

LUCIENE SOARES VICENTINI

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "IN VITRO" DE IMBUÍA
(*Ocotea porosa* Nees) E SASSAFRÁS
(*Ocotea odorifera* Vellozo)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Florestais no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette

CURITIBA

1995

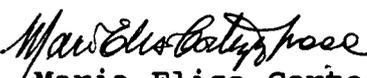
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

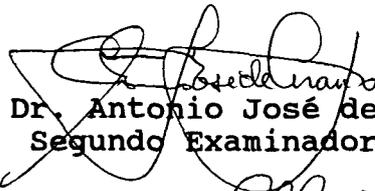
P A R E C E R

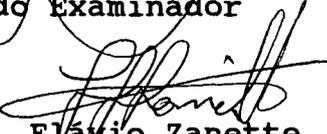
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata **LUCIENE SOARES VICENTINI**, sob o título "**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "IN VITRO" DE IMBUIA (*Ocotea porosa* Nees) E SASSAFRÁS (*Ocotea odorifera* Velloso).**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, área de concentração em **SILVICULTURA**.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação com média final: (8,2), correspondente ao conceito: (3).

Curitiba, 1º de setembro de 1995


Pesq. Dra. Maria Elisa Cortezzi Graça
Primeira Examinadora


Prof. Dr. Antonio José de Araujo
Segundo Examinador


Prof. Dr. Flávio Zanette
Orientador e Presidente da Banca



LUCIENE SOARES VICENTINI

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "IN VITRO" DE IMBUIA (*Ocotea porosa* Nees) E
SASSAPARÍL (*Ocotea odorifera* Vellozo)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Flávio Zanette

Curitiba
1995

Aos meus pais,
RONALDO e LEONOR,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Flávio Zanette, pela orientação na realização deste trabalho.

À Prof^a Cecília Iritani, pela amizade, apoio e dedicação na co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio José de Araujo, pelas valiosas sugestões e apoio.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Viana Soares pelo incentivo, apoio e orientação nas análises estatísticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no início do curso.

Ao Prof. Cícero Deschamps, pelas valiosas sugestões.

À Prof^a Dr^a Yoshiko Saito Kuniyoshi pelo empréstimo de material bibliográfico.

À Dra. Graciela I. B. de Muñiz e ao Eng^o Florestal Denys Dozza pelo auxílio na preparação das transparências para a defesa.

Aos funcionários do Laboratório de Micropropagação Vegetal da UFPR, Joel Coradin e Gilmar de Oliveira pelos auxílios prestados.

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Agrárias da UFPR pela revisão das referências bibliográficas.

Ao Parque Estadual de Vila Velha, pelo auxílio na coleta de material.

Ao IAPAR de Ponta Grossa pela concessão de material.

Aos amigos e colegas do curso de Pós-Graduação pela amizade e apoio.

À minha família pelo apoio e amizade.

Ao meu marido, Fábio, pela paciência e estímulo.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	vii
	LISTA DE FIGURAS.....	ix
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
	RESUMO.....	xii
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivos.....	3
1.1.1	Objetivo Geral.....	3
1.1.2	Objetivos Específicos.....	3
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1	Descrição das Espécies.....	5
2.1.1	<i>Ocotea porosa</i>	5
2.1.2	<i>Ocotea odorifera</i>	6
2.2	Propagação Vegetativa de Lauraceas.....	8
2.3	Cultura de Tecidos.....	11
2.4	Micropropagação.....	12
2.5	Meios Nutritivos e Reguladores de Crescimento.....	13
2.6	Obtenção dos Explantes.....	16
2.7	Contaminação e Oxidação.....	17
2.8	Multiplicação das Brotações.....	18
2.9	Alongamento das Brotações.....	21
2.10	Enraizamento das Brotações.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Condições Ambientais da Cultura.....	24

3.2	Meios de Cultura e Recipientes.....	25
3.3	Delineamento Experimental.....	25
3.4	Fonte de Explantes.....	28
3.5	Desinfestação e Isolamento do Material Vegetal.....	31
3.6	Controle da Oxidação.....	32
3.7	Multiplicação das Brotações.....	32
3.8	Alongamento das Brotações.....	33
3.9	Enraizamento das Brotações.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Desinfestação do Material.....	35
4.2	Controle da Oxidação.....	40
4.3	Multiplicação das Brotações.....	44
4.4	Alongamento das Brotações.....	48
4.5	Enraizamento das Brotações.....	50
5	CONCLUSÕES.....	56
	SUMMARY.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
	APÊNDICE.....	65

LISTA DE TABELAS

1. Efeito da concentração de hipoclorito de sódio e período de exposição na desinfestação de segmentos nodais de *Ocotea porosa*..... 35
2. Efeito da concentração de hipoclorito de sódio e tempo de exposição na desinfestação de segmentos nodais de *Ocotea odorifera*..... 37
3. Análise de variância dos resultados do experimento para o controle da oxidação nos explantes de *Ocotea porosa*..... 42
4. Análise de variância dos resultados do experimento para controle da oxidação nos explantes de *Ocotea odorifera*..... 42
5. Número médio de brotações de *Ocotea porosa* cultivadas "in vitro" em meio MS submetidas a várias concentrações de BAP e AIB (30 explantes/tratamento)..... 44
6. Número médio de brotações de *Ocotea odorifera* cultivadas "in vitro" em meio MS submetidas a várias concentrações de BAP e AIB (25 explantes/tratamento)..... 45

7. Efeito da concentração de BAP no tamanho das brotações de <i>Ocotea porosa</i> obtidas "in vitro"..	47
8. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para o alongamento das brotações de <i>Ocotea porosa</i>	49
9. Efeito da concentração de sais e de AIB no enraizamento e no número de raízes das brotações de <i>Ocotea porosa</i>	52

LISTA DE FIGURAS

1. *Ocotea porosa*: a) árvore adulta; b) ramo florido; c) frutos; d) sementes; e) aspecto da casca; f) aspecto da madeira (LORENZI 1992)... 07
2. *Ocotea odorifera* a) árvore adulta; b) ramo florido; c) frutos; d) sementes; e) aspecto da casca; f) aspecto da madeira (LORENZI 1992).. 09
3. Preparação do meio MS (MURASHIGE & SKOOG 1962)... 26
4. Fonte de coleta dos explantes utilizados de *Ocotea porosa*..... 29
5. Fonte de coleta dos explantes utilizados de *Ocotea odorifera*..... 30
6. Aspecto dos segmentos nodais contaminados por fungos e bactérias..... 38
7. Segmentos nodais coletados na primavera, após 4 semanas em meio de isolamento: a) *Ocotea porosa*; b) *Ocotea odorifera*..... 41
9. Aspecto das brotações de *Ocotea porosa* alongadas em meio MS com 1,62 μ M de BAP..... 51

10. Aspecto da brotação de *Ocotea porosa* enraizada
em meio MS/2 com 2,46 μ M de AIB..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIA - ácido indol-3-acético
AIB - ácido indol-3-butírico
ANA - ácido -naftalenoacético
BAP - 6-benzilaminopurina
2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético
GA₃ - ácido giberélico
2iP - isopenteniladenina
KIN - 6-furfurilamino-purina
LS - LINSMAIER e SKOOG (1965)
MS - MURASHIGE e SKOOG (1962)
MS/2 - meio MS com metade das concentrações de sais
WPM - meio Woody Plant Medium (LLOYD & McCOWN 1980)

RESUMO

Este experimento teve como objetivo principal o estudo da propagação vegetativa de mudas de *Ocotea porosa* e *Ocotea odorifera* através da micropropagação. O isolamento e a transferência para as demais etapas *in vitro* foram feitas em câmara de fluxo laminar e os explantes foram mantidos em sala de incubação, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 2000 lux. O meio de cultura utilizado foi o de MURASHIGE e SKOOG (MS). Segmentos nodais de imbuia e sassafrás com aproximadamente 2 cm de comprimento, obtidos de mudas de 2 anos de idade foram desinfestados em soluções de hipoclorito de sódio (5% de cloro livre) cujas concentrações variaram de 5 a 15% e cultivados em meio MS. A oxidação dos explantes foi controlada utilizando-se solução de ácido ascórbico com concentrações de 0,05 e 0,1 g/l e adição de 0,01 g/l de polivinilpirrolidone ao meio de cultura. Após 4 semanas, as brotações obtidas foram transferidas para meio de multiplicação, onde foram testadas diversas concentrações de BAP e AIB e suas interações em meio MS. Para a obtenção do alongamento das brotações utilizou-se meio MS com BAP (1,62 e 3,23 μM). Na fase de enraizamento foram testados o meio MS e o meio MS/2 (com metade da concentração de sais) com diferentes concentrações de AIB (2,46 e 4,90 μM). O melhor tratamento para a assepsia dos explantes de imbuia (73,3% de sobrevivência) foi o que utilizou hipoclorito de sódio a 10% durante 10 minutos, para o sassafrás (72% de sobrevivência) o melhor tratamento foi o que utilizou hipoclorito de sódio 15% por 10 minutos. O controle da oxidação foi obtido utilizando-se 0,1 g/l de ácido ascórbico e adicionando-se polivinilpirrolidone ao meio de cultura para ambas as espécies. A maior taxa de multiplicação obtida para a imbuia foi com a adição de 3,23 μM de BAP e para o sassafrás com a adição de 9,69 μM de BAP. O melhor tratamento para o alongamento das brotações de imbuia foi o que utilizou BAP a 1,62 μM ; as brotações de sassafrás não tiveram nenhum incremento em sua altura em todos os tratamentos testados. O meio MS/2 proporcionou maior índice de enraizamento para a *Ocotea porosa*, sendo a concentração de 2,46 μM de AIB em meio MS/2 o melhor tratamento, com 64% de enraizamento das brotações. A *Ocotea pretiosa* não formou nenhuma raiz em quaisquer tratamentos.

1 INTRODUÇÃO

As florestas nativas brasileiras têm sofrido intensa exploração, comprometendo diversas espécies florestais valiosas. A falta de conhecimento sobre a silvicultura de espécies florestais nativas tem levado a substituição destas por plantios de coníferas e folhosas exóticas (CARVALHO 1978).

Poucos estudos sobre o cultivo e manejo das espécies nativas têm sido feitos, apesar de haver uma necessidade urgente de se desenvolver técnicas adequadas para a propagação destas.

Dentre as espécies florestais nativas que estão sendo extraídas sem a devida reposição destacam-se a *Ocotea porosa* Nees (imbuia) e a *Ocotea odorifera* Vellozo (sassafrás).

A imbuia era uma das árvores mais abundantes do sul do Brasil. Devido a sua valiosa madeira, constitui-se na segunda espécie nativa em volume de madeira explorada, em função da grande quantidade existente e dos grandes diâmetros de seus troncos (REITZ *et al.* 1978).

A imbuia é uma das madeiras mais procuradas e empregadas para a fabricação de móveis finos e de luxo, sobretudo pela beleza de sua madeira, seus veios pretos, castanhos ou avermelhados, ora paralelos, ora ondulados, formando por vezes figuras atraentes. Apresenta ainda alta durabilidade natural e notória maleabilidade (REITZ *et al.* 1978). É bastante utilizada para obras de escultura e artesanato, pois é fácil de ser trabalhada e empregada ainda em decoração interna, lambris, painéis e instrumentos musicais.

Atualmente é muito valorizada em função da iminente escassez, o que restringe em muito sua aplicação. É resistente à umidade e ao ataque de insetos.

Sendo esta espécie de crescimento bastante lento, seu plantio é pouco efetuado. No entanto, como sua madeira é altamente valiosa é recomendado o estudo da viabilidade de seu reflorestamento. Além disso, foi observada em Curitiba, uma rebrota de tocos de imbuías antigos sob um bracatingal com surpreendente capacidade de crescimento (INOUE *et al.* 1984). Assim sendo, a propagação vegetativa, através da cultura de órgãos "in vitro", pode significar uma maior produção de indivíduos de crescimento mais rápido num menor espaço de tempo pela seleção de genótipos desejáveis.

