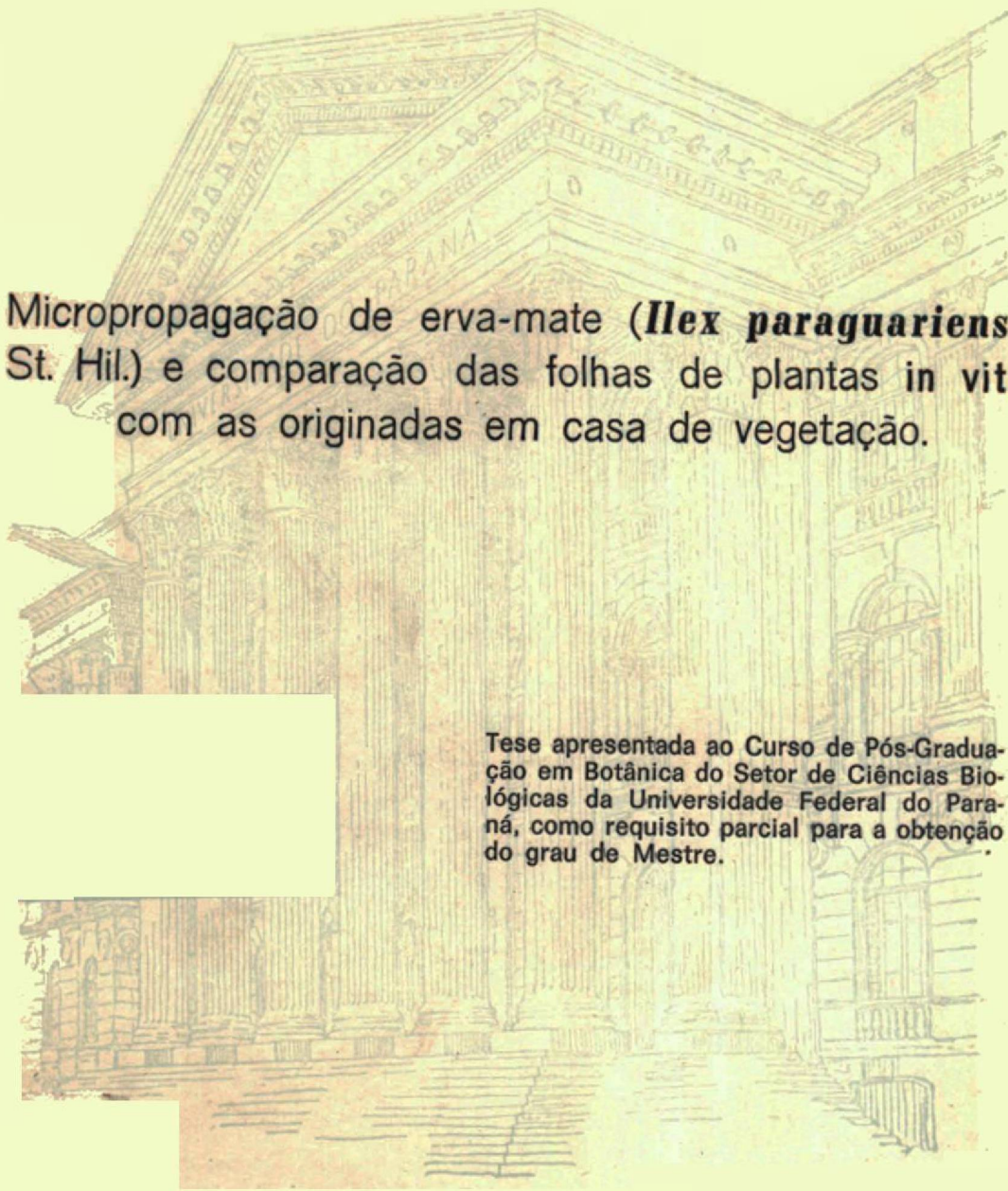


SOLANGE RIBAS DE PAULA



Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e comparação das folhas de plantas *in vitro* com as originadas em casa de vegetação.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA

1992

SOLANGE RIBAS DE PAULA

Micropropagação de erva-mate (***Ilex paraguariensis***
St. Hil.) e comparação das folhas de plantas **in vitro**
com as originadas em casa de vegetação.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA

1992

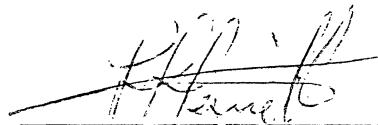
MICROPROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS ST.HIL.) E COMPARAÇÃO
DAS FOLHAS DE PLANTAS IN VITRO COM AS DE CASA DE VEGETAÇÃO.

por

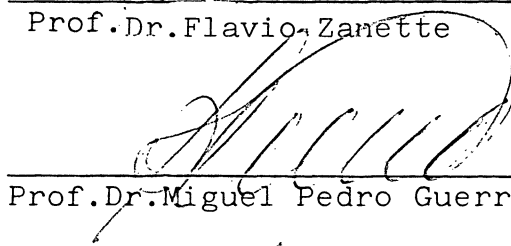
SOLANGE RIBAS DE PAULA

Tese aprovada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-
Graduação em Botânica, pela Comissão formada
pelos Professores:

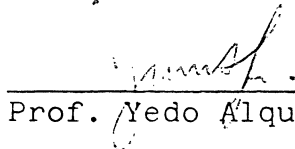
ORIENTADOR:



Prof. Dr. Flavio Zanette



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra



Prof. Yedo Alquini

Curitiba, 17 de dezembro de 1992

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio Zanette, pela orientação e apoio para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Yedo Alquini, pela inestimável contribuição e estímulo.

A Prof. Cecília Iritani, pelas valiosas sugestões e pelo incentivo no início deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Armando Carlos Cervi e ao Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade da realização do Mestrado.

Ao prof. Dr. Miguel Guerra, pelas sugestões e auxílios prestados.

Aos pesquisadores Edilson Batista de Oliveira e Osmir José Lavoranti do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPF/EMBRAPA), pela orientação nas atividades de processamento de dados e análises estatísticas.

A Luciana Fortes Ribas, pelos auxílios prestados e amizade.

A Leão Jr. S.A, pelo fornecimento das mudas matrizes.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A minha família pelo apoio e dedicação.

Ao meu marido, pelo estímulo e compreensão.

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

Ao Biólogo Nilson Belem Filho, pelos auxílio na Microtécnica.

Aos Profs. Robin M. Hoffmeister e Daura Regina Eiras Stofella e à funcionária Vera Regina Fontana Fiompeke do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela orientação nas atividades de Microscopia Eletrônica de Varredura.

As bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pela revisão das referências bibliográficas.

A Prof. Maria Regina T. Boeger, do Departamento de Botânica da UFPR, pela revisão do resumo em inglês.

Aos amigos Eliana, Iriana, Luís Antônio, Ruy, Ana, Jovita, Cleusa e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	vi
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
	RESUMO.....	xii
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ERVA-MATE.....	3
2.1	ENQUADRAMENTO TAXINÔMICO.....	3
2.2	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE.....	3
2.3	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1	COLETA, OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES	6
3.2	ISOLAMENTO.....	9
3.3	OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS ;;;.....	10
3.4	ENRAIZAMENTO	15
3.5	DESCRIÇÃO COMPARATIVA DA SUPERFÍCIE FOLIAR..	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	MEIOS DE CULTURA.....	20
4.2	CONDIÇÕES AMBIENTAIS DAS CULTURAS.....	22
4.3	FONTE DE EXPLANTES.....	22
4.4	DESFESTACÃO E ISOLAMENTO DO MATERIAL VEGETAL;	22
4.5	OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS.....	23

4.6	ENRAIZAMENTO E TRANSPLANTE DAS MUDAS.....	25
4.7	DESCRIÇÃO COMPARATIVA DA SUPERFÍCIE FOLIAR.	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	29
5.1.1	Contaminação.....	29
5.1.2	Oxidação.....	31
5.1.3	Sobrevivência.....	32
5.2	OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS.....	34
5.2.1	Experimento 1	34
5.2.2	Experimento 2	36
5.2.3	Experimento 3	40
5.3	ENRAIZAMENTO E TRANSPLANTE DAS MUDAS.....	43
5.4	DESCRIÇÃO COMPARATIVA DA SUPERFÍCIE FOLIAR.	50
5.4.1	Folhas de plantas cultivadas em casa de vege- tação.....	50
5.4.2	Folhas de plantas cultivadas <u>in vitro</u>	51
5.4.3	Folhas atípicas de plantas cultivadas <u>in vi- tro</u>	51
6	CONCLUSÕES.....	62
	SUMMARY.....	64
	ANEXOS.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS

