	0,3901	1,495	4,84
AB	2	0,6106	0,3053	1,170	3,98
AC	1	0,1768	0,1768	0,677	4,84
BC	2	0,6643	0,3322	1,272	3,98
ABC	2	0,4276	0,2138	0,819	3,98
Erro	11	2,8712	0,2610		
Total	22	6,1263	0,2879		

C.V. = 31,16%

Fatores:- A = carvão ativado (0,5 g/l);
 B = citocininas (BAP, Z e Kin)
 C = meios básicos (MS/2 e MCM).

TABELA 52. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MEIO MS/2, DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DE BROTO FORMADOS EM SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	5	1,367	0,273	0,751	5,05
A	1	0,213	0,213	0,586	6,61
B	1	0,352	0,176	0,483	5,79
AB	2	0,802	0,401	1,101	5,79
Erro	5	1,820	0,364		
Total	10	3,1870	0,301		

Fatores: A = carvão ativado; B = citocininas.

TABELA 53. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DO MEIO MCM, DAS CITOCININAS BA, KIN E Z (0,24 MG/L) E DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTO FORMADOS NOS SEGMENTOS SUBAPICAIS DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	5	1,900	0,380	4,551	5,05
A	1	1,116	1,116	13,369*	6,61
B	2	0,147	0,274	3,277	5,79
AB	2	0,237	0,118	1,417	5,79
Erro	5	0,417	0,083		
Total	10	2,318	0,266		

C.V. = 19,11%

Fatores: A = carvão ativado; B = citocininas.

TABELA 54. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA SOBREVIVÊNCIA DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, EM MS/2, SEM E COM CARVÃO ATIVADO (10 G/L), GA₃ (2 MG/L), BA (0,1 E 0,2 MG/L), AIB (3 E 6 MG/L).

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	27	33,857	1,254	3,477*	1,65
A	13	27,107	2,085	5,781*	1,92
B	1	0,571	0,571	1,584	4,00
AB	13	6,179	0,475	1,318	1,92
Erro	81	29,214	0,361		
Total	108	63,071	0,5840		

C.V. = 13,45%

TABELA 55. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE, EM MS/2, SEM E COM CARVÃO ATIVADO (10 MG/L); GA₃ 2 MG/L; BA 0,1 E 0,2 MG/L; AIB 3 E 6 MG/L.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	27	182,027	6,742	18,154**	1,65
A	13	12,152	0,935	2,517	1,92
B	1	153,223	153,223	412,598**	4,00
AB	13	16,652	1,281	3,449*	1,92
Erro	81	30,080	0,371		
Total	108	212,107	1,9640		

C.V. = 45,80%

TABELA 56. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DOS MEIOS BÁSICOS MS/2 E MCM, CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) NO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE. (ALTURA EM CM).

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	3	2,606	0,869	8,193*	3,49
A	1	2,113	2,113	19,929**	4,75
B	1	0,312	0,312	2,948	4,75
AB	1	0,181	0,181	1,703	4,75
Erro	12	3,8780	0,2585		
Total	15				

C.V. = 7,40%

Fatores: A:- meios (MS/2 e MCM) - B:- Ácido Giberélico (0,2 mg/l)

TABELA 57. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DO MEIO MCM, DO CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) NO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	1	0,009	0,009	0,126	7,71
Erro	4	0,286	0,072		
Total	5	0,2950			

TABELA 58. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DO MEIO MS/2, CARVÃO ATIVADO (5 G/L) E ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) NO ALONGAMENTO DAS GEMAS APICAIS DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	1	0,484	0,484	9,878*	7,71
Erro	4	0,196	0,049		
Total	5	0,680			

TABELA 59. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DO CARVÃO ATIVADO (10G/L) E DO ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) EM MS/2 NO CRESCIMENTO DOS BROTO DOMINADOS DOS SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	2	3,62	1,81	60,33**	3,32
Erro	33	0,89	0,03		
Total	35	4,51			

C.V. = 15,33%

TABELA 60. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÁCIDO GIBERÉLICO (2 MG/L) EM MEIO MS/2 COM CARVÃO ATIVADO (10 G/L) NO CRESCIMENTO DOS BROTO DOMINADOS DOS SEGMENTOS CAULINARES DE MUDAS *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.

FV	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	2	0,021	0,010	0,25	3,44
Erro	22	0,89	0,040		
Total	24	0,911	0,050		

C.V. = 14,81%

TABELA 61. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA TEMPERATURA (4 °C) NO CRESCIMENTO DAS MUDAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DOIS-TRÊS MESES DE IDADE.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat	2	488,682	244,341	341,072**	4,26
Erro	9	6,448	0,716		
Total	11	459,129	45,012		

C.V. = 13,21%

TABELA 62. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO ARMAZENAMENTO, POR 4,5 E 5,5 MESES A -2 °C, NO ÍNDICE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DE DUAS PROCEDÊNCIAS.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat.	1	67,00	67,00	3,030	7,71
Erro	4	88,00	22,111		
Total	5	155,443	31,089		

C.V. = 5,65%

TABELA 63. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA PROCEDÊNCIA, NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* SUBMETIDAS AO ARMAZENAMENTO A -2 °C, POR 4,5 E 5,5 MESES.

F.V.	gl	SQ	QM	F	F 0.5
Trat.	1	65,142	65,142	3,93	7,71
Erro	4	66,206	16,552		
Total	5	131,348	26,270		

C.V. = 4,89%