A madeira da sassafrás, pelas suas características, é indicada para a fabricação de móveis, marcenaria, em construção civil, como vigas, caibros, ripas, tacos e tábuas para assoalho, portas trabalhadas, venezianas, painéis, paredes divisórias, revestimentos internos e decorativos. A madeira do sassafrás é largamente empregada para obtenção do óleo essencial, mediante destilação não só do tronco como das raízes, casca e folhas. Este óleo possui entre seus constituintes, o safrol, com largo emprego na perfumaria, medicina, como combustível nas naves espaciais e outros setores industriais. No Brasil o óleo só é encontrado na região sul e no sul de Minas Gerais. O teor de óleo essencial no sul de Minas encontra-se em torno de 0,65% e o encontrado em Santa Catarina é de 1% (CARVALHO 1994).

Em outras regiões (do sul da Bahia até São Paulo) a

Ocotea odorifera produz óleo essencial contendo metil-eugenol, que infelizmente não é aproveitado, pois as árvores são abatidas e vendidas como madeira de canela (RIZZINI 1971).

O sassafrás também é muito utilizado na confecção de garrafas e barricas para armazenamento de aguardente de cana, conferindo a esta seu odor e gosto característicos (INOUE et al. 1984).

As árvores que são derrubadas para extração do óleo não são repostas, o que implica na escassez de matéria prima para as indústrias de destilação do sassafrás. Esta espécie produz poucas sementes e em anos alternados, sendo sua germinação bastante difícil, e as tentativas de reflorestamento em campo aberto não obtiveram êxito. Assim, a micropropagação pode ser uma alternativa para a produção em larga escala de plantas selecionadas para reflorestamento em sub-bosque.

1.1.OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de micropropagação para *Ocotea porosa* e *Ocotea odorifera*.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1º Definir o melhor tratamento para a assepsia dos explantes de *Ocotea porosa* e *Ocotea odorifera* utilizados na cultura "in vitro";

2º Desenvolver uma metodologia para a multiplicação de *Ocotea porosa* e *Ocotea odorifera* por micropropagação a partir de segmentos nodais de mudas até a fase de enraizamento "in vitro".

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES

2.1.1 *Ocotea porosa*

Esta espécie ocorre no sul do Brasil, sendo sua maior área de concentração o norte de Santa Catarina e sul do Paraná. É própria da associação de *Araucaria angustifolia*, onde ocupa o segundo lugar em quantidade (RIZZINI 1971).

A imbuia é uma árvore que atinge normalmente 10 a 20 m de altura, com DAP de 50 a 150 cm, podendo atingir até 30 m de altura e 320 cm ou mais de DAP. Apresenta tronco tortuoso, irregular, com excrescências globosas típicas, os "papos de imbuia"; fuste comumente curto, normalmente até 6 m de comprimento e excepcionalmente até 11 m. Copa ampla e arredondada, pouco densa, com folhagem verde clara característica. Casca com espessura até 35 mm, casca externa varia conforme idade da árvore, casca interna de cor creme a salmão, odor forte, com oxidação rápida. Folhas simples, alternas, inteiras, oblongo lanceoladas, coriáceas, com 6 a 10 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura (CARVALHO 1994).

Segundo REITZ *et al.* (1978), as inflorescências são em racemos simples ou subracemos, corimbosas, axilares, quase glabras, com 2,0 a 4,0 cm, paucifloreas, muito menores que as folhas; flores hermafroditas, pequenas e amareladas. O fruto é uma baga globosa

(esférica) de 13 a 17 mm de diâmetro, superfície parda e alveolada, pericarpo fino (Figura 1).

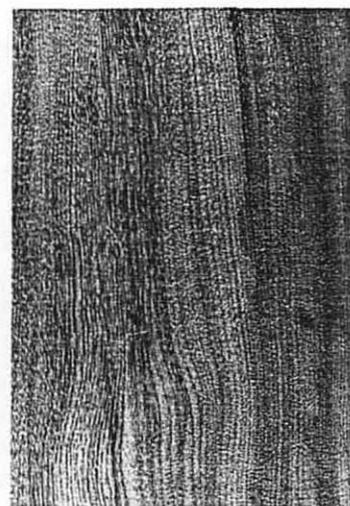
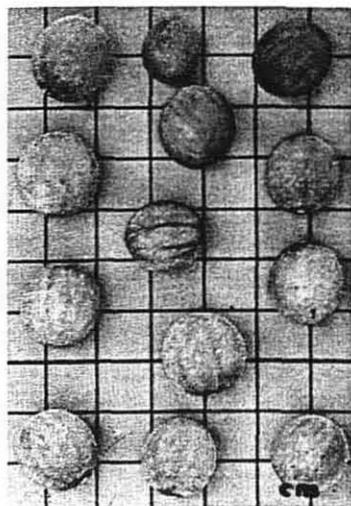
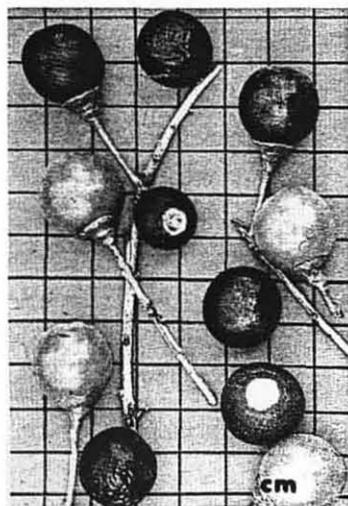
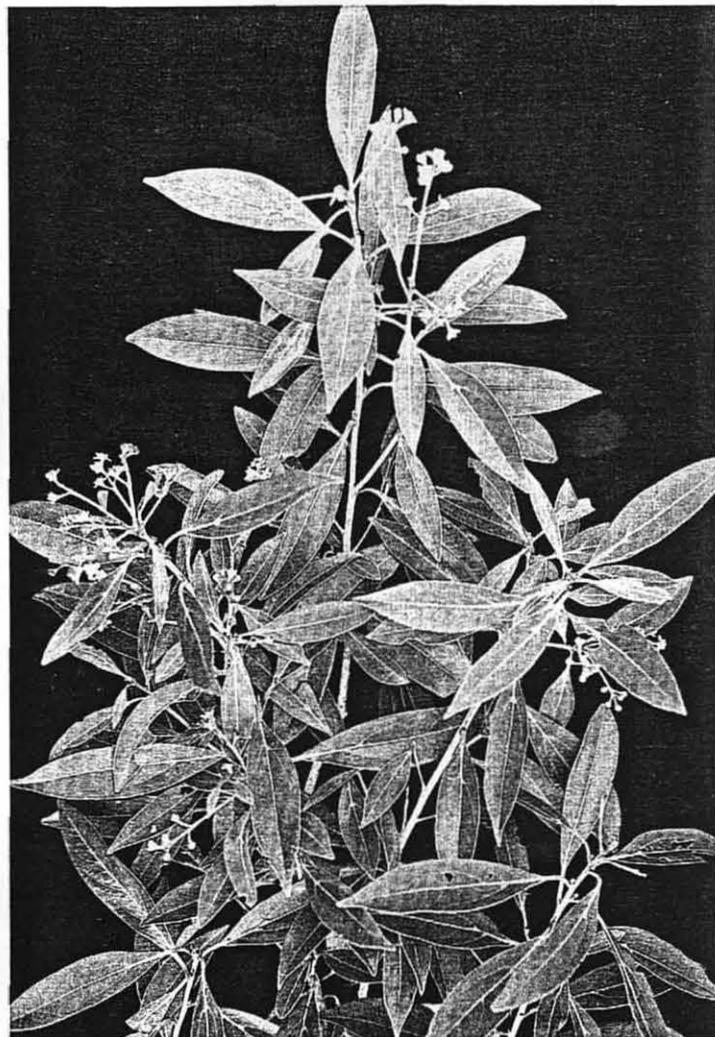
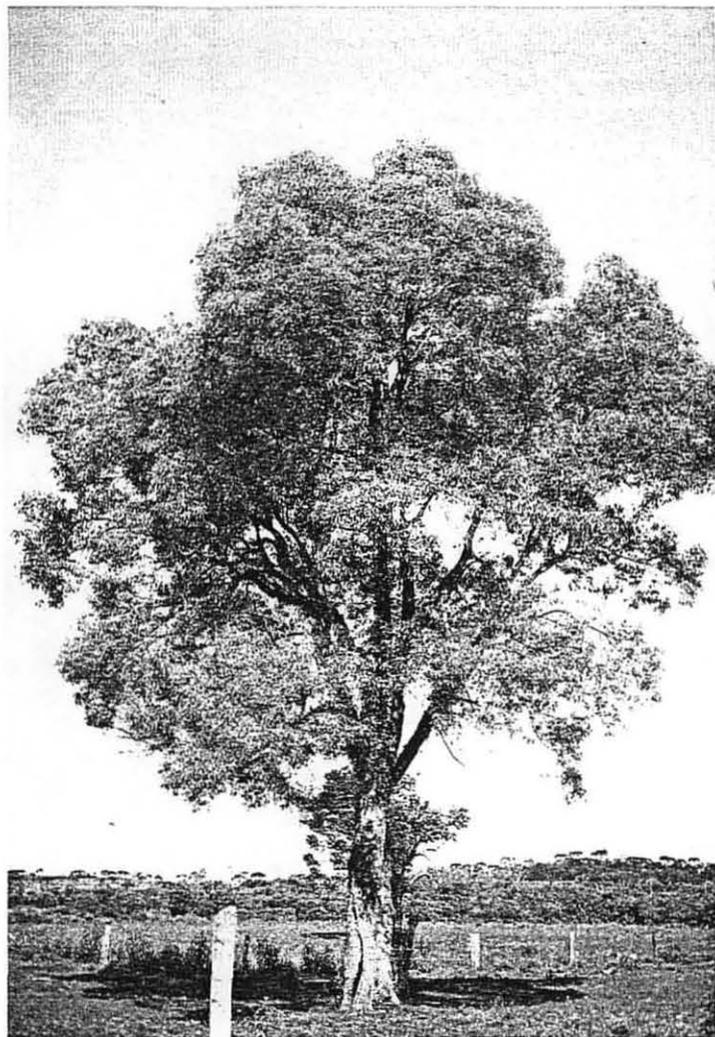
De acordo com INOUE *et al.* (1984), no Paraná a imbuia floresce durante a primavera, principalmente outubro e novembro; a partir de fevereiro os frutos estão maduros sendo mais intenso em março.

2.1.2 *Ocotea odorifera*

O sassafrás ocorre do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo que sua dispersão mais significativa se encontra no alto Vale do Itajaí, em Santa Catarina, onde está localizada a industrialização do óleo de sassafrás (REITZ *et al.* 1978).

Segundo CARVALHO (1994) esta espécie tem normalmente 5 a 15 m de altura, com 30 a 60 cm de DAP, podendo atingir até 25 m de altura e 120 cm de DAP. Seu tronco geralmente é tortuoso, curto, escavado, com quinas irregulares e pronunciadas, com pequenas dilatações na base e muitas vezes ramificado a pequena altura; fuste com até 8 m de altura. A copa, nos indivíduos de crescimento isolado, é globosa, provida de folhagem densa. Casca externa castanha-acinzentada a castanha-pardacenta, rígida, com cicatrizes típicas provenientes da descamação e lenticelas salientes; casca interna creme a salmão, com forte odor característico. Folhas alternas, simples, inteiras, oblongo-lanceoladas, com até 15 cm de

Figura 1. *Ocotea porosa*: a) árvore adulta; b) ramo florido; c) frutos; d) sementes; e) aspecto da casca; f) aspecto da madeira (LORENZI, 1992).



comprimento por 5 cm de largura; quando esmagadas, apresentam cheiro inconfundível (Figura 2).