1. Composição dos meios de cultura: WPM (1981) e MS (1962), preparado segundo VASIL e HILDEBRANDT.... 21
2. Efeitos da concentração de hipoclorito de sódio e período de exposição na desinfestação de explantes nodais de Ilex paraguariensis St. Hil., cultivadas in vitro.....30
3. Multiplicação de brotações de Ilex paraguariensis St. Hil., submetidas à variações de reguladores de crescimento e meio de cultura, após um mês.....35
4. Número médio de brotações de Ilex paraguariensis St. Hil., cultivadas in vitro nos meios WPM e MS, acrescidos de 2 mg/l de BAP e submetidas às variações nas concentrações de AIB, em 3 subcultivos.....38
5. Efeito do meio de cultura, concentração de BAP, subcultivo e presença de carvão ativado sobre o número médio de brotações de Ilex paraguariensis St. Hil., cultivadas in vitro.....42
6. Enraizamento in vitro de brotações de Ilex para-
riensis St. Hil, que permaneceram 30 dias em meio

indutor e brotações que passaram por 12 dias em meio indutor e depois transferidas para meio de desenvolvimento de raízes.....	44
1A. Análise de variância das concentrações de AIB no enraizamento, após 30 dias de exposição no meio indutor, com estudo da regressão polinomial.....	66
1B. Análise de variância das concentrações de AIB no enraizamento em duas fases (12+18 dias), com es- tudo da regressão polinomial.....	66
1C. Coeficientes do modelo de regressão para a con- centração de AIB, no meio de enraizamento em duas fases.....	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Segmento nodal de Ilex paraquariensis St. Hil., após 20 dias em meio de isolamento..... 33
2. Brotação da 6ª subcultura de Ilex paraquariensis St. Hil., após 30 dias em meio de multiplicação WPM, contendo 2,0 mg/l de BAP..... 39
- 3A. Enraizamento in vitro das brotações de Ilex paraquariensis St. Hil., após 30 dias em meio de enraizamento WPM/2, contendo 5 mg/l de AIB.....46
- 3B. Enraizamento in vitro das brotações de Ilex paraquariensis St. Hil., após 12 dias de permanência no meio indutor WPM/2 contendo 5 mg/l de AIB e posterior transferência para meio de desenvolvimento das raízes, contendo 1 g/l de carvão ativado, durante 18 dias..... 47
4. Sobrevivência de mudas de Ilex paraquariensis St. Hil., regeneradas in vitro e mantidas em casa de vegetação, após 2 meses..... 48
5. Sobrevivência de mudas de Ilex paraquariensis St. Hil., regeneradas in vitro e mantidas em casa de vegetação, após 6 meses.....49

6.	Epiderme da face abaxial da folha da planta cultivada em casa de vegetação. 1620x.....	53
7.	Epiderme da face adaxial da folha da planta cultivada em casa de vegetação. 1620x.....	54
8.	Epiderme da face abaxial da folha da planta cultivada <u>in vitro</u> . 1620x.....	55
9.	Epiderme da face adaxial da folha da planta cultivada <u>in vitro</u> . 1620x.....	56
10.	Epiderme da face abaxial da folha da planta cultivada <u>in vitro</u> atípica..1620x.....	57
11.	Epiderme da face adaxial da folha da planta cultivada <u>in vitro</u> atípica. 1620x	58
12.	Tricoma tector ao nível da nervura principal da folha da planta cultivada em casa de ve - getação. 2400x	59
13.	Face adaxial da epiderme da folha da planta cultivada em casa de vegetação.....	61
14.	Face adaxial da epiderme da folha da planta cultivada <u>in vitro</u>	61
15.	Face adaxial da epiderme da folha da planta cultivada <u>in vitro</u> atípica	61

16. Face abaxial da epiderme da folha da planta
cultivada em casa de vegetação 61
17. Face abaxial da epiderme da folha da planta
cultivada in vitro..... 61
18. Face abaxial da epiderme da folha da planta cul
tivada in vitro atípica..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - ácido indolacético

AIB - ácido indolbutírico

ANA - ácido naftalenoacético

BAF - benzilaminopurina

KW - Kruskal-Wallis

MS - MURASHIGE e SKOOG

MS/2 - MS com metade das concentrações de sais

MS/3 - MS com 1/3 das concentrações de sais

MS/4 - MS com 1/4 das concentrações de sais

WPM - Woody Plant Medium

2iP - isopenteniladenina

RESUMO

Foram produzidas mudas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. através da micropropagação. O isolamento e as transferências 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 dias longos e luminosidade de 2000 lux. Os meios de cultura utilizados, foram o de MURASHIGUE e SKOOG (MS) e de LLOYD e MCCOWN (WPM). Segmentos nodais com aproximadamente 3 cm de comprimento, obtidos de mudas de 2 anos de idade, foram desinfestados em solução de 10 ou 15% de hipoclorito de sódio (5% Cl livre) e cultivados em meio MS. Após 30 dias, os explantes foram repicados para meio de multiplicação. Na multiplicação testou-se: a influência de BAP, 2iP ou Zeatina na concentração de 2 mg/l nos meios MS e WPM; a adição de auxina (AIB) combinada com citocinina (BAP) nos meios MS e WPM durante 3 subcultivos; a adição de carvão ativado (1 g/l) e BAP (0,5 e 1 mg/l) nos meios MS e WPM durante 3 subcultivos. O enraizamento foi avaliado em duas fases (indução e alongamento das raízes) durante 12+18 dias, e em uma única fase durante 30 dias, empregou-se diferentes concentrações de AIB no meio WPM/2. As mudas foram transplantadas e colocadas em casa de vegetação modelo Van der Hoeven. Durante a multiplicação, observou-se o aparecimento de folhas atípicas, foi feito um estudo comparativo da superfície foliar de plantas cultivadas em casa de vegetação, plantas cultivadas *in vitro* e ainda, plantas cultivadas *in vitro* atípicas, ao nível de microscopia fotômica e microscopia eletrônica de Varredura. As etapas *in vitro* apresentaram resultados satisfatórios, sendo o melhor tratamento na desinfestação, o qual utilizou 15% de hipoclorito de sódio por 10 minutos, através do qual se obteve 20,1% de contaminação, 5,7% de oxidação e 72,9% de sobrevivência dos explantes. O regulador de crescimento BAP proporcionou a maior taxa de multiplicação de brotações apicais no 1º subcultivo, com um número médio de brotações por explante de 2,43 no meio MS e 2,28 no meio WPM. A permanência de brotações sub-apicais durante 3 subcultivos no mesmo meio de cultura (WPM+2 mg/l BAP) propiciou a maior taxa de multiplicação (3,75 brotações/explante). A utilização de baixas dosagens de BAP e adição de carvão ativado no meio de cultura proporcionou bom aspecto das brotações e baixas taxas de multiplicação. O enraizamento em 2 fases (indução e alongamento) proporcionou maiores percentagens de enraizamento, 86,2%, com um número médio de 8,2 raízes/explante. As mudas enraizadas tiveram bom desenvolvimento após o transplante para a terra. O estudo comparativo da superfície foliar revelou respostas marcantes entre as 3 situações acima, evidenciadas a nível estrutural.

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) é uma espécie nativa do Sul do Brasil e de importância econômica. As suas folhas são utilizadas no preparo de uma infusão estimulante conhecida por chimarrão e também, no preparo do chá-mate.

A utilização dessa planta para a fabricação de bebida tônica e estimulante já era conhecida pelos aborígenes antigos da América do Sul. Os primeiros cultivos foram realizados nos séculos XVII e XVIII, durante a dominação dos padres da Companhia de Jesus sobre os índios guaranis. Os jesuítas passaram a dedicar maior atenção ao desenvolvimento da cultura, a produção foi organizada e estabeleceram-se os primeiras práticas de manejo dessa planta, inclusive a estratificação das sementes (REITZ, 1967).

Apesar de ser uma espécie utilizada há muito tempo, muito pouco se conhece sobre a sua biologia. Os problemas com os quais se depara o cultivo mediante sementes são a produção de plantas muito heterogêneas, o baixo poder germinativo das sementes e o tempo excessivamente longo de sua germinação. Segundo HU (1975), o gênero *Ilex* tem sementes dormentes por imaturidade embrionária. Devido a esses fatos, o emprego de técnicas de multiplicação

vegetativa seria uma alternativa para a propagação de plantas selecionadas.