Inflorescência em múltiplos racemos simples afixados na ponta dos ramos por cima das folhas, glabros, mais curtos que as folhas medindo comumente 5,0 cm de comprimento; flores glabras, alvas e perfumadas. O fruto é uma baga elipsóide ou elíptica, de cerca de 2,0 cm de comprimento por 10,0 a 15,0 mm de diâmetro, quase lisa, castanha, envolvida pela cúpula até cerca de 1/3 a 1/4 de sua altura (REITZ et al. 1978).

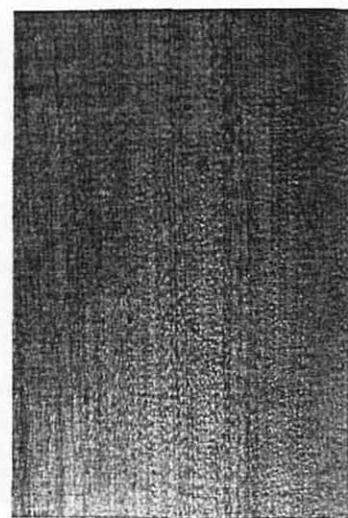
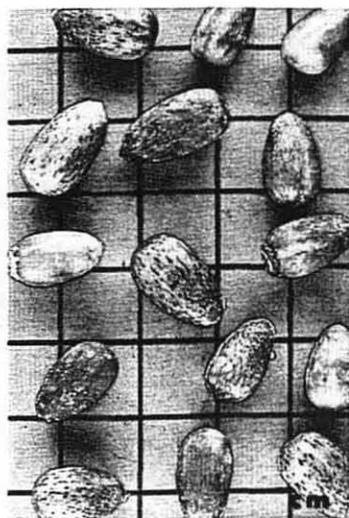
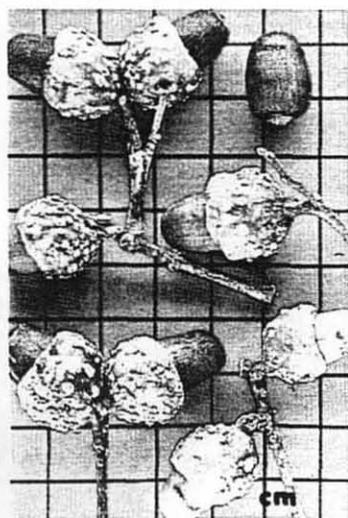
Floresce durante o verão, frutificando durante o outono e o inverno, entretanto sua frutificação é irregular, ocorrendo possivelmente em anos alternados. Raramente é abundante, pois no longo período de maturação dos frutos, estes caem precocemente (INOUE et al. 1984).

2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA EM LAURÁCEAS

SILVA (1984), trabalhando com estaquia de canela sassafrás e canela guaicá, concluiu ser o inverno a melhor época de plantio das estacas e o tratamento com AIB a 2000 ppm e sacarose foi o mais eficiente para a sobrevivência, retenção foliar, brotamento, número de brotos e formação de calos nas duas espécies. Este autor não conseguiu o enraizamento das estacas.

Segundo RODRIGUES (1990), as estacas radiciais de canela

Figura 2. *Ocotea odorifera*: a) árvore adulta; b) ramo florido; c) frutos; d) sementes; e) aspecto da casca; f) aspecto da madeira (LORENZI, 1992).



sassafrás no outono e inverno não brotaram e nem enraizaram, mas permaneceram vivas; as caulinares finas, médias e grossas apresentaram somente brotações em 23,8%, 23,8% e 28,6% respectivamente. Já na época primavera e verão, este mesmo autor obteve uma brotação de 0%, 28,6% e 52,4% para estacas caulinares de sassafrás, porém não houve enraizamento.

Procedimentos para a micropropagação de brotações apicais de *Sassafras randaiense* foram estabelecidos por WANG et al. (1991). A desinfestação dos explantes foi feita passando-os rapidamente por uma solução contendo etanol a 75% e depois deixando-os mergulhados em uma solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 5 minutos. Uma alta concentração de citocinina (278,82 μM de cinetina) em meio LS foi necessária para a indução de múltiplas brotações da gema apical de plantas com 5 anos de idade. Uma concentração mais baixa (16,16 μM de BAP) foi utilizada para gemas apicais de plantas com 1 a 2 anos de idade. Na fase de proliferação destas brotações foram usados 23,23 μM de KIN. A melhor taxa de enraizamento foi de 20% utilizando-se meio líquido LS acrescido de 24,60 a 49,0 μM de AIB.

MOURA-COSTA et al. (1993) obtiveram resultados positivos trabalhando com embriogênese somática de *Ocotea catharinensis*. Embriões somáticos foram cultivados em diversos meios de cultura com diferentes concentrações de sais, sacarose, carvão ativado e reguladores de crescimento até a formação de raízes. Obtidas em meio com baixas concentrações de nutrientes numa porcentagem de 10%, estas estruturas enraizadas foram transferidas para outro meio com baixas concentrações de nutrientes acrescido de 0,905 μM de 2,4-D e GA3 e após um mês algumas culturas haviam desenvolvido

pequenas brotações com primórdio foliares. Estas foram então novamente transferidas para o mesmo meio e cresceram em média até 4,0 cm de altura, produzindo três ou quatro folhas e uma única e longa raiz.

2.3 CULTURA DE TECIDOS

A técnica da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas constitui uma das áreas de maior importância da biotecnologia. Após quase meio século de progresso, esta técnica conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no intercâmbio e conservação de germoplasma e em outras aplicações como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial "in vitro" de compostos secundários (TORRES e CALDAS 1990).

O termo "cultura de tecidos" é comumente utilizado para descrever todos os tipos de cultura de plantas "in vitro", entretanto, segundo GEORGE e SHERRINGTON (1984), deveria se referir estritamente à cultura de células agregadas desorganizadamente (cultura de calo).

Os referidos autores citam ainda os diversos tipos de cultura "in vitro":

a) Cultura de calo: a partir de um tecido ou parte de um órgão do vegetal surgem calos, que são um grupo de células com crescimento

desorganizado;

b) Cultura de células em suspensão: são agregados de células em meio líquido;

c) Cultura de protoplastos: cultura de células que foram isoladas sem parede celular;

d) Cultura de antera: é a cultura das anteras completas contendo o pólen imaturo; o principal objetivo é a obtenção de plantas haplóides;

e) Cultura de órgãos: abrange a maioria dos sistemas de micropropagação, envolvendo o crescimento "in vitro" de órgãos meristemáticos pré-formados.

2.4 MICROPROPAGAÇÃO

A propagação vegetativa "in vitro" , também denominada micropropagação, em função dos propágulos utilizados é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos (TORRES e CALDAS 1990).

Na década de setenta, foi apresentado por MURASHIGE (1974) o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação "in vitro". Este esquema divide-se em:

ESTAGIO I: seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

ESTÁGIO II: multiplicação dos propágulos através de sucessivas

subculturas em meio próprio para a multiplicação;

ESTÁGIO III: transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo.

GEORGE e SHERRINGTON (1984) apresentam as seguintes vantagens da propagação "in vitro" com relação aos métodos tradicionais:

- a) A micropropagação requer pouco espaço para manter e regenerar plantas em larga escala;
- b) A propagação é feita em condições assépticas, livre de patógenos; assim as plântulas produzidas são isentas de bactérias e fungos;
- c) Um grande número de plantas pode ser produzido num espaço muito curto de tempo;
- d) É possível produzir clones de algumas espécies que são lentas e difíceis de serem propagadas;
- e) A produção pode ser contínua, durante o ano inteiro, independente das mudanças de estações.

2.5 MEIOS NUTRITIVOS E REGULADORES DE CRESCIMENTO

A lista dos minerais (macro e micronutrientes) incluídos na maioria dos meios de cultura utilizados hoje foi definida por WHITE (1943). O meio de White continha, ainda, vitaminas e

sacarose como suplementos orgânicos. Durante anos o meio de White foi utilizado como meio básico para a cultura de uma grande variedade de espécies. O meio MS de MURASHIGE e SKOOG (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extrato de folhas de fumo. Foi demonstrado que os elementos que mais estimulavam o crescimento eram os componentes inorgânicos. As principais modificações do meio de cultura foram o aumento das concentrações de sais em geral, diminuição na concentração de sódio e acréscimo de nitrogênio na forma de amônio para complementar o nitrato.

Segundo ZAER e MAPES (1982), todos os sistemas de cultura de tecidos e de órgãos de espécies florestais necessitam fazer uso dos reguladores de crescimento. Sem a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura a maioria dos tecidos não sobrevivem ou apresentam um crescimento muito menor do que o esperado. Poucos estudos têm abordado o mecanismo de ação dos reguladores de crescimento; ao invés disso a efetividade dos reguladores e suas concentrações têm sido obtidas empiricamente. Com isso, existe uma grande variedade de reguladores de crescimento que têm sido testados em diversas espécies, com resultados às vezes conflitantes.

Ainda segundo ZAER e MAPES (1982), um dos aspectos mais notáveis dos hormônios vegetais é sua multiplicidade de efeitos. O AIA, a auxina natural das plantas superiores, causa alongamento celular, mas também afeta a formação do xilema, a germinação, a formação de raízes em estacas e uma variedade de outros processos fisiológicos. Giberelinas também causam alongamento celular, mas

também afetam certos processos de floração e germinação de sementes. As citocininas além de indutoras da divisão celular têm ainda forte controle sobre os processos morfogênicos. Essa variedade de efeitos complica os esforços feitos para explicar como os reguladores operam.

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento (SKOOG e MILLER, 1957).

Existem vários tipos de reguladores de crescimento vegetais que são usados de acordo com o objetivo do estudo, nos meios de cultura. As várias auxinas (AIA, AIB, 2,4-D, entre outras) apresentam respostas diferentes "in vitro". O AIA é considerado uma auxina instável, que se degrada facilmente pela luz ou pela atividade microbiana, que a transforma em triptofano. Esta instabilidade, aliada à sua inativação ou destruição metabólica nas células, a torna uma auxina relativamente "fraca", comparada com o 2,4-D, por exemplo. As diferenças em metabolismo e estabilidade das auxinas podem contribuir para as diferenças observadas na resposta "in vitro", onde o 2,4-D frequentemente induz a formação de calo, e pode ser importante nos sistemas de embriogênese somática, enquanto o AIA é ineficaz. O AIB, por outro lado, é frequentemente a melhor auxina para a indução de raízes "in vitro" (CALDAS *et al.* 1990).

Também existem diferenças entre as citocininas, sendo que o BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de

multiplicação em sistemas de micropropagação, enquanto KIN e 2iP geralmente permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas (HU e WANG 1983 *apud* TORRES e CALDAS 1990). Isto, entretanto, não é uma regra absoluta e, conforme a espécie, as citocininas podem apresentar resultados diferentes.

2.6 OBTENÇÃO DOS EXPLANTES

O estado fisiológico e fitossanitário da planta cujos explantes são retirados tem grande influência no posterior comportamento das culturas. A primeira consideração diz respeito ao estado nutricional da planta e à fase de crescimento em que se encontra. Plantas bem nutridas, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, em geral, fornecem explantes melhores (GRATTAPAGLIA e MACHADO 1990).

Ainda segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990), a retirada de explantes deve ser feita de preferência a partir de brotações novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, após o final da fase de dormência, durante os meses mais quentes do ano, primavera e verão.

BONGA (1985) afirma que em cultura de tecidos de árvores os resultados variam muito de ano para ano, mesmo quando os explantes são coletados da mesma árvore e na mesma época do ano.

Esta variação é causada parcialmente pelos ciclos climáticos e pelas flutuações ocorridas em outros fatores do meio que afetam as condições fisiológicas das árvores que crescem no campo. Em mudas e pequenas plantas, estas mudanças fisiológicas podem ser reduzidas se estas forem colocadas em um meio com condições controladas, em casas de vegetação ou estufas.

Para limitar as contaminações quando se utiliza material de estufa ou casa de vegetação, se deve seguir as seguintes orientações, conforme PIERIK (1990):

1. Impedir a infestação de insetos, como por exemplo moscas e ácaros, uma vez que estes frequentemente são portadores de alguma enfermidade.

2. Evitar fungos e bactérias, utilizando sempre que possível fungicidas e bactericidas sistêmicos.

3. Não molhar nunca as plantas ao regar, colocando a água diretamente no vaso. A água é frequentemente um elemento importante para a reprodução e propagação de microorganismos.

4. Manter a umidade relativa do ar tão baixa quanto possível. A contaminação por fungos e bactérias são mais prováveis com uma umidade alta.

5. Permitir que as plantas sequem parcialmente antes de iniciar a assepsia.

2.7 CONTAMINAÇÃO E OXIDAÇÃO

Conforme PIERIK (1990), em princípio existem quatro fontes de contaminação: a planta (seu exterior e interior), o meio nutritivo (insuficientemente esterilizado), o ar e o laboratorista (trabalho pouco preciso). A mais importante destas é a planta e por isto o material vegetal deverá ser bem desinfestado antes de sua introdução "in vitro". Antes de se iniciar a assepsia, deve-se retirar qualquer sinal do substrato e as partes mortas da planta. Depois o material vegetal deve ser lavado com água. A seguir se inicia a esterilização, geralmente da seguinte forma: se submerge os explantes em álcool 70 % por alguns segundos. PIERIK (1990) ainda recomenda que se realize uma assepsia durante 10 a 30 minutos com hipoclorito de sódio a 1% e em seguida se enxagua com água esterilizada. Depois pode-se começar a manusear o material vegetal em condições estéreis (câmeras de fluxo laminar), utilizando instrumentos esterilizados (imersos em álcool 96% e depois flambados).

Um problema frequentemente encontrado durante o isolamento dos explantes é a oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas com o corte. As extremidades cortadas tornam-se escuras rapidamente. Os produtos da oxidação são tóxicos ao resto do explante e se difundem no meio de cultura, escurecendo-o. Este problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas. Os tecidos destas espécies são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da

síntese de lignina. Uma das técnicas utilizadas para reduzir este problema é a utilização de substâncias antioxidantes como ácido ascórbico, PVP (polivinilpirrolidone) e carvão ativado, seja no meio, como na forma de banho (TORRES e CALDAS 1990).

Segundo PINEDO (1989) o melhor tratamento para explantes de *Eucalyptus citriodora* no controle da contaminação e da oxidação foi hipoclorito de sódio a 0,5 % por um período de exposição de 10 minutos. Já para WIECHETECK (1990), em seus estudos com *Eucalyptus viminalis*, o menor índice de contaminação e oxidação foi obtido com hipoclorito de sódio a 1,0 % por 10 minutos.

A imersão dos explantes de *Ilex paraguariensis* durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 15% foi o tratamento mais efetivo obtido por DE PAULA (1992). Esta autora observou ainda uma tendência de maior contaminação dos explantes para os menores períodos de exposição ao hipoclorito, apesar de ocasionarem as menores taxas de oxidação.

TOLEDO et al. (1993), trabalhando com *Bertholletia exselsa* e *Platonia insignis*, fez a assepsia dos explantes de ambas as espécies utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a 3 % por 15 minutos, e depois lavando-os em água esterilizada.

2.8 MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES

O estímulo às brotações no cultivo "in vitro",

frequentemente observado, resulta do emprego de citocininas, eventualmente associadas às auxinas (MARGARA, 1988).

PINEDÓ (1989) conseguiu induzir brotações em todos os tratamentos que utilizou no trabalho sobre micropropagação de *Eucalyptus citriodora*, inclusive a testemunha. Entretanto, considerando os maiores números de brotações, o melhor tratamento foi BAP 3,23 μM + AIA a 0,57 μM . Quando foi aumentada a concentração de BAP para 6,43 μM , com diferentes concentrações de AIA, houve uma diminuição da taxa de multiplicação, possivelmente devido a que o BAP em concentrações acima de 3,23 μM seja tóxico para a espécie em estudo.

As maiores taxas de brotações multiplicadas em *Eucalyptus viminalis* obtidas por WIECHETECK (1990) com os tratamentos que combinaram o uso de 0,65 μM de BAP com 2,69 μM ou 5,37 μM de ANA no meio de cultura MS. Foi observado ainda a tendência geral de aumento na taxa de multiplicação das brotações com o aumento da concentração de ANA de 0 para 5,37 μM , sendo que este comportamento foi tanto melhor quanto menor a concentração de BAP (2,69 μM).

O tratamento que propiciou a maior taxa de brotações múltiplas de *Ilex paraguariensis* foi 6,46 μM de BAP no meio WPM, sem a adição de auxinas (DE PAULA 1992). As concentrações de AIB testadas mostraram efeitos diferentes para os meios MS e WPM. Houve um decréscimo linear do número de brotações para o meio WPM à medida que se aumentou a concentração de AIB. No meio MS, observou-se uma tendência de aumento no número de brotações com o aumento das concentrações de AIB. Esse resultado inverso entre os meios MS e WPM pode ser atribuído à composição diferente desses

meios de cultura.

PRUSKI *et al.* (1991) obtiveram as melhores taxas de multiplicação para *Amelanchier alnifolia* em meio MS contendo 6,46 a 9,69 μ M de BAP. Com maiores concentrações de BAP, as brotações produzidas eram raquíticas, com folhas pouco desenvolvidas e difíceis de enraizar.

2.9 ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES

As citocininas utilizadas no meio de multiplicação podem afetar o alongamento das novas brotações obtidas e comprometer o enraizamento. Para resolver este problema faz-se necessária, em algumas espécies, uma fase intermediária de alongamento. Esta fase de alongamento caracteriza-se pela transferência das culturas para meio básico diluído ou não com concentrações reduzidas ou ausência de citocinina, antes de individualizar as partes aéreas para o enraizamento (TORRES e CALDAS 1990)

Conforme WIECHETECK (1990), o meio de multiplicação não promoveu o alongamento das brotações de *Eucalyptus viminalis*. O alongamento foi obtido após a transferência das brotações para um meio suplementado com 15,0 g/l de carvão ativado.

DESCHAMPS (1993) observou efeito favorável ao alongamento dos explantes de *Sebastiana schottiana* na presença de 1,1 μ M de BAP, sem a adição de carvão ativado. Este autor observou também

que o ANA influenciou negativamente os parâmetros da parte aérea, de forma que o meio de cultura isento dessa auxina proporcionou melhores porcentagens de alongamento.

TOLEDO (1993) obteve brotações de *Platonia insignis* medindo em média 1,5 cm utilizando meio MS complementado com 16,16 μ M de BAP.

2.10 ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES

A maior parte das plantas necessitam de auxinas para induzirem a iniciação radicial. Esta necessidade não é constante, visto que depois da iniciação do enraizamento (para a qual geralmente se necessita elevada concentração de auxina), o crescimento destas raízes requer uma baixa concentração de reguladores de crescimento. Em plantas herbáceas utiliza-se frequentemente a auxina AIA. As plantas lenhosas requerem concentrações de auxinas superiores que as plantas herbáceas. As auxinas mais eficazes são claramente o AIB e o ANA. O AIA geralmente não é muito eficaz quando utilizado em plantas difíceis de enraizar (PIERIK 1990).

DURAND e BOUDET (1979) concluíram que a presença de AIB no meio de cultura é favorável à rizogênese em *Eucalyptus dalrympleana*, sendo 1,23 μ M a concentração ideal. Segundo WIECHETECK (1990), o melhor enraizamento de *Eucalyptus viminalis*

foi obtido utilizando-se o meio MS/2 suplementado com de 2,46 μ M AIB.

O melhor resultado para o enraizamento de brotações de *Ilex paraguariensis* conforme DE PAULA (1992), foi obtido em duas fases: indução e desenvolvimento das raízes. As raízes foram induzidas em meio WPM/2 com 14,7 μ M de AIB e se desenvolveram melhor em meio WPM/2 com 1,0 g/l de carvão ativado e sem auxina.

PRUSKI et al.(1991), conseguiram a melhor taxa de enraizamento em *Amelanchier alnifolia* adicionando 2,46 μ M de AIB ao meio de cultura. LEMOS et al.(1993), obtiveram brotações enraizadas de *Piper nigrum* em meio MS contendo 14,70 μ M de AIB.

DESCHAMPS (1993), concluiu em seu trabalho com *Sebastiania schottiana*, que a baixa concentração de sais e a presença de AIB no meio de cultura favorecem o desenvolvimento de raízes em espécies lenhosas. Este autor obteve o melhor índice de enraizamento em meio WPM acrescido de 4,9 μ M de AIB.

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS DAS CULTURAS

Nas fases de isolamento do material vegetal, multiplicação e enraizamento, as culturas foram mantidas em sala de incubação, sob controle de fotoperíodo, luminosidade e temperatura. O fotoperíodo foi de 16 horas, a intensidade luminosa foi de 2000 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-fria e "Sylvania" GRO-LUX F40/12. Os frascos foram mantidos em prateleiras a 60 cm de distância das lâmpadas. A temperatura ambiente foi mantida em $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em todos os experimentos.

3.2 MEIOS DE CULTURA E RECIPIENTES

O meio de cultura utilizado foi o de MURASHIGE & SKOOG (1962), referido como meio MS, com alterações na sua concentração de sais minerais e suplementação com sacarose (30 g/l), ágar (6 g/l), vitaminas (tiamina, piridoxina e ácido nicotínico) e glicina. A composição do meio está listada na Figura 3.

Em todas as fases os meios de cultura foram preparados com água deionizada. Após o preparo e antes da autoclavagem o pH dos meios de cultura foram ajustados em 5,8 com NaOH 1N ou HCl 1N.

Os meios de cultura foram distribuídos em alíquotas de 10 ml em frascos com capacidade para 25 ml nas fases de isolamento e multiplicação. Nas demais fases foram distribuídos 25 ml de meio em frascos com capacidade para 250 ml. Os frascos menores foram vedados com papel alumínio e os frascos maiores com tampas de polipropileno ou papel alumínio.

Os meios de cultura foram autoclavados sob pressão de 1,5 atm e temperatura de 120°C, durante 30 minutos.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado foi o completamente ao acaso, para todos os experimentos realizados, com diferentes números de

Figura 3. PREPARO DO MEIO MS (MURASHIGE & SKOOG 1962)

Soluções Estoque**Operações (por litro)**Sol. estoque A

NH_4NO_3 82,5 g/l

Foram Colocados 50 ml de água deionizada em um frasco de 1 litro.

Sol. estoque B

KNO_3 95,0g/l

Acrescentou-se 30g de sacarose

Sol. estoque C

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 88,0 g/l

Adicionou-se:

Myo-inositol 100,0 mg

Thiamina 0,1 mg

Âc. Nicotínico 0,5 mg

Pyridoxina 0,5 mg

Glycina 2,0 mg

Sol. estoque D

KH_2PO_4 34,0 g/l

Sol. estoque E

H_3BO_3 1,24 g/l

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05g/l

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/l

KI 0,166 g/l

Adicionou-se 20 ml de cada sol. Estoque A e B.

Sol. estoque F

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,38 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 74,0 g/l

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/l

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,725 g/l

Adicionou-se 5 ml de cada sol. Estoque C, D, E, F e G.

Completoou-se 900 ml e ajustou-se o pH para 5,8

Sol. estoque G

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,865 g/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,39 g/l

Completoou-se 1 litro
Despejou-se em 2 Erlenmeyer, adicionou-se 6,0 g de ágar em cada e colocou-se no microondas na potência máxima por 5 minutos.

tratamentos e repetições em cada fase. O número de tratamentos variou de 3 a 16, o número de repetições por tratamento foi de 5 e foram utilizados de 4 a 6 explantes/repetição, totalizando 20 a 30 explantes/tratamento.