Entre os métodos de propagação vegetativa, a micropropagação apresenta as seguintes vantagens: a) requer menor quantidade de material vegetativo inicial, possibilitando sua multiplicação rápida e em espaço físico reduzido; b) permite a obtenção de plantas livres de patógenos; c) proporciona maior flexibilidade no controle dos fatores ambientais e dos fatores químicos envolvidos no processo de regeneração; c) possibilita a clonagem de genótipos superiores selecionados; e) permite a produção ao longo do ano e independente das mudanças estacionais.(GEORGE e SHERRINGTON, 1984; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

O presente trabalho tem por objetivos a) ^o o desenvolvimento de um protocolo para a regeneração de plantas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. a partir de segmentos nodais de mudas; b) a descrição comparativa da superfície foliar entre plantas cultivadas em casa de vegetação, plantas cultivadas in vitro e ainda, plantas cultivadas in vitro mas que se apresentavam atípicas, devido ao aparecimento de brotações com folhas atípicas durante a fase de multiplicação.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ERVA-MATE

2.1 ENQUADRAMENTO TAXINÔMICO

Sistema de ENGLER (1964)

Divisão: Angiospermae

Classe: Dicotyledoneae

Subclasse: Archichlamydeae

Ordem: Celastrales

Família: Aquifoliaceae

Gênero: *Ilex*

Espécie: *Ilex paraguariensis* St. Hil.

Sistema de CRONQUIST (1981)

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Celastrales

Família: Aquifoliaceae

Gênero: *Ilex*

Espécie: *Ilex paraguariensis* St. Hil

2.2 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

É uma árvore de porte médio, que pode atingir de 15 a 20 metros, ou mais. A espécie é inteiramente glabra, lenho novo seco de cor cinzento-escura, castanho-escura ou preta,

lenho mais velho cinzento, amarelo-castanho ou castanho. Folhas de limbo finamente coriáceo até coriáceo, 3-5-8 cm de comprimento por 2-3-4-4,6 cm de largura, obovado até largamente obovado, margens irregulares, subdistintas, grossas, menos vezes finamente crenadas, ocasionalmente crenado-crenuladas, ápice obtuso ou arredondado, algumas vezes com um múcron curto ou longo, base aguda, longo-aguda ou cuneada, decurrente pelo comprimento do pecíolo, no secar verde, oliváceo-verde ou castanho-verde por cima, mas pálido por baixo, costa insculpida ou plana por cima, um pouco elevada por baixo, nervuras laterais sub-obsoletas até aparentes por cima e por baixo, não-pontuadas, pecíolos às vezes um pouco gibosos na base, 7-15-17 mm de comprimento. Flores unissexuadas em inflorescências fasciculadas, nascidas sobre lenh^o velho, de rebentos totalmente florais, axilares nas folhas. A floração ocorre de setembro a dezembro, predominantemente em outubro (EDWIN e REITZ, 1967). Segundo o aspecto morfo-anatômico do fruto a classificação mais adequada seria nuculânio (GIBERTI, 1979).

2.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A espécie é mais abundante no interior de matas, acompanhando a distribuição de *Araucaria angustifolia*, ocorrendo na região centro-sul da América do Sul, sendo mais freqüente na região das bacias dos rios Uruguai, Paraná e Paraguai. A sua área total de distribuição está entre os paralelos 14 e 35 de latitude sul e os meridianos

5
40 e 65 de longitude oeste (ARANDIA, 1986 citado por CUNHA,
1990¹).

¹ARANDIA, D. Área de distribución natural de la yerba-mate. Miscelanea 14, 1986. Citado por: CUNHA, G.G. Cultura de embriões de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) "in vitro". Porto Alegre, 1990, 51p. Tese, Mestrado em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação pode ser definida como um método de propagação vegetativa baseada na multiplicação de uma planta *in vitro* (CHÉE, 1984). O termo *in vitro* cobre uma ampla faixa de técnicas que envolvem o crescimento, sob condições assépticas, de órgãos de plantas, tais como brotações, raízes ou embriões, ou mesmo a cultura de massas de células não organizadas ou calos, células simples ou protoplastos (WILKINS *et al.*, 1985).

3.2 COLETA, OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

A coleta do material vegetal deve ser feita de preferência a partir de brotações novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, na primavera e início do verão. Gemas coletadas no período de inverno são frequentemente contaminadas (SNIR e EREZ, 1980; CHALUPA, 1981; McCOWN e McCOWN, 1987).

A condição fitossanitária da planta matriz é importante na medida que irá determinar a facilidade de se descontaminar o explante durante o isolamento. Mudas de um a doze meses de idade oriundas de sementes em casa de vegetação ou sob condições laboratoriais têm se mostrado como excelente fonte de explantes (CHALUPA, 1981).

A contaminação é um problema que tem dificultado a condução de experimentos em função do número reduzido de explantes obtidos. Os explantes mais comumente utilizados para o estabelecimento de culturas lenhosas são as gemas apicais e axilares (CHALUPA, 1981). Essas gemas abrigam uma variedade de microflora endógena, incluindo bactérias e fungos, que persiste mesmo após os procedimentos tradicionais de desinfestação. É importante avaliar o grau e a natureza dos contaminantes residuais que escapam da desinfestação tradicional para que possa ser feito um tratamento com fungicida e/ou antibiótico adequados (HALDEMAN *et al.*, 1987). Tem sido bastante eficaz, com diversas espécies, uma pulverização com soluções de agentes sistêmicos como o Benomyl (Benlate, solução 0,2%) (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). HALDEMAN *et al.*, (1987) reduziram a taxa de contaminação fúngica de brotações apicais de *Camellia sinensis* e *C. japonica* usando Benomyl nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/l.

Estudos tem indicado que a multiplicação de plantas a partir de material adulto é mais difícil de ser obtida quando comparada com material juvenil (MEHRA-PALTA e THOMPSON, 1987; REY e MOGRINSKI, 1988). Segundo McGRANAHAN, DRIVER e TULECKE (1987), entre as dificuldades em se propagar material adulto estão a alta contaminação, o crescimento lento e a excessiva formação de calo.

Várias substâncias podem ser utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos à base de cloro como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Outros agentes desinfestantes usados incluem o

cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio. Ocasionalmente, são citados, também ácidos ou bases concentradas, o merthiolate, outros tipos de álcool como o isopropanol e algumas substâncias do grupo das bases quaternárias, como os triquaternários de amônio (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). A exposição rápida dos explantes ao etanol 70% tem sido efetiva para a desinfestação dos explantes (BONGA, 1985). Enquanto que, McCOWN e McCOWN (1987) consideraram inefetivos ou desvantajosos pré-tratamentos utilizando-se etanol.

As concentrações das soluções desinfestantes podem variar muito, assim como as combinações dos seus princípios ativos e os tempos de exposição. O tamanho do explante e a consistência do tecido a ser desinfestado, isto é, se é herbáceo ou mais lignificado orientam o tipo de assepsia a ser utilizada (BOULAY, 1987).

Segmentos nodais de erva-mate foram desinfestados em uma imersão de etanol 70% durante 1 minuto e posteriormente em uma solução comercial de água de lavandina (2% de hipoclorito de sódio) durante 25 minutos e finalmente enxaguados em água destilada e esterilizada (REY e MOGRINSKI, 1988).

Na cultura de tecidos de plantas lenhosos, o grau de contaminação varia muito de ano para ano, mesmo quando os explantes são obtidos de material coletado da mesma árvore e na mesma época durante vários anos. Isso é provavelmente causado pelos ciclos climáticos e flutuações em outros fatores ambientais (BONGA, 1985).

3.3 ISOLAMENTO

Os cuidados a serem tomados durante a manipulação dos explantes nessa primeira fase, são importantes para a sobrevivência e posterior desenvolvimento dos mesmos. Muitas espécies lenhosas contêm compostos fenólicos, os quais são oxidados após a excisão do explante, as extremidades cortadas tornam-se escuras rapidamente e os produtos de oxidação inibem o crescimento do explante e frequentemente o levam à morte. Esse escurecimento ocorre com maior frequência quando esses explantes são oriundos de árvores na fase adulta. Uma das medidas para se prevenir a oxidação é mergulhar os explantes em água deionizada e esterilizada imediatamente após a excisão (BONGA, 1982; CHALUPA, 1987).

REY e MOGRINSKI (1988) verificaram que a maioria dos explantes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. coletados de árvores adultas oxidaram e que com explantes oriundos de plantas com dois anos de idade a taxa de oxidação foi de 40%. Com o objetivo de reduzir a oxidação, foi adicionado L-cisteína no meio de cultura e na água destilada e esterilizada durante a lavagem dos explantes.

CHALUPA (1987) recomenda alguns procedimentos para evitar a oxidação dos explantes recém-cortados: a) a colocação em água destilada e esterilizada por algumas horas ou em uma solução de antioxidantes; b) incubação no escuro ou em baixa intensidade luminosa; c) transferências periódicas para um novo meio de cultura; d) adição de antioxidantes ao meio de cultura.