Na fase de desinfestação do material vegetal, os tratamentos consistiram da combinação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio com diferentes tempos de exposição dos explantes às soluções. Os resultados, expressos em porcentagem, foram analisados através de análise de variância, contrastes ortogonais (testemunha x tratamentos) e comparação de médias entre os tratamentos. Como os dados em porcentagem apresentaram grande amplitude, não foi necessário utilizar transformação estatística (STEEL e TORRIE 1960).

O controle da oxidação consistiu de três diferentes concentrações de ácido ascórbico com ou sem polivinilpirrolidone. Os resultados, expressos em porcentagem, foram também analisados diretamente através de análise de variância e contrastes ortogonais.

Na fase de multiplicação foram testadas combinações de diferentes concentrações de AIB e BAP, sendo analisados o número e o tamanho das brotações. Em ambos os casos os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{y+0,5}$ (STEEL e TORRIE 1960) e analisados através da técnica de fatoriais e comparação de médias.

Na fase de alongamento foram testadas diferentes concentrações de BAP. Os dados, expressos em centímetros, foram analisados através de análise de variância e comparação de médias.

A última fase, a de enraizamento, consistiu da combinação de diferentes concentrações de sais no meio de cultura com diferentes concentrações de AIB. Os dados foram transformados em $\sqrt{y+0,5}$ e analisados através de análise de variância, contrastes ortogonais e comparação de médias.

Em todas as comparações de médias foi usado o teste de SNK (Student-Newman-Keuls) e todas as análises estatísticas foram feitas ao nível de precisão de 95%.

3.4 FONTES DE EXPLANTES

As fontes de explantes de imbuia foram 100 mudas com 2 anos de idade, sendo coletadas com 1 ano de idade regeneração natural no Sítio São Marcos, em Campina Grande do Sul. As mudas foram plantadas em sacos plásticos e mantidas por 1 ano em casa de vegetação climatizada, modelo Van der Hoeven, instalada no Setor de Ciências Agrárias da UFPR (Figura 4).

As fontes de explantes de sassafrás utilizada foram de 100 mudas com 2 anos de idade, previamente estabelecidas em sacos plásticos com terra, procedentes de regeneração natural coletadas no município de São João do Triunfo e mantidas em casa de vegetação (Figura 5).

As mudas receberam pulverizações quinzenais com fungicida

Figura 4. Fonte de coleta dos explantes de *Ocotea porosa* utilizados.



Figura 5. Fonte de coleta dos explantes de *Ocotea odorifera* utilizados



BENLATE 500 [metil-1(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato] na concentração de 2 g/l por aplicação durante todo o período de coleta dos explantes.

3.5 DESINFESTAÇÃO E ISOLAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As brotações apicais e laterais de mudas de imbuia e de sassafrás foram cortadas e as folhas foram retiradas. Os segmentos com aproximadamente 2 cm de comprimento foram colocados em recipientes com água previamente deionizada e esterilizada.

Os segmentos obtidos foram levados ao laboratório e lavados em água com detergente e enxaguados com água deionizada esterilizada.

O agente desinfestante utilizado foi o hipoclorito de sódio (NaClO) nas concentrações de 5, 10 e 15 % (5% de cloro livre) com diferentes períodos de exposição às soluções (5, 10 e 15 minutos). Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a lavagem dos explantes, por três vezes, em água deionizada e esterilizada.

Após os tratamentos fitossanitários terem sido completados, os segmentos foram inoculados em meio MS. Em seguida, os explantes foram transferidos para sala de incubação. Foram utilizados 30 explantes/tratamento. Após 4 semanas foram avaliadas

as percentagens de sobrevivência, oxidação e contaminação por fungos e bactérias.

3.6 CONTROLE DA OXIDAÇÃO

Com o objetivo de diminuir a oxidação dos explantes, este experimento consistiu de duas etapas: primeiramente foram testadas duas concentrações de ácido ascórbico (A:0,05 e B:0,1 g/l) diluídas em água deionizada e onde o material, logo após a coleta ficou imerso durante 30 minutos. Após o resultado destes experimentos, foi testada a segunda etapa que consistiu da adição de polivinilpirrolidone (C:0,01 g/l) ao meio de cultura do melhor tratamento anterior.

Utilizaram-se nestes tratamentos 30 explantes de imbuia e 25 explantes de sassafrás por tratamento. Quatro semanas após a incubação foi avaliado o número de explantes de imbuia e de sassafrás que não apresentaram oxidação.

3.7 MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES

Os explantes utilizados nesta fase foram brotações

oriundas da fase de isolamento e que apresentavam altura aproximada de 1,0 cm. Os tratamentos nesta fase consistiram de combinações de diferentes concentrações de BAP (0, 3,23, 6,46 e 12,92 μM) com AIB (0, 4,90, 9,80 e 19,6 μM) em meio MS.

Neste experimento utilizaram-se 30 explantes de imbuia e 25 explantes de sassafrás por tratamento. As culturas foram avaliadas após 50 dias de incubação com relação ao número de brotações e quanto ao tamanho das brotações.

3.8 ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES

Nesta fase utilizaram-se como explantes brotações com aproximadamente 0,5 cm de altura, obtidas da fase de multiplicação e que eram muito pequenas para serem enraizadas.

Testes preliminares demonstraram que a ausência de carvão ativado no meio de cultura permitiu uma maior taxa de crescimento das brotações, portanto este experimento consistiu de tratamentos com diferentes concentrações de BAP (A:0, B:0,32 e C:1,62 μM) em meio MS. Em cada tratamento foram utilizados 25 explantes de imbuia e 20 explantes de sassafrás.

As culturas foram avaliadas após 4 semanas de incubação em relação ao crescimento das brotações (tamanho final - tamanho inicial).

3.9 ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES

As brotações utilizadas como explantes nesta fase apresentavam altura variável entre 1 e 3 cm e foram provenientes da fase de alongamento.

Os tratamentos consistiram da combinação de dois fatores: a concentração de sais no meio e de auxina. O meio de cultura empregado foi o MS com a concentração integral dos sais minerais e com a concentração reduzida à metade (MS/2) combinados com diferentes concentrações de AIB (0, 2,46 e 4,90 μM).

Nesta fase foram utilizados 25 explantes de imbuia e 20 explantes de sassafrás por tratamento. Após quarenta dias de incubação as culturas foram avaliadas com relação ao número de raízes obtidas por brotação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL

O efeito dos tratamentos de desinfestação sobre a sobrevivência dos explantes de imbuia é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito da concentração de hipoclorito de sódio e do período de exposição na desinfestação de segmentos nodais de *Ocotea porosa*.

Tratamentos	NaClO (%)	Tempo de exposição (min)	Contaminação (%)		Sobrevivência (%)
			bactéria	fungo	
1	5	5	26,7	30,0	26,7
2	5	10	16,7	16,7	53,3
3	5	15	20,0	10,0	36,7
4	10	5	16,7	13,3	50,0
5	10	10	6,7	3,3	73,3
6	10	15	16,7	3,3	46,7
7	15	5	23,3	10,0	40,0
8	15	10	20,0	6,7	33,3
9	15	15	16,7	10,0	10,0
Testemunha	0	0	30,0	43,3	13,3

A análise estatística dos dados da imbuia detectou diferença significativa entre os tratamentos e também entre a testemunha e todos os tratamentos agrupados (Tabelas 1 e 2 do Apêndice), indicando que os tratamentos foram eficientes na desinfestação do material. Por este motivo a testemunha foi excluída e os tratamentos comparados separadamente.

A análise dos tratamentos, excluída a testemunha, apresentou os seguintes resultados:

T5	T2	T4	T6	T7	T3	T8	T1	T9
73,32	53,32	49,98	46,66	40,00	36,66	33,34	26,68	10,02

Obs.: Médias seguidas pela mesma barra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 0,05 pelo teste SNK.

O maior índice de sobrevivência dos explantes de imbuia foi obtido com o tratamento que utilizou hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos (T5), embora estatisticamente ele não tenha diferido do T2, do T4 e do T6. Observa-se na Tabela 1 que o tratamento 5 resultou na menor taxa de contaminação por fungos (3,3%) e por bactérias (6,7%).

Na mesma tabela observa-se também que a menor taxa de sobrevivência ocorreu nos tratamentos em que a concentração de hipoclorito de sódio foi maior (15%), devido a necrose dos tecidos nesta concentração.

Ainda de acordo com a Tabela 1, verifica-se que na maioria das vezes a contaminação por bactérias foi grande em relação à contaminação por fungos. Esse resultado poderia ser

atribuído ao uso do fungicida BENLATE (benomyl) durante todo o período em que as mudas ficaram em casa de vegetação. Outro fator seria a presença de bactérias endógenas nos explantes utilizados, que não são eliminadas com a assepsia (Figura 6).

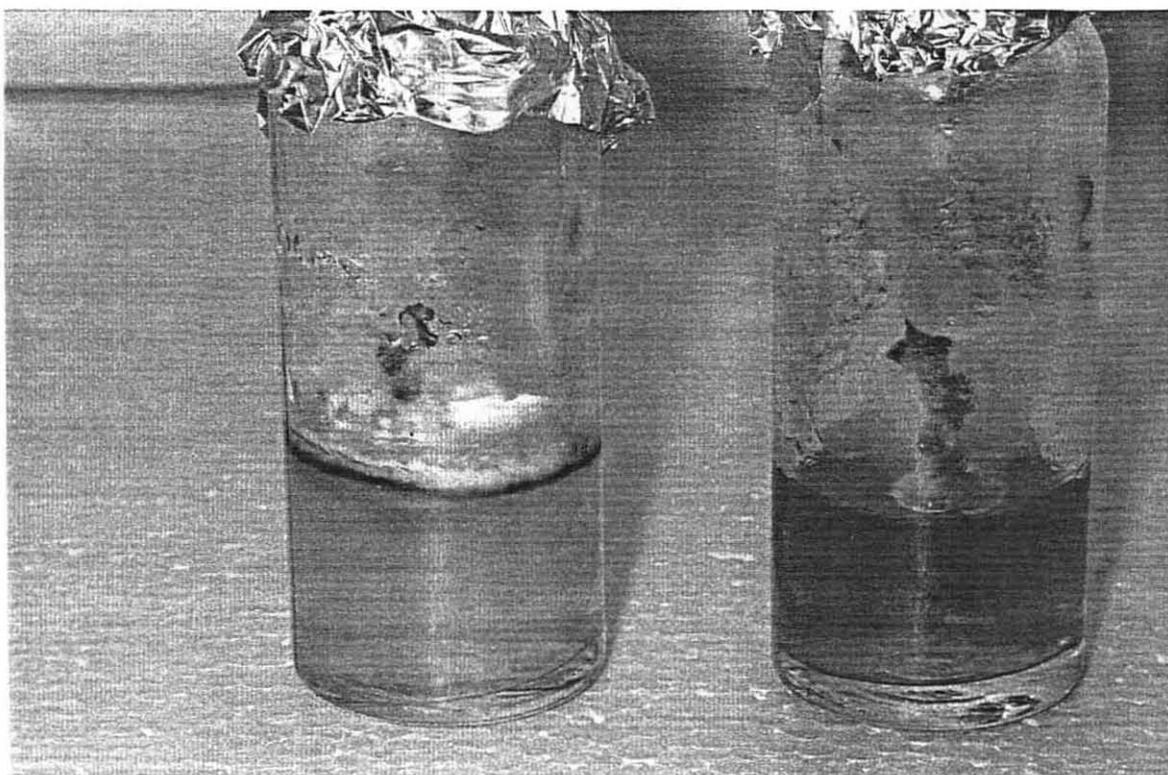
Os resultados dos tratamentos para assepsia do sassafrás encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Efeito da concentração do hipoclorito de sódio e tempo de exposição na desinfestação de segmentos nodais de *Ocotea odorifera*.