3.4 OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Os órgãos diferenciados de plantas podem crescer em cultura sem perder a integridade. A natureza do crescimento que ocorre depende do tipo de estrutura que é cultivado e do tipo de predeterminação genética que as células receberam. Cada tipo de planta tem uma constituição genética característica (genótipo), as células não utilizam todo o seu potencial de informação genética. Alguns genes podem se expressar continuamente, mas outros somente em ocasiões específicas. A expressão gênica é afetada pelo ambiente onde a célula se encontra. Mudanças na regulação gênica que persistem por um longo período após removidas as condições de indução e que podem passar de uma célula para outra, são ditas epigenéticas. As que ocorrem temporariamente em resposta a um estímulo e desaparecem quando este é removido, são fisiológicas. A determinação é um fenômeno epigenético. Os órgãos das plantas podem ser de dois tipos: a) órgãos determinados- os quais são destinados a ter tamanho e forma definidos (folhas, flores e frutos) e b) órgãos indeterminados- onde o crescimento é potencialmente ilimitado, como acontece com o meristema apical de raízes e gemas (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

As citocininas constituem o grupo de reguladores de crescimento indispensáveis para estimular a multiplicação. Segundo CHALUPA (1987) das citocininas testadas (Cinetina, benzilaminopurina (BAP), isopenteniladenina (2iP) e Zeatina) o BAP foi a citocinina mais eficaz para promover a multiplicação de diversas espécies lenhosas.

O regulador BAP induz a formação de grande número de brotações, enquanto cinetina e 2iP permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas (HU e WANG, 1983). HASEGAWA (1980); WEBB e VILLALOBOS (1987) também verificaram maior eficiência de BAP em relação à outras citocininas. REISCH (1986) em estudos com quatro genótipos de *Vitis*, obteve melhores resultados com o BAP, mas cada genótipo respondeu diferentemente à mesma concentração. Para algumas espécies as concentrações efetivas de BAP são baixas (0,2-1,0 mg/l) mas muitas espécies necessitam de concentrações mais altas (CHALUPA, 1987).

Os meios de multiplicação podem ainda conter baixas concentrações de auxina. As mais freqüentemente utilizadas são o ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB), que podem estimular o crescimento (CHALUPA, 1987). Entretanto, em um grande número de casos a citocinina somente, é suficiente para uma taxa de multiplicação satisfatória (BHOJWANI e RAZDAN, 1983). WEBB e VILLALOBOS (1987) constataram em coníferas melhores resultados na multiplicação quando utilizavam somente citocinina. Em erva-mate os melhores resultados foram obtidos no meio MS + 0,01 mg/l AIB + 3 mg/l 2iP, com 46% dos ápices formando brotações (REY e MOGRINSKI, 1988).

O efeito dos reguladores de crescimento pode ser significativamente modificado pelo meio de cultura utilizado (BONGA, 1985; McCOWN e SELLMER, 1987). A interação entre auxina e citocinina na indução de brotações pode ser afetada por: a) os níveis de reguladores de

crescimento endógenos podem ter efeito inibitório na organogênese; b) as condições de cultura, envolvendo fatores nutricionais e físicos (DODDS e ROBERTS, 1982; MINOCHA, 1987).

JOHN e MURRAY (1981) citados por JOHN e WEBB (1987)^e constataram que ao se subcultivar segmentos apicais e segmentos axilares de *Picea sitchensis* o desenvolvimento era diferente, a taxa de multiplicação de segmentos apicais era maior que a taxa de segmentos axilares. HASEGAWA (1979) também verificou que ápices de roseira apresentavam maior capacidade de multiplicação quando comparados com gemas laterais.

As taxas de multiplicação dependem do número de subcultivos (SOMMER e WETZSTEIN, 1987). CHALUPA (1987) verificou em *Salix alba* que a formação de brotos múltiplos ocorreu após a terceira transferência para o meio Woody Plant Medium (WPM) com 0,2-1,0 mg/l de BAP.

A exposição à diferentes reguladores de crescimento provavelmente dá início a uma sequência programada de eventos na célula, que resulta na regulação do padrão de divisões celulares que conduz à formação de raízes ou gemas. A função dos reguladores de crescimento na morfogênese pode ter as seguintes características: 1) Os efeitos dos reguladores de crescimento não são específicos em muitos casos. Alguns reguladores de mesma classe (por

^eJOHN, A.; MURRAY, B.W. Micropropagation of Sitka spruce. In: Proc. IUFRO Sect. 52015. Int. Workshop "In Vitro" cultivation for tree species, Fontainebleu, 1981, p.65-70. Citado por: JOHN, A.; WEBB, K.J. Sitka spruce (*Picea sitchensis* (BONG.) CARR.) In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 30-41.

exemplo, auxinas diferentes) podem elucidar respostas morfogênicas diferentes em um dado tecido. 2) Algumas respostas morfogênicas são causadas pela combinação de dois ou mais reguladores em certas concentrações, entretanto, outras concentrações dos mesmos reguladores podem não ter o mesmo efeito ou ter um efeito qualitativamente diferente. 3) Existe uma fase lag de alguns dias até uma semana entre o tratamento com os reguladores e a resposta morfogênica nas culturas de células de muitas plantas. 4) Em muitos casos, um tratamento sequencial com mais de um regulador é mais efetivo na indução da morfogênese do que um tratamento simultâneo com os mesmos reguladores. 5) Muitos reguladores são rapidamente metabolizados em componentes fisiologicamente inativos. 6) Muitos reguladores não causam diferenças qualitativas nos processos de transcrição e tradução em sistemas isolados, entretanto, informações nessa área são escassas até o momento. 7) A sensibilidade das células da mesma planta ou de células que crescem em cultura varia significativamente de tempo em tempo com o(s) mesmo(s) regulador(es) (MINOCHA, 1987).

Altas concentrações de BAP podem induzir a formação de rosetas. SOMMER e WETZSTEIN (1987) constataram em *Liquidambar styraciflua* que brotações que permaneceram na forma de rosetas não enraizaram. BALL (1987) também verificou em *Sequoia* que após dois ou três meses em meio de multiplicação, as brotações apresentavam-se como rosetas. Essas brotações alongaram após serem cortadas e introduzidas em meio sem citocinina e contendo carvão

ativado e auxina. A adição de carvão ativado (0,1-1,0%) no meio de cultura tem se mostrado benéfica durante a multiplicação (THORPE e PATEL, 1984). O carvão ativado tem sido útil nessa fase em função de sua capacidade de reter concentrações excessivas de reguladores e compostos tóxicos que inibem a morfogênese (FRIDBORG *et al.*, 1978). CHALUPA (1987) obteve com *Castanea sativa* um grande número de brotações multiplicadas em meio contendo 1-2 mg/l de BAP, porém essas brotações não alongaram. Concentrações de BAP entre 0,1 e 0,5 mg/l resultaram na multiplicação e alongamento dessas brotações. KRIKORIAN e KANN (1987) avaliaram a interação entre carvão ativado e BAP no modo de crescimento de *Sapium*. Os subcultivos em meios com altos níveis de BAP ocasionaram a necrose e a perda das culturas, mas quando estas foram transferidas para um meio onde a proporção de BAP foi mais baixa com relação à proporção de carvão ativado, o escurecimento foi minimizado.

ANDERSON (1984) constatou que muitas culturas de *Rhododendron* tornavam-se cloróticas ou morriam nos segundo e terceiro subcultivos no meio MS. REY e MOGRINSKI (1988) verificaram em erva-mate que após o segundo subcultivo em meio MS ou MS/2, que as brotações pararam de crescer e as folhas adquiriram uma coloração marrom, enquanto que no meio MS/4 as brotações continuaram crescendo lentamente.

Um aumento nas concentrações de citocinina pode resultar em anormalidades morfológicas, como folhas malformadas em *Begonia* (FONNESBECH, 1974). WIECHETECK (1990) verificou em *Eucalyptus viminalis* que concentrações mais elevadas de BAP mostravam-se prejudiciais para a

qualidade das brotações. Sob tais condições verificou-se um maior número de brotações com tamanho reduzido e atípicas com folhas túrgidas, arredondadas e entumescidas, gemas múltiplas não desenvolvidas e ocorrência de gemas no ápice de hastes espessas.

A vitrificação é uma desordem fisiológica que afeta frequentemente plantas durante a propagação vegetativa *in vitro*. Geralmente os caules de brotações vitrificadas são espessos e translúcidos; as folhas são espessas, enrugadas, encurvadas e frequentemente muito alongadas e quebradiças (KEVERS *et al.*, 1984; VIEITEZ *et al.*, 1985; PASQUALETTO *et al.*, 1986; GASPAR *et al.*, 1987; BOTTCHEER *et al.*, 1988).