Tratamentos	NaClO (%)	Tempo de exposição (min)	Contaminação (%)		Sobrevivência (%)
			Fungos	Bactérias	
1	5	5	20	48	24
2	5	10	24	32	32
3	5	15	16	36	24
4	10	5	16	52	20
5	10	10	12	32	44
6	10	15	8	28	36
7	15	5	8	20	44
8	15	10	4	4	72
9	15	15	0	8	48
Testemunha	0	0	32	44	8

A análise estatística dos dados detectou diferença significativa entre os tratamentos e entre a testemunha e todos os tratamentos agrupados (Tabelas 3 e 4 do Apêndice), demonstrando que os tratamentos foram eficientes. Por esta razão, a testemunha foi excluída e os tratamentos comparados entre si.

Figura 6. Aspecto dos segmentos nodais contaminados por fungos e bactérias.



A análise dos tratamentos, excluída a testemunha apresentou os seguintes resultados:

T8	T9	T7	T5	T6	T2	T1	T3	T4
72	48	44	44	36	32	24	24	20

Obs: Médias seguidas pela mesma barra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 0,05 pelo teste SNK.

O melhor tratamento de assepsia para o sassafrás foi o que utilizou hipoclorito de sódio a 15 % durante 10 minutos (T8), conforme se observa na Tabela 2. Este tratamento resultou numa taxa de contaminação por fungos de 4,0 % e de bactérias também de 4,0 %, sendo que o tratamento com hipoclorito de sódio a 15 % por 15 minutos (T9) também apresentou baixa contaminação, entretanto, sua taxa de sobrevivência foi menor, pois a exposição mais prolongada causou necrose dos explantes. Estes resultados estão de acordo com DE PAULA, que obteve 68,7% de sobrevivência dos explantes de *Ilex paraguariensis* com hipoclorito de sódio a 15% durante 15 minutos. Ao contrário, WIECHETECK (1990) conseguiu um índice de sobrevivência de 100% para *Eucalyptus viminalis* com uma baixa concentração de hipoclorito de sódio (1%) por 10 minutos e para este mesmo tratamento obteve 20 % de oxidação dos explantes. WANG et al. (1991) também discorda, pois obteve o melhor tratamento para a assepsia de *Sassafras randaiense* utilizando baixa concentração de hipoclorito de sódio (0,5%) por 5 minutos combinado com um mergulho rápido dos explantes em etanol a 75 %. A melhor assepsia de *Bertholletia excelsa* e *Platonia insignis* descrita por TOLEDO et al. (1993) foi a que imergiu os explantes em solução de hipoclorito de sódio a 3 % por 15 minutos e depois

lavou-os em água esterilizada, diferindo dos resultados obtidos para a imbuia e o sassafrás que utilizaram concentrações mais altas.

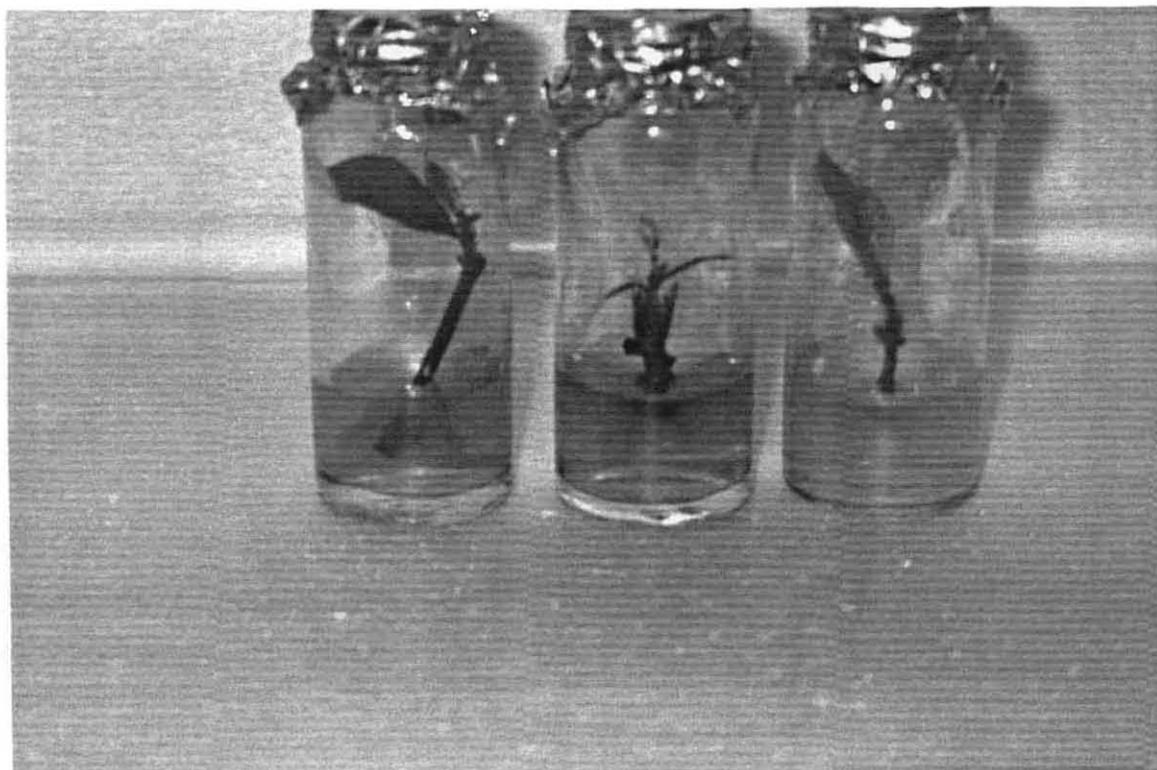
Foram realizados diversos testes preliminares ao longo do ano para se verificar a melhor época para a coleta e isolamento do material vegetal. Os experimentos realizados durante o outono e inverno obtiveram as maiores taxas de contaminação, enquanto os melhores resultados foram obtidos no período da primavera conforme observa-se na Figura 7. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por DE PAULA (1992) que obteve as menores taxas de contaminação em explantes de *Ilex paraguariensis* nos experimentos realizados na primavera.

4.2. CONTROLE DA OXIDAÇÃO

Após 30 dias em meio de cultura, os explantes de imbuia e de sassafrás apresentavam uma alta taxa de oxidação de compostos fenólicos (100%) que foi demonstrada pelo escurecimento do meio de cultura. Foi portanto necessária a realização deste experimento, que visou diminuir esta taxa.

A análise estatística deste experimento (Tabela 3) detectou diferença significativa entre os tratamentos utilizados para a imbuia. A análise de contrastes ortogonais mostrou que os tratamentos foram estatisticamente superiores à testemunha que

Figura 7. Segmentos nodais coletados na primavera, após 4 semanas em meio de isolamento: a) *Ocotea porosa*; b) *Ocotea odorifera*.



apresentou 86,66% de explantes oxidados. Analisando-se os tratamentos, observou-se que o C (20% de explantes oxidados) foi estatisticamente melhor do que o A (80% de explantes oxidados) e o B (50% de explantes oxidados). Finalmente, o A e o B também diferiram estatisticamente, sendo o B melhor do que o A. Portanto, o tratamento C, 0,1 g/l de ácido ascórbico mais 0,01 g/l de polivinilpirrolidone, foi o tratamento mais eficiente.

Tabela 3. Análise de variância dos resultados do experimento para o controle da oxidação nos explantes de *Ocotea porosa*.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	14032,0	4677,3	32,1 *
test x trat	1	5038,0	5038,0	34,6 *
C x AB	1	6744,0	6744,0	46,3 *
A x B	1	2250,0	2250,0	15,4 *
Erro	16	2330,7	145,7	
Total	19	16362,7		

* Significativo ao nível de 0,05.

A análise estatística do experimento para controle da oxidação no sassafrás está demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4. Análise de variância dos resultados do experimento para controle da oxidação nos explantes de *Ocotea odorifera*.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	13980,0	4660,0	21,18 *
Trat x Test	1	9126,67	9126,67	41,48 *
C x AB	1	2640,0	2640,0	12,00 *
A x B	1	3240,0	3240,0	14,73 *
Erro	16	3520,0	220,0	
Total	19	17500,0		

* Significativo ao nível de 0,05.

A análise estatística detectou diferença significativa

entre os tratamentos. Conforme se verifica na Tabela 4, os tratamentos foram eficientes quando comparados com a testemunha que apresentou 92% de explantes oxidados. Ainda conforme a Tabela 4, observa-se que o tratamento C (28% de explantes oxidados) foi melhor do que os tratamentos A (68% dos explantes oxidados) e B (36% dos explantes oxidados) e que o tratamento B foi melhor do que o A.

A concentração mais alta do ácido ascórbico 0,1 g/l foi mais efetiva no controle da oxidação, diminuindo significativamente a taxa de 100 % de oxidação obtida anteriormente para 40 % de explantes oxidados. Na segunda etapa, a presença de polivinilpirrolidone no meio foi decisiva para reduzir esta taxa para apenas 20 % de explantes oxidados e controlar definitivamente a oxidação dos explantes das duas espécies.

Estes resultados concordam com GUPTA (1986), que comparando ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativado, verificou que o ácido ascórbico, esterilizado a frio na concentração de 25,0 mg/l, foi a melhor substância para controlar a oxidação fenólica em meristemas isolados de bananeira. WALKEY (1972) também obteve resultados positivos quando incorporou polivinilpirrolidone ao meio de isolamento de meristemas de macieira e verificou sua essencialidade para um bom desenvolvimento inicial dos explantes e uma significativa redução na taxa de oxidação.

4.3. MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES

O resultado do experimento para a multiplicação das brotações de imbuia se encontra na Tabela 5.

Tabela 5. Número médio de brotações de *Ocotea porosa* cultivadas "in vitro" em meio MS submetidas a várias concentrações de BAP e AIB (30 explantes/tratamento).

AIB (μ M)	BAP (μ M)				
	0	3,23	6,46	9,69	Média
0	0,7f	2,4a	1,5b	1,4c	1,50
4,90	0,5g	1,0d	0,8e	0,8e	0,78
9,80	0,7f	0,7f	0,6g	1,0d	0,75
14,70	0,8e	0,8e	0,7f	0,4h	0,68
Média	0,68	1,23	0,90	0,90	0,93

Obs. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 0.05.

A análise estatística dos dados detectou diferença significativa entre os tratamentos. A análise fatorial (Tabela 5 do Apêndice) mostrou que os efeitos dos dois fatores e da interação foram significativos. Isto pode ser observado na Tabela 5, visto que a presença e o posterior aumento da concentração de AIB reduz o número de brotações. Por outro lado, a presença de BAP aumenta o número de brotações porém à medida que se aumenta sua concentração diminui o número de brotações.

As maiores taxas de brotações multiplicadas obtidas para a lmbuia foi o tratamento que utilizou 3,23 uM de BAP em meio MS sem a adição de AIB (auxina). Este tratamento resultou num número médio de 2,4 brotações por explante (Tabela 5).

Os resultados dos tratamentos para multiplicação do sassafrás encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Número médio de brotações de *Ocotea odorifera* cultivadas "in vitro" em meio MS submetidas a várias concentrações de BAP e AIB (25 explantes/tratamento).

AIB (uM)	BAP (uM)				Média
	0	3,23	6,46	9,69	
0	0,36 fg	0,52 e	0,68 d	1,64 a	0,80
4,90	0,28ghi	0,56 e	0,80 c	1,16 b	0,70
9,80	0,32fgh	0,40 f	0,60 e	0,72 cd	0,51
14,70	0,20 i	0,28ghi	0,40 f	0,24 hi	0,28
Média	0,29	0,44	0,62	0,94	0,57

Obs: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 0,05.

A análise estatística detectou diferença significativa entre os tratamentos testados. A análise fatorial (Tabela 6 do Apêndice) mostrou que o efeito dos dois fatores e sua interação foram significativos. Isto pode ser observado na Tabela 6, onde se demonstra que a presença e o posterior aumento da concentração de AIB diminui o número de brotações. A presença de BAP, ao contrário, aumentou a taxa de multiplicação e quanto maior foi sua concentração, maior o número de brotações.

O melhor tratamento para a multiplicação dos explantes de sassafrás foi o que utilizou BAP a 9,69 μ M, sem a adição de AIB, que resultou numa média de 1,64 brotações/explante (Tabela 6).