Em muitos casos, folhas vitrificadas não possuem tecido paliçádico, mas somente tecido lacunosocom grandes espaços intercelulares e muitos vacúolos. As folhas apresentam menor incidência de estrias epicuticulares e de uma forma descontínua e poucos estômatos quando comparadas com folhas normais. Entretanto, os sintomas de vitrificação podem não ser os mesmos em todas as plantas (GASPAR *et al.*, 1987). A deposição das estrias epicuticulares são significativamente diferentes em espessura e na composição em folhas vitrificadas quando comparadas com folhas normais (ZIV, 1991).

3.5 ENRAIZAMENTO

As percentagens de enraizamento aumentam com a redução das concentrações de sais no meio de cultura. Embora as variações sejam inúmeras conforme a espécie e o

16
método de enraizamento, diluições de 1/2, 1/3 e 1/4 da concentração salina do meio de MURASHIGUE e SKOOG (MS) são frequentes nessa fase (HASEGAWA, 1980; BURGUER et al, 1985; CHALUPA, 1987; REY e MOGRINSKI, 1988). Formulações originalmente mais diluídas como Woody Plant Medium (WPM) têm sido mais eficientes na formação de raízes do que o meio MS (CHALUPA, 1987). Mesmo na presença de auxina, altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fase de enraizamento, mas particularmente a de crescimento das raízes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

A formação de raízes é estimulada pelas auxinas, e as mais frequentemente utilizadas são AIB e ANA (CHALUPA, 1987; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). REY e MOGRINSKI (1988) verificaram uma taxa de 50% de enraizamento de brotações de erva-mate obtidas *in vitro* quando foram assepticamente tratadas com 100 mg/l de ANA durante 4 horas e em seguida cultivadas em MS/4. Para algumas espécies lenhosas, como *Prunus avium* e *Castanea sativa*, o enraizamento tem sido proposto em duas fases: indução e desenvolvimento das raízes. As raízes são induzidas em um meio de cultura com altas concentrações de auxinas e posteriormente o alongamento das raízes se dá em um meio sem auxina (CHALUPA, 1987). Com as cultivares Mc. Intosh e Delicious de macieira, LANE (1978) induziu o enraizamento em meio MS/2, contendo 2 mg/l de ANA. Após quatro semanas, formaram-se muitas raízes e pouco calo. As brotações foram transferidas para um meio sem reguladores de crescimento durante três semanas, para o desenvolvimento das raízes. RIBAS (1991) obteve com macieira, 95,24% de enraizamento e

uma média de 7,9 raízes por brotação em meio de indução contendo 0,2 mg/l de AIB durante 6 dias e após esse período, as brotações foram transferidas para o meio de desenvolvimento por um período de 9 dias.

O estímulo para a formação de raízes adventícias é acionado pela auxina e a concentração necessária para tal é maior de que a que determina o alongamento da raiz (BONNER e GALSTON, 1973). Segundo JAMES e THURBON (1979), o AIB exerceu um efeito inibidor no alongamento das raízes, sendo que a presença contínua de auxina contribuiu para reduzir significativamente o número de raízes produzidas. GRAÇA *et al* (1988) trabalhando com estaquia de erva-mate, verificaram que o uso de AIB em uma concentração mais elevada (10.000 ppm) não foi benéfica ao enraizamento. Esse efeito foi mais visível para as secções apical e basal das estacas, onde foi observada uma redução do enraizamento, em relação à concentração de 2.000 ppm. Isto sugere que a utilização de uma concentração excessiva de AIB pode ser tóxica para a iniciação e desenvolvimento do sistema radicial dessas estacas.

Um grande número de diferentes espécies tem enraizado mais rapidamente quando carvão ativado é adicionado no meio de cultura posterior à indução, ou seja, na etapa do desenvolvimento das raízes (GEORGE e SHERRINGTON, 1984; GUPTA e MASCARENHAS, 1987). Segundo CHALUPA (1987), as maiores percentagens de enraizamento de *Castanea sativa* foram obtidas quando as brotações foram colocadas em meio MS/2 + 3 mg/l de AIB por 12 dias e após esse período, as brotações foram transferidas para um meio

sem auxina e na presença de carvão ativado. Também para *Acer pseudoplatanus* e *Quercus suber* a utilização do carvão ativado melhorou as taxas de enraizamento. As concentrações de carvão ativado utilizadas nos meios de cultura variaram entre 0,1 e 2%. O carvão ativado simula a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, e também tem efeito diluidor, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio de cultura, absorvendo o excesso de AIB e compostos tóxicos inibidores do enraizamento (SNIR e EREZ, 1980; GEORGE e SHERRINGTON, 1984; GRATTAPAGLIA, 1990).

3.6 DESCRIÇÃO COMPARATIVA DA SUPERFÍCIE FOLIAR

As peculiaridades que distinguem as plantas pertencentes aos diferentes habitats evidenciam-se acentuadamente nas folhas (ESAU, 1974; NAPP-ZINN, 1984/88; CUTTER, 1987).

WETZSTEIN e SOMMER (1982) em seu trabalho com anatomia foliar de *Liquidambar styraciflua* durante a aclimatização, constataram a influência dos fatores ambientais na anatomia foliar.

Apesar da morfologia da cutícula ser resultado do controle genético, a configuração, distribuição e tamanho das estrias epicuticulares podem ser modificadas significativamente pelas condições ambientais (BAKER, 1982). Plantas que crescem em umidade relativa alta têm estrias epicuticulares pouco desenvolvidas (SUTTER e LANGHANS, 1979; BRAINERD, 1981; WETZSTEIN e SOMMER, 1982; SMITH *et al.*, 1986). Estudos mais recentes indicaram que a

estrutura cristalina das estrias epicuticulares em folhas de plantas micropropagadas era significativamente diferente das folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação (FREECE e SUTTER, 1991).

Plantas cultivadas *in vitro* desenvolvem células epidérmicas com paredes anticlinais sinuosas, o que não ocorre em plantas que crescem naturalmente ou em casa de vegetação (WETZSTEIN e SOMMER, 1983). Essas modificações anatômicas, podem ser consequência do confinamento, alta umidade e intensidade luminosa relativamente baixa do ambiente de cultura, e também podem ser comparadas às modificações que ocorrem entre folhas de sol e folhas de sombra (SMITH *et al*, 1986). SOLEREDER (1908) afirma que células epidérmicas com paredes anticlinais curvas ou sinuosas são encontradas especialmente em espécies que crescem em habitat úmido, enquanto que células epidérmicas com paredes anticlinais retas são comuns em espécies que ocupam um habitat seco. MERUVIA (1990) constatou a partir de comparações com folhas de sol e folhas de sombra de *Colubrina glandulosa*, que as paredes anticlinais das células epidérmicas abaxiais das folhas de sol são levemente curvas enquanto que as das folhas de sombra são marcadamente sinuosas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram o de MURASHIGE e SKOOG (1962) preparado segundo VASIL e HILDEBRANDT (1966), referido como meio MS e o de LLOYD e McCOWN (1981), referido como WPM. As composições dessas formulações são listadas na Tabela 1.

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 5,7 com NaOH 1N ou HCl 1N.

Os meios de cultura foram distribuídos em tubos de ensaio com capacidade para 40 ml (20 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento), com 8 ml do meio de isolamento em cada um. Nas demais fases utilizou-se frascos com capacidade para 210 ml (60 mm de diâmetro e 85 mm de comprimento), foram colocados 35 ml de meio por frasco. Os tubos de ensaio foram vedados com papel alumínio, e os frascos, com tampas de polipropileno resistentes a altas temperaturas.

Os meios de cultura foram autoclavados sob pressão de 1,5 atm e temperatura de 120°C, durante 20 minutos.

Tabela 1. Composição do meio de cultura WPM (1981) e MS (1962), preparado segundo VASIL e HILDER RANDT (1966).

Componentes	WPM	MS
	concentrações (mg/l)	
NH_4NO_3	400,000	1650,000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556,000	-
KNO_3	-	1900,000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96,000	440,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,000	370,000
KH_2PO_4	170,000	170,000
K_2SO_4	990,000	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300	22,300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	8,600
H_3BO_3	6,200	6,200
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,250	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	0,250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,850	27,850
Na_2EDTA	37,250	37,250
KI	-	0,830
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	0,025
Tiamina	1,000	0,500
Piridoxina	0,500	0,500
Ác. nicotínico	0,500	0,500
Mio-inositol	100,000	100,000
Glicina	2,000	2,000
Sacarose	30.000,000	30.000,000

4.2 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, sob a intensidade de 2000 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-fria e "Sylvania" GRO-LUX F40/12. Os tubos de ensaio e frascos com as culturas foram mantidos em prateleira a 35 cm de distância das lâmpadas. A temperatura ambiente mantida em $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.3 FONTE DE EXPLANTES

A fonte de explantes utilizada foi um lote de 350 mudas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. com dois anos de idade, procedentes do viveiro de Leão Jr. S.A. no Município de Teixeira Soares-PR. As mudas matrizes foram plantadas em sacos plásticos em casa de vegetação climatizada, modelo Van der Hoeven, instalada no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

As mudas receberam pulverizações semanais com fungicida BENLATE (Benomyl) na concentração de 2 g/l por aplicação durante todo o período de coleta de explantes, no ano de 1990.