Estes resultados concordam com TORRES e CALDAS (1990) que concluíram que as citocininas constituem o grupo de reguladores de crescimento indispensável para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O tipo e a concentração da citocinina são os fatores que mais influenciam o êxito da multiplicação "in vitro". Estes autores citam ainda que, apesar do uso da citocinina estimular maior produção de partes aéreas, o excesso pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento das culturas em algumas espécies.

As brotações obtidas de sassafrás mediam todas menos de 0,5 cm, o que impossibilitou sua medição em altura e conseqüente análise dos dados. No caso da imbuia, muitas brotações mediam mais do que 1,0 cm e por este motivo foram analisados também os dados relativos ao tamanho das brotações obtidas nesta fase. Os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito da concentração de BAP e AIB no tamanho das brotações de *Ocotea porosa* obtidas "in vitro".

AIB (uM)	BAP (uM)				
	0	3,23	6,46	9,69	Média
0	1,84 f	4,39 a	3,10 b	2,89 c	3,06
4,90	1,79 f	2,94bc	2,50 e	2,45 e	2,42
9,80	1,35 g	1,81 f	1,52 g	2,71 d	1,85
14,70	1,70 f	1,82 f	1,52 g	0,80 h	1,46
Média	1,67	2,74	2,16	2,21	2,20

Obs: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 0,05.

A análise estatística dos dados detectou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 7 do Apêndice). Através da comparação de médias, demonstrada na Tabela 7, verifica-se que o tratamento que resultou nas maiores brotações foi o que utilizou 3,23 uM de BAP, sem a adição de AIB. Ainda de acordo com a Tabela 7 pode-se notar que o pior tratamento foi o que utilizou as maiores concentrações de BAP e AIB (9,69 uM). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos pela análise do número de brotações, confirmando a importância da adição de citocinina (BAP) ao meio em baixas concentrações e sua toxicidade em altas concentrações, demonstrando também que a ausência de AIB foi melhor para a obtenção de brotações.

Testes preliminares demonstraram que a melhor citocinina para a indução de brotações foi BAP, sendo que a Zeatina, mesmo em altas concentrações, não promoveu a multiplicação das brotações de nenhuma das duas espécies estudadas. Estes resultados concordam com TORRES e CALDAS (1990), que citam que o BAP tem sido muito

eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser também a melhor citocinina na indução de gemas adventícias. De acordo com ZAER e MAPES (1985), o BAP é a citocinina mais potente para promover a proliferação de partes aéreas e economicamente melhor por ser a mais barata de todas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por DE PAULA (1992), que obteve o melhor índice de brotação em erva-mate utilizando 6,46 μM de BAP sem a adição de auxina. A concentração de 3,23 μM de BAP também foi escolhida como a melhor para a multiplicação de *Malus domestica* (RIBAS 1991). WANG et al. (1991) conseguiram maiores taxas de brotações para o sassafrás de Taiwan no tratamento com 16,16 μM de BAP e sem adição de auxina. LEMOS et al. (1993) obtiveram em média 5 brotações/explante após 45 dias de incubação em meio MS suplementado com 9,80 a 19,60 μM de BAP. Já para WIECHETECK (1990), a adição de auxina foi fundamental para esta fase pois este autor obteve brotações múltiplas em *Eucalyptus viminalis* em meio MS combinado com 0,65 μM de BAP e 0,54 μM de ANA, sendo que este tratamento resultou em 4,6 brotações multiplicadas/explante.

4.4. ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES

Este experimento foi realizado devido ao grande número de brotações, tanto de imbuia quanto de sassafrás, que apresentaram tamanho inferior a 1,0 cm de altura, fator que dificulta a

transferência destas para o meio de enraizamento e conseqüente formação de raízes. Entretanto, somente os explantes de imbuia mostraram resultados positivos com os tratamentos para alongamento. As brotações de sassafrás não apresentaram nenhum incremento em seu tamanho, portanto não foram analisadas.

Os resultados da análise deste experimento para as brotações de imbuia encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para o alongamento das brotações de *Ocotea porosa*.

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	2	0,32	0,16	32 *
Erro	12	0,06	0,005	
Total	14	0,38		

Significativo ao nível de 0,05.

A análise estatística dos dados detectou diferença significativa entre os tratamentos.

Testes preliminares demonstraram uma reação negativa das brotações de imbuia quando colocadas em meio com carvão ativado, inibindo seu alongamento, estes resultados estão de acordo com PINEDO (1989), que obteve os menores incrementos no crescimento em altura das brotações de *Eucalyptus tereticornis* quando utilizou meio de cultura suplementado com carvão ativado. Para esse autor, a testemunha (meio MS suplementado com 0,32 μ M de BAP e 0,54 μ M de ANA e sem adição de carvão ativado nem GA3) foi o melhor meio para o alongamento das brotações. Ao contrário do resultado obtido por WIECHETECK (1990), onde o alongamento das brotações de *Eucalyptus*

viminalis foi conseguido em meio MS suplementado com 15 g/l de carvão ativado.

O melhor tratamento observado para o alongamento das brotações de imbuia foi o que utilizou 1,62 μ M de BAP em meio MS e pode ser verificado na Figura 8. Estes resultados estão de acordo com PINEDO (1989), que obteve as melhores brotações alongadas em meio MS com adição de BAP e ANA. Conforme DESCHAMPS (1993), o ANA influenciou negativamente o desenvolvimento da parte aérea, de forma que o meio de cultura isento dessa auxina proporcionou melhores taxas de alongamento nas brotações de *Sebastiania schottiana*.

4.5 ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES

O sassafrás não produziu nenhuma brotação enraizada. Conforme TORRES e CALDAS (1990), em espécies lenhosas o enraizamento é mais difícil. Outro fator do qual depende o enraizamento é a qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação, partes aéreas pequenas, em geral, não enraizam bem. Apesar dos explantes de sassafrás terem sido submetidos a fase de alongamento, não apresentaram nenhum incremento em seu tamanho, passando para a fase de enraizamento muito pequenos. Os meios de cultura aqui testados, juntamente com os hormônios não foram os adequados para esta espécie.

Figura 8. Aspecto das brotações de *Ocotea porosa* alongadas em meio MS com 1,62 μ M de BAP.



Para a formação de raízes nas brotações de sassafrás recomenda-se testar outros tipos de meio de cultura com diferentes concentrações de sais e vitaminas. Deve-se também verificar o efeito de outros reguladores de crescimento em diferentes concentrações.

A imbuia, ao contrário, obteve resultados positivos nesta fase, portanto, foram analisados somente os dados relativos ao enraizamento desta espécie.

O efeito dos diferentes tratamentos no enraizamento das brotações de imbuia pode ser verificado na Tabela 7.

Tabela 9. Efeito da concentração de sais e de AIB no enraizamento e no número de raízes das brotações de *Ocotea porosa*.

Meio	AIB (μ M)	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes/brotação
MS	0	12	1,7
	2,46	32	1,9
	4,90	36	2,0
MS/2	0	20	1,6
	2,46	64	2,3
	4,90	52	2,1

A análise estatística dos dados detectou diferença significativa entre os tratamentos. Na análise de variância verifica-se também que o tratamento com MS difere estatisticamente do tratamento com MS/2 (Tabela 8 do apêndice).

A redução da concentração de sais do meio MS para a metade da concentração normal foi fundamental para o aumento da

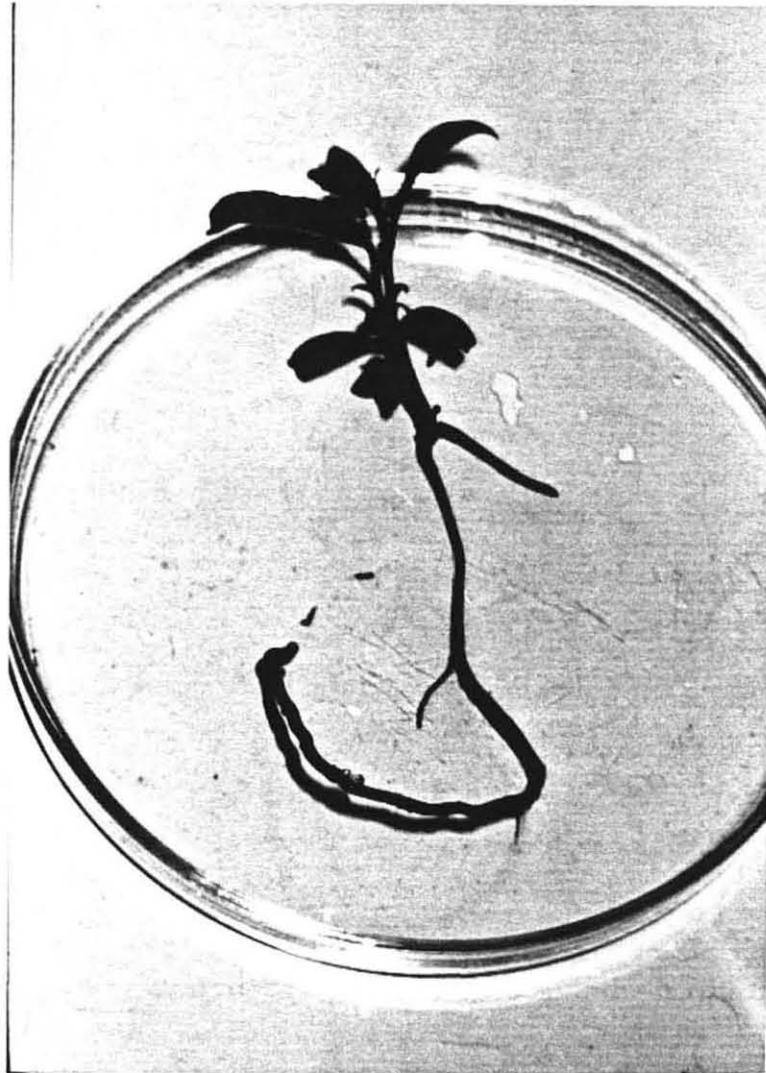
taxa de enraizamento das brotações de *Ocotea porosa* cultivada "in vitro".

A melhor taxa de enraizamento para a imbuia foi obtido com o meio MS/2 suplementado com 2,46 μ M de AIB, com 64 % de enraizamento, e número médio de 2,3 raízes por explante, conforme pode se observar na Tabela 7. Estes resultados concordam com TORRES e CALDAS (1990), que citam que diluições das formulações básicas de meios de cultura têm possibilitado melhor enraizamento. Estes resultados estão de acordo com WEICHETECK (1990), que obteve o melhor índice de enraizamento para *Eucalyptus viminalis* (66,6%) utilizando o meio MS/2 suplementado com 2,46 μ M de AIB.

WANG *et al.* (1991) não confirmam estes resultados para o *Sassafras randaiense*, que obteve a maior taxa de enraizamento (20%) em meio líquido LS adicionado de 24,60 a 49,0 μ M de AIB. Para RIBAS (1991), a permanência das brotações de macieira durante seis dias em meio de enraizamento, MS/4 contendo 0,98 μ M de AIB, 20 g/l de sacarose e 1,0 mg/l de tiamina foi suficiente para a obtenção de 95% de enraizamento, com um número médio de 8 raízes por explante. Segundo DE PAULA (1992), a permanência das brotações de erva-mate durante 12 dias no meio de indução do enraizamento, WPM/2, contendo 14,7 μ M de AIB, e transferência para meio WPM/2 com 1 g/l de carvão ativado por mais 18 dias foi eficaz para a obtenção de 86,2 % de enraizamento, com número médio de 8,2 raízes por explante.

O baixo número de raízes obtido por explante pode ser observado na Figura 9 e, provavelmente, seja característica do gênero *Ocotea*, pois MOURA-COSTA *et al.* (1993) ao trabalharem com

Figura 9. Aspecto da brotação de *Ocotea porosa* enraizada em meio MS/2 com 2,46 μ M de AIB.



embriogênese somática de *Ocotea catharinensis* obtiveram uma baixa taxa de enraizamento (10%) e uma única e longa raiz em explantes cultivados em meio de cultura com concentrações reduzidas de nutrientes.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir o seguinte:

1. A imersão dos explantes de *Ocotea porosa* e *Ocotea odorifera* em hipoclorito de sódio foi indispensável para sua desinfestação, sendo que a concentração e o tempo ideal para a imbuia foi de 10% por 10 minutos e a da sassafrás de 15% por 10 minutos.

2. O controle da oxidação em ambas as espécies mostrou-se eficiente, sendo que a menor taxa de oxidação foi obtida utilizando-se imersão em ácido ascórbico a 0,1 g/l por 30 minutos e adicionando-se 0,01 g/l de polivinilpirrolidone ao meio de cultura.

A adição de citocinina ao meio de cultura MS foi fundamental para a multiplicação das brotações de *Ocotea porosa* e *Ocotea pretiosa* obtidas "in vitro". Para a imbuia, concentração muito elevada de citocinina e auxina apresentou um efeito tóxico para as brotações, diminuindo muito a multiplicação. Já para o sassafrás, somente o aumento da auxina mostrou-se tóxico, pois esta espécie demonstrou necessitar de altas concentrações de citocinina para promover sua multiplicação. O maior número de brotações de imbuia foi obtido utilizando-se 3,23 μ M de BAP e de sassafrás utilizando-se 9,69 μ M de BAP.

4 O alongamento das brotações de *Ocotea porosa* foi obtido transferindo-as para meio MS com 1,62 uM de BAP; as brotações de sassafrás não apresentaram nenhum incremento em seu tamanho.

5 A redução na concentração de sais do meio de cultura foi fundamental para o enraizamento das brotações de imbuia. O melhor índice de enraizamento (64 %) foi obtido utilizando-se meio MS/2 adicionado de 2,46 uM de AIB. As brotações de sassafrás não apresentaram qualquer indício de enraizamento.

6 Sendo em vista o êxito da micropropagação para a imbuia, sugere-se a seleção de genótipos desejáveis para obtenção de plantlets melhorados e que tenham um bom desenvolvimento no campo. Para o sassafrás, recomenda-se testar outros tipos de meios de cultura e reguladores de crescimento que sejam mais adequados para promover a propagação da desta espécie.

SUMMARY

The main objective of this research was to test the viability of vegetative propagation of "imbuia" (*Ocotea porosa*) and "sassafrás" (*Ocotea odorifera*) seedlings through micropropagation. The isolation and transference of the material to the *in vitro* stages were done in a laminar flux camera. The explants were kept in an incubation room at the temperature of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 16 h of photoperiod, and 2000 lux of luminosity. The medium for cultivation was the MURASHIGE and SKOOG (MS). The nodal segments of both species, obtained from 2 year-old seedlings were decontaminated in 5 to 15% concentration sodium hypochlorite solutions for 5 to 15 minutes. Oxidation of the explants was controlled by ascorbic acid solutions in concentrations of .05 to .1 g/l and addition of polyvinylpyrrolidone to the cultivation medium. After four weeks the shoots were transferred to a multiplication medium, where several concentrations of BAP and IBA and its interaction with the MS medium were tested. For shoots elongation the MS medium with BAP (1.62 and 3.23 μM) was used. In the rooting phase MS and MS/2 (half salt concentration) with different concentrations of IBA (2.46 and 4.90 μM) were tested. The best treatment for "imbuia" explants decontamination (73.3% survival) was sodium hypochlorite at 10% for 10 minutes. For "sassafrás" (72.0% survival) it was sodium hypochlorite at 15% for 10 minutes. Oxidation control for both species was more effective when using ascorbic acid at .1 g/l with polyvinylpyrrolidone. The highest multiplication rate for "imbuia" was obtained with the addition of 3.23 μM of BAP and for "sassafrás" with 9.69 μM of BAP. The best treatment for "imbuia" shoots elongation was BAP at 1.62 μM ; no shoot elongation was observed for "sassafrás". The MS/2 along with 2.46 μM of IBA presented the highest rate of rooting for "imbuia" (64% of the shoots). No root was formed in the "sassafrás" in any of the tested treatments.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONGA, J.M. Tissue culture techniques. *In*: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p 4-35.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P. e FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. *In*: FORRES, A.C. e CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. ABCTP-EMBRAPA, . 1990. p.37-70.
- CARVALHO, P.E.R. **Algumas Características Ecológicas e Silviculturais de Quatro Espécies Florestais do Estado do Paraná**. Curitiba, UFPR, Tese de Mestrado em Engenharia Florestal, 1978. 150p.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras, recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. EMBRAPA-CNPQ. 1994. 639p.
- DE PAULA, S.R. **Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) e comparação das folhas "in vitro" com as de casa de vegetação**. Curitiba, UFPR, Tese de Mestrado em Botânica, 1992. 74p.
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa "in vivo" e "in vitro" de**

sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell.Arg.), espécie florestal de mata ciliar. Lavras, ESAL, Tese de Mestrado em Agronomia, 1993. 128 p.

DURAND, R. e BOUDET, A.M. Le boutorage *in vitro* de l'*Eucalyptus*. In: **Micropropagation d'arbres forestiers**. AFOCEL, 1979.

GEORGE, E.F. E SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke, Exegetics, 1984, 709p.

GRATTAPAGLIA, D. e MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. ABCTP-EMBRAPA, 1990. p: 99-169.

GUPTA, P.K. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. In: **Plant cell, tissue and organ culture**, 6: 33-39. 1981.

INOUE, M.T., RODERJAN, C.V. e KUNIYOSHI, Y.S. **Projeto madeira do Paraná**. Curitiba, Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1984. 260p.

LEMONS, O.F. et al. Propagação de pimenta-do-reino através da cultura de ápice caulinar. In: **Resumos do XLIV congresso nacional de botânica**. UFMA, São Luís, 1993.

- LINSMAIER, E.M. e SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, 18:100-127, 1965.
- LLOYD, G. e MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.**, 30:421-427, 1980.
- LORENZI, H., **Árvores brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo, Editora Plantarum, 1992. 352p.
- MARGARA, J. **Multiplicacion vegetativa y cultivo "in vitro". Los meristemas y la organogénesis**. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1988. 232p.
- MOURA-COSTA, P.H., VIANA, A.M. e MANTELL, S.H. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. **Plant cell, tissue and organ culture**. Netherlands, 35: 279-286. 1993.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, 15, p.473-497. 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 25: p.135-166. 1974.

- PIERIK, R.L.M. **Cultivo "in vitro" de las plantas superiores.** Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.
- PINEDO, D.N.H. **Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*.** Curitiba, UFPR, Tese de Mestrado em Engenharia Florestal, 1989. 63p.
- PRUSKI, R., MOHYUDDIN, M. e GRAINGER, G. Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). In. BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry.** Berlin, Springer-Verlag. p. 164-179. 1991.
- RIBAS, L.L.F. **Micropropagação e estudo da parada de crescimento durante a aclimatização de mudas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) C.V. Gala, clone FZ.** Curitiba, UFPR, Tese de Mestrado em Botânica, 1991. 142p.
- REITZ, R., KLEIN, R.M. & REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul.** SUDESUL/ HBR/ Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 1978.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira.** São Paulo. EDUSP, 1971. 294p.
- RODRIGUES, V.A. **Propagação vegetativa da aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi, canela sassafrás *Ocotea pretiosa* Benth & Hook e cedro *Cedrela fissilis* Vellozo através de estacas radiciais e caulinares.** Curitiba, UFPR, Tese de Mestrado em Engenharia Florestal, 1990. 90p.

- SILVA, I.C. **Propagação vegetativa de *Ocotea puberula* Benth & Hook e *Ocotea pretiosa* Nees pelo método da estaquia.** Curitiba, UFPR, Tese de Mestrado em Engenharia Florestal, 1984. 109p.
- SKOOG, F. e MILLER, C.O. Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, 11: 118-130. 1957.
- STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics.** New York, McGraw-Hill, 1960. 481p.
- TOLEDO, M.L.B. *et al.* Micropropagação "in vitro" do bacurizeiro (*Platonia insignis* MART) e da castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Resumos do XLIV congresso nacional de botânica.** vol. 1, p 225. UFMA. São Luís, 1993.
- TORRES, A.C. e CALDAS, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas.** ABCTP-EMBRAPA, 1990. 433p.
- WALKEY, D.G. Production of apple plantlets from axillary bud systems. In: **Can. J. Plant Sci.**, 52:1085-1087, 1972.
- WANG, P.J., HU, C.Y. e CHEN, M.H. Taiwan Sassafras. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry.** Berlin, Springer-Verlag. p: 180-190. 1991.
- WIECHETECK, M.S.S. **Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Labill**

a partir de material juvenil. Curitiba, UFPR, Tese de Mestrado em Engenharia Florestal, 1990. 92p.

WHITE, P.R. **A Handbook of Plant Tissue Culture**. Lancaster, J.J.Cottel, 1943.

ZAER, J.B. e MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. **Tissue culture in forestry**, Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p 231-255.

APÊNDICE

Tabela A1. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para a desinfestação dos explantes de *Ocotea porosa*, comparando-se a testemunha com os tratamentos agrupados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	9	9543,23	1060,36	2,54 *
Trat x Test	1	3465,00	3465,00	8,31 *
Erro	40	16683,15	417,08	
Total	49	26226,37		

Tabela A2. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados na desinfestação dos explantes de *Ocotea porosa*, sem a testemunha.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	8	12761,34	1595,16	5,8 *
Erro	36	9776,91	271,58	
Total	44	22538,25		

Tabela A3. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para a desinfestação dos explantes de *Ocotea odorifera*, comparando-se a testemunha com os tratamentos agrupados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	9	14528,00	1614,22	10,91 *
Trat x Test	1	4110,22	4110,22	27,77 *
Erro	40	5920,00	148,00	
Total	49	20448,00		

Tabela A4. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados na assepsia dos explantes de *Ocotea odorifera*, sem a testemunha.

FV	GL	SO	QM	F
Tratamento	8	10417,00	1302,12	8,62 *
Erro	36	5440,00	151,11	
Total	44	15857,00		

Tabela A5. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para a multiplicação dos explantes de *Ocotea porosa*, comparando-se o efeito do AIB e do BAP e sua interação.

FV	GL	SO	QM	F
Tratamento	15	89,66	5,98	16,16 *
Efeito A	3	40,50	13,50	36,49 *
Efeito B	3	19,14	6,38	17,24 *
A x B	9	30,19	3,35	9,05 *
Erro	64	23,68	0,37	
Total	79	113,51		

Tabela A6. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para a multiplicação dos explantes de *Ocotea odorifera*, comparando-se o efeito do AIB e do BAP e sua interação.

FV	GL	SO	QM	F
Tratamento	15	44,10	2,94	7,35 *
Efeito A	3	13,37	4,46	11,15 *
Efeito B	3	19,62	6,54	16,35 *
A x B	9	44,10	4,90	12,25 *
Erro	64	25,55	0,40	
Total	79	69,65		

Tabela A7. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para a multiplicação dos explantes de *Ocotea porosa* comparando-se o efeito do AIB e do BAP e sua interação (quanto ao tamanho das brotações).

FV	GL	SO	QM	F
Tratamento	15	2,29	0,15	7,5 *
Efeito A	3	1,16	0,39	19,5 *
Efeito B	3	0,46	0,13	6,5 *
A x B	9	0,67	0,07	3,5 *
Erro	64	1,29	0,02	
Total	79	3,58		

Tabela A8. Análise de variância dos resultados dos tratamentos utilizados para o enraizamento das brotações de *Ocotea porosa*.

FV	GL	SO	QM	F
Tratamento	5	23,30	4,66	11,09 *
MS x MS/2	1	6,39	6,39	15,21 *
Erro	24	10,14	0,42	
Total	29	33,44		