4.4 DESINFESTAÇÃO E ISOLAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As brotações coletadas em casa de vegetação foram cortadas e as folhas foram retiradas. As brotações foram então lavadas em água com detergente e enxaguadas.

O agente desinfestante utilizado foi o hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 5, 10 e 15% (5% de cloro livre) com diferentes períodos de exposição às soluções (10 e 15 min). Nas soluções de hipoclorito de sódio foi adicionado o adesivo espalhante Tween 20 na concentração de 0,01%. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a lavagem dos explantes em água deionizada e esterilizada por quatro vezes, permanecendo os explantes imersos em água deionizada e esterilizada até o isolamento.

No isolamento, as brotações foram cortadas em segmentos apicais e medianos com aproximadamente 3 cm, e introduzidos individualmente em tubo de ensaio contendo o meio básico MS. Em seguida, os explantes foram transferidos para a sala de incubação. Esse experimento foi realizado no mês de setembro, foram utilizados 70 explantes por tratamento. Após 4 semanas foram avaliadas as percentagens de sobrevivência, oxidação e contaminação por fungo e bactéria. Através de testes preliminares realizados ao longo de 2 anos, verificou-se ser a primavera o melhor período para o isolamento dos explantes.

4.5 OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Com o objetivo de encontrar um meio eficaz para a obtenção de brotações múltiplas, foram estabelecidos três experimentos diferentes. Os explantes utilizados foram brotações oriundas da fase de isolamento e que apresentavam de 2 a 3 cm de comprimento.

O primeiro experimento consistiu dos seguintes tratamentos: T1= WPM; T2= MS; T3= WPM+2 mg/l de 2iP; T4=

MS+2 mg/l de 2iP; T5= WPM+2 mg/l de Zeatina; T6= MS+2 mg/l de Zeatina; T7= WPM+2 mg/l de BAP; T8= MS+2 mg/l de BAP.

Foram utilizados segmentos apicais, e o número de amostras variou entre 15 e 30 explantes por tratamento. A taxa de brotações múltiplas foi avaliada através da contagem do número de brotações aproveitáveis por explante, após um mês. Foram consideradas aproveitáveis as brotações com medidas de comprimento igual ou superior a 0,5 cm. As avaliações estatísticas da multiplicação foram feitas pelo teste de Comparações múltiplas de Kruskal-Wallis (KW).

No segundo experimento, foram avaliados três subcultivos no mesmo meio de cultura. Os explantes utilizados foram segmentos sub-apicais. O número de amostras variou entre 15 e 40 explantes por tratamento. Os tratamentos empregados foram: T1= WPM+2 mg/l de BAP; T2= MS+2 mg/l de BAP; T3= WPM+2 mg/l de BAP+0,20 mg/l de AIB; T4= MS+2 mg/l de BAP+0,05 mg/l de AIB; T5= WPM+2 mg/l de BAP+0,20 mg/l de AIB; T6= MS+2 mg/l de BAP+0,20 mg/l de AIB; T7= WPM+2 mg/l de BAP+0,30 mg/l de AIB; T8= MS+2 mg/l de BAP+0,30 mg/l de AIB.

As culturas foram avaliadas após 30, 60 e 90 dias de incubação com relação ao número de brotações múltiplas e aproveitáveis por explante. As taxas de multiplicação foram avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis (KW) e análise de regressão.

Testes preliminares demonstraram um melhor aspecto e desenvolvimento das brotações nos meios de cultura na presença de carvão ativado. Após o terceiro subcultivo em meio de multiplicação com BAP, uma grande percentagem de

brotações apresentavam-se atípicas. Devido a esses resultados, foi realizado o terceiro experimento, empregando-se baixas dosagens do regulador de crescimento BAP e a utilização do carvão ativado, visando-se a obtenção de brotações múltiplas e com um bom desenvolvimento.

O número de amostras variou entre 25 e 40 explantes por tratamento. Os tratamentos foram os seguintes: T1= WPM+0,5 mg/l de BAP; T2= MS+0,5 mg/l de BAP; T3=WPM+0,5 mg/l de BAP+1 g/l de carvão ativado; T4= MS+0,5 mg/l de BAP+1 g/l de carvão ativado; T5= WPM+1 mg/l de BAP; T6= MS+1 mg/l de BAP; T7= WPM+1 mg/l de BAP+1 g/l de carvão ativado; T8= MS+1 mg/l de BAP+1,0 g/l de carvão ativado.

Foram utilizados segmentos axilares e as culturas foram avaliadas após 30, 60 e 90 dias de incubação no mesmo meio de cultura, com relação ao número de brotações múltiplas e aproveitáveis por explante. As taxas de multiplicação foram avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis (KW).

4.6 ENRAIZAMENTO E TRANSPLANTE DAS MUDAS

As brotações utilizadas como explantes nessa fase apresentavam comprimento variável entre 2 e 3 cm, foram obtidas da fase de multiplicação. As brotações tiveram as extremidades cortadas em forma de cunha.

Testes preliminares, utilizando-se os meios MS e WPM com variações nas concentrações dos sais minerais, demonstraram que WPM/2 proporcionou maior percentagem de enraizamento. Em função desses resultados, esse experimento foi realizado utilizando-se o meio WPM/2, variando-se as

concentrações de AIB (0,3,4 e 5 mg/l) e ao final de 30 dias foi avaliado o enraizamento. Nesse experimento, também foi realizado o enraizamento em duas fases, que consistiu de dois meios de cultura, ambos WPM/2. Na primeira fase (meio de indução) foi adicionado 0,3,4 e 5 mg/l de AIB e no segundo (meio de desenvolvimento), foi acrescentado ao meio básico 1 g/l de carvão ativado. As brotações foram mantidas em meio de indução durante 12 dias e depois transferidas, para o meio de desenvolvimento por um período de 18 dias.

Em cada tratamento empregaram-se 30 explantes. As avaliações estatísticas das percentagens do enraizamento foram feitas pelo Teste de Kruskal-Wallis (KW) e Análise de variância com estudo de regressão por meio de polinômios ortogonais. Foram ainda avaliados o número médio de raízes por explante.

As brotações foram retiradas dos frascos de meio de enraizamento, após 30 dias; as raízes foram lavadas com água e cortadas, quando ultrapassavam 1 cm de comprimento. Algumas folhas também foram cortadas.

O transplante foi feito em bandejas de semeadura com terra, e as mudas foram irrigadas diariamente, até 4 vezes, durante os 7 primeiros dias. Esse procedimento foi realizado em casa de vegetação modelo Van der Hoeven.

4.7 DESCRIÇÃO COMPARATIVA DA SUPERFÍCIE FOLIAR

Observações realizadas durante a fase de multiplicação (presença de folhas atípicas) levaram a uma descrição comparativa da superfície foliar.

O material botânico utilizado para a descrição comparativa da superfície foliar de *Ilex paraguariensis* St. Hil. foi baseado em amostras de plantas cultivadas em casa de vegetação, amostras de plantas cultivadas in vitro normais e ainda amostras de plantas cultivadas in vitro mas, que se apresentavam atípicas (folhas não desenvolvidas, espessas e quebradiças).

O estudo foi realizado a partir de folhas adultas, provenientes do quarto nó, contando do ápice em direção à base. As amostras foram fixadas em Farmer-Carnoy modificado BERLYN-MIKSCHE (1976), ou seja, em solução de álcool etílico 3:1 ácido acético glacial, durante 24 horas, seguida de 3 trocas em álcool absoluto a cada 2 horas.

O material foi então desidratado via ponto crítico de CO₂ no equipamento Balzers CFD-010, a seguir, o material foi montado em suporte metálico e submetido à metalização em equipamento Balzers Sputtering SCD-030. As amostras foram examinadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura SEM 505 Philips. Todas essas etapas foram realizadas com equipamentos pertencentes ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

A descrição do material a nível de microscopia óptica foi realizada a partir de cortes paradérmicos, diafanizados em hipoclorito de sódio 20%, lavados, em seguida corados com vermelho congo. A montagem de lâminas semipermanentes foi feita em glicerina 50% entre lâmina e laminula e vedados com esmalte sintético incolor. Os desenhos foram executados em microscópio fotônico Olympus CBD com auxílio

de câmara clara. As escalas foram projetadas nas mesmas condições em que foram realizados os desenhos.

Para a classificação dos estômatos adotou-se a terminologia de METCALFE e CHALK (1950).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Contaminação

A imersão dos explantes durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 15%, foi o tratamento mais efetivo, resultando em uma percentagem de contaminação que foi de 14,2 para bactérias e 5,7% para fungos. Esses resultados são similares aos verificados para o período de exposição de 10 minutos com a mesma concentração de hipoclorito de sódio (Tabela 2).

Na mesma tabela pode-se também observar, uma tendência de maior contaminação dos explantes para os menores períodos de exposição ao hipoclorito de sódio. Os tratamentos com 10 e 15% de hipoclorito de sódio durante 5 minutos de exposição resultaram nas maiores percentagens de contaminação comparativamente aos períodos de 10 e 15 minutos.

Ainda de acordo com a tabela 2 é possível verificar que, em todos os tratamentos a contaminação por bactérias foi maior com relação à contaminação fúngica, isso poderia ser atribuído ao uso do fungicida BENLATE (benomyl) durante todo o período que antecedeu ao isolamento. HALDEMAN *et al.* (1987) também reduziram a taxa de contaminação fúngica em *Camellia sinensis* e *Camellia japonica* usando benomyl.

Testes preliminares realizados ao longo do ano, demonstraram variações muito grandes das taxas de contaminação em função da época do ano. Vários experimentos efetuados durante o inverno resultaram em até 100% de contaminação. Os melhores resultados foram obtidos durante a primavera que é a fase ativa de crescimento da planta, reduzindo dessa forma o tempo de contato aos agentes contaminantes. A primavera como melhor período para o isolamento de espécies lenhosas é também confirmada por SNIR e EREZ (1980), CHALUPA (1981) e McCOWN e McCOWN (1987).

TABELA 1. Efeito da concentração de hipoclorito de sódio e período de exposição na desinfestação de explantes nodais de *Ilex paraguariensis* St. Hil., durante o mês de setembro.

Tratamentos	NaClO	período de exposição (min.)	contaminação		oxidação (%)	sobrevivência (%)
	(%)		bactéria	fungo		
			(%)			
1	10	5	40	11,4	1,4	47,2
2	10	10	24,2	7,1	2,8	65,9
3	10	15	17,1	7,1	7,1	68,7
4	15	5	35,7	10	1,4	52,9
5	15	10	15,7	5,7	5,7	72,9
6	15	15	14,2	5,7	11,4	68,7

5.1.2 Oxidação

A imersão dos explantes durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 15% provocou a maior percentagem de oxidação (11,4%). As menores taxas de oxidação (1,4%) foram obtidas com os tratamentos 1 e 4, onde o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio foi menor, ou seja, 5 minutos.

Após a desinfestação, os explantes foram imersos em água deionizada e esterilizada e foram introduzidos em tubo de ensaio rapidamente após serem cortados, reduzindo dessa forma o tempo de contato com o ar. Essas foram medidas que certamente reduziram os percentuais de oxidação nesse trabalho.

Esses resultados são distintos daqueles obtidos por REY e MOGRINSKI (1988) que verificaram uma alta percentagem de oxidação (40%) em explantes dessa espécie, oriundos também de mudas de 2 anos de idade, que foram desinfestados em uma solução de etanol 70% durante 1 minuto e posteriormente em uma solução comercial de água de lavandina (2% de NaOCl) durante 25 minutos. Em testes preliminares, observou-se um aumento das taxas de oxidação dos explantes quando se utilizava concentrações de hipoclorito de sódio além de 15%, e também, quando o período de exposição ao agente desinfestante era maior que 15 minutos. Isso pode ser explicado pelo fato de que o agente desinfestante pode danificar os tecidos do explante, provocar a oxidação e morte do mesmo. A utilização de etanol 70% durante 1 minuto como um pré-tratamento para a

desinfestação , também, aumentou as taxas de oxidação e não diminuiu a contaminação.

As menores taxas de oxidação estão associadas às maiores taxas de contaminação. Isso pode ser atribuído à utilização de concentrações mais baixas de hipoclorito de sódio ou aos menores períodos de permanência na solução desinfestante. Esses tratamentos não causaram injúrias aos tecidos, no entanto, foram ineficazes para a desinfestação.

5.1.3 Sobrevivência

Os melhores resultados quanto a sobrevivência dos explantes, foram apresentados pelos tratamentos que utilizaram 10 ou 15% de hipoclorito de sódio durante os maiores períodos de exposição (10 e 15 minutos), com valores percentuais muito próximos (72,9 e 68,7%) conforme a Tabela 2.

O tratamento menos eficaz foi o qual utilizou hipoclorito de sódio a 10% durante 5 minutos, onde obteve-se uma taxa de sobrevivência de 47,2%. As taxas de sobrevivência estão diretamente relacionadas às taxas de contaminação, visto que os explantes contaminados foram considerados como explantes inadequados para as demais etapas *in vitro*. A oxidação dos explantes não teve grande influência nas taxas de sobrevivência devido aos baixos índices de oxidação.

Figura 1 Segmento segmento nodal de *Ilex paraguariensis* St. Hil., após 20 dias em meio de isolamento.



5.2 OBTENÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

5.2.1 Experimento 1

A adição de citocinina no meio de cultura foi fundamental à indução de brotações múltiplas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. cultivadas *in vitro*. Observa-se na Tabela 3 que na ausência dessa classe de reguladores de crescimento não ocorreu a formação de novas brotações.

A análise dos resultados obtidos com a adição de 2mg/l dos reguladores de crescimento BAP, Zeatina e 2iP após o primeiro mês de cultivo, revelou que a adição de BAP mostrou-se mais eficiente na indução de brotações do que as outras citocininas testadas. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por HASEGAWA, 1980; CHALUPA, 1987 e WEBB e VILLALOBOS, 1987, com várias espécies lenhosas, onde esse regulador de crescimento induziu melhores resultados na multiplicação comparativamente a outros reguladores. No entanto, REY e MOGRINSKI (1988) não confirmam estes resultados para *Ilex paraguariensis* St. Hil., com maior percentagem (46%) de ápices que formaram brotações na presença de 3 mg/l de 2iP+0,01 mg/l de AIA, enquanto que na presença de 3 mg/l de BAP+0,01 mg/l de AIA a percentagem foi de 20%. Esses resultados distintos encontrados para a mesma espécie, podem ser atribuídos à utilização de concentrações diferentes dessas duas citocininas e à adição de auxina. Além disso, existe a relação entre as concentrações endógenas de reguladores de crescimento na planta com as concentrações de reguladores no meio de

cultura, e que essa relação pode interferir no resultado final (DODDS e ROBERTS, 1982). Algumas respostas morfogênicas podem ser causadas pela combinação de dois ou mais reguladores em certas concentrações, e que outras concentrações dos mesmos reguladores podem não ter o mesmo efeito ou ter um efeito, qualitativamente diferente (MINOCHA, 1987).

A utilização de 2 mg/l de BAP resultou em um número médio de brotações no meio MS de 2,43 e no meio WPM o número médio de brotações foi de 2,28, sendo que a diferença não foi significativa para os meios MS e WPM (Teste de KW, $H=0,92$). Esses resultados concordam com SOMMER e WETZSTEIN (1987), que afirmam que a taxa de multiplicação nos primeiros subcultivos é baixa.

TABELA 3. Multiplicação de brotações de *Ilex paraguariensis* St. Hil., submetidas a variações de reguladores de crescimento e meio de cultura, após um mês.

Reguladores de crescimento (2mg/l)	Meios de cultura	
	WPM	MS
Ausência de reguladores	0,00 a (30)	0,00 a (30)
ZiP	1,40 b (25)	1,86 b (15)
Zeatina	1,52 b (25)	1,73 b (15)
BAP	2,28 c (25)	2,43 c (30)
Media	1,2381	1,4111
Desvio Padrão	1,0333	1,2076
H	76,6649 **	67,8203 **
Tamanho da amostra	105	90

0 valor entre parênteses corresponde ao número de explantes avaliado;

Letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo Teste de Comparações Múltiplas de KW;

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pela prova de KW.

5.2.2 Experimento 2

No segundo experimento, utilizou-se os meios MS e WPM acrescidos de 2 mg/l de BAP e AIB nas concentrações de 0,00; 0,05; 0,20 e 0,3 mg/l, durante 3 subcultivos.

O tratamento que propiciou a maior taxa de brotações múltiplas de erva-mate foi o que combinou o uso de 2 mg/l de BAP no meio WPM e no terceiro subcultivo, com média de 3,75 brotações multiplicadas por explante (Tabela 4).

Não houve diferença significativa na obtenção de brotações múltiplas para os meios de cultura MS e WPM (Teste KW, $H=1,33$).

Os meios de cultura utilizados para a obtenção de brotações múltiplas podem conter baixas dosagens de auxina, a qual pode estimular o crescimento (CHALUFA, 1987). As concentrações de AIB adicionadas, mostraram efeitos diferentes para os meios MS e WPM. Há um decréscimo linear do número de brotações para o meio WPM ($F=9,16$) à medida que se aumentou as concentrações de AIB. Enquanto que, no meio MS observou-se uma tendência de aumento no número de brotações com o aumento das concentrações de AIB ($F=12,17$). Esse resultado inverso entre os meios MS e WPM pode ser atribuído à composição diferente desses meios de cultura. O meio WPM é uma formulação mais diluída quando comparada à do meio MS, sendo que uma das principais diferenças entre elas diz respeito aos teores de nitrogênio. McCOWN e SELLNER (1987) afirmam que o efeito dos reguladores de crescimento pode ser modificado em função do meio de cultura utilizado. DODDS e ROBERTS (1982) também afirmam

que a interação entre uma auxina e uma citocinina adicionada ao meio de cultura é complexa e que fatores nutricionais podem interferir no resultado final. WEBB e VILLALOBOS (1987) consideram o uso de baixas dosagens de auxina associada a uma citocinina sem qualquer efeito sobre a multiplicação.

O número de brotações tendeu a aumentar em função do subcultivo ($F=38,40$ e $F=17,06$) respectivamente para os meios WPM e MS. O efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, pois diversas vezes constata-se um efeito residual de uma subcultura para outra, aumentando assim as taxas de multiplicação (Figura 2). Foi observado que ao se subcultivar brotações de erva-mate durante três meses consecutivos, em meio de cultura acrescido de 3 mg/l de BAP, as brotações adquiriram coloração clara e grande percentagem destas com folhas atípicas (folhas espessas, encurvadas, quebradiças e que não se desenvolveram). WIECHETECK (1990) verificou em *Eucalyptus viminalis* resultados semelhantes. FONNESBECH (1974) também observou folhas malformadas em *Begonia* quando se aumentava as concentrações de citocininas.

As folhas consideradas atípicas podem ser folhas vitrificadas, embora não apresentem um aspecto vítreo ou translúcido. A presença de folhas espessas, encurvadas e quebradiças são características encontradas também em plantas vitrificadas (KEVERS et al., 1984; VIEITZ et al., 1985; PASQUALETTO et al., 1986; GASPAR et al., 1987; BOTTCHEER et al., 1988). Os sintomas de vitrificação não são idênticos em todas as plantas (GASPAR et al., 1987).

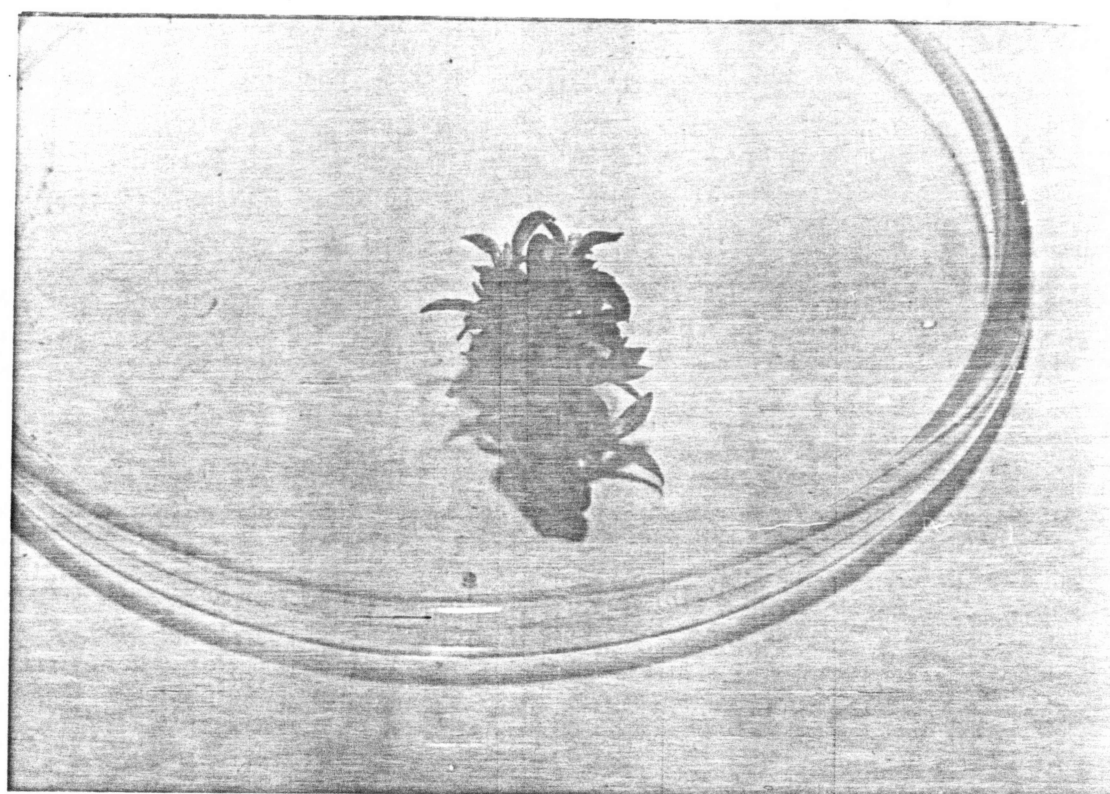
Além disso, entre as possíveis causas de vitrificação está a utilização de reguladores de crescimento. GASPAR *et al.* (1987) afirma que a citocinina BAP, parece ser o fator essencial na indução da vitrificação em macieira M26.

TABELA 4. Número médio de brotações de *Ilex paraguariensis* St. Hil., cultivadas in vitro nos meios WPM e MS, acrescido de 2 mg/l de BAP e submetidos às variações nas concentrações de AIB, em 3 subcultivos.

Subcultivo \ AIB	W P M				M S			
	0,00	0,05	0,20	0,30	0,00	0,05	0,20	0,30
1	2,77 (35)	2,73 (30)	2,52 (36)	2,45 (40)	2,43 (39)	2,50 (20)	2,66 (30)	2,71 (35)
2	3,21 (32)	3,20 (29)	2,93 (32)	2,89 (30)	2,85 (34)	2,75 (16)	3,20 (24)	3,25 (31)
3	3,75 (28)	3,70 (27)	3,25 (31)	3,17 (35)	2,81 (32)	2,86 (15)	3,29 (24)	3,35 (31)
Média	3,2105	3,1977	2,8889	2,8230	2,6857	2,6063	3,0256	3,0928
Desvio Padrão	1,2956	1,2539	1,0680	0,9280	0,9640	0,9485	1,0565	0,9138
Tamanho amostra	95	86	99	113	105	51	78	97

Os valores entre parênteses correspondem ao número de explantes avaliados.

Figura 2 Brotção da 6ª subcultura de *Ilex paraguariensis* St. Hil. após permanência de um mês no meio de multiplicação WPM, contendo 2,0 mg/l de BAP.



5.2.3 Experimento 3

No terceiro experimento, empregou-se baixas dosagens de BAP (0,5 e 1,0 mg/l) e carvão ativado (0,0 e 1,0 g/l) nos meios MS e WPM, durante três subcultivos.

O tratamento que proporcionou o maior número de brotações multiplicadas foi o que combinou a utilização de 1 mg/l de BAP no meio WPM e na ausência de carvão ativado, com um número médio de brotações de 2,33 por explante no terceiro subcultivo (Tabela 5). Os tratamentos nos quais se utilizou o meio de cultura MS com BAP nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/l e carvão ativado não apresentaram multiplicação.

Houve diferença significativa entre os meios de cultura MS e WPM, pelo Teste de Kruskal-Wallis efetuado, sendo superior a taxa de brotações múltiplas no meio WPM. Houve também diferença significativa para as concentrações de BAP e presença ou ausência de carvão ativado. A concentração de 1mg/l de BAP na ausência de carvão ativado proporcionou a melhor taxa de brotações múltiplas. Isso pode ser atribuído ao fato de que o carvão ativado tem a capacidade de adsorver os componentes do meio de cultura, inclusive o regulador BAP. As diferenças constatadas com os subcultivos não foram significativas, provavelmente isso ocorreu devido a utilização de baixas concentrações de BAP.

Embora esses tratamentos não tenham proporcionado altas taxas de multiplicação, concentrações mais baixas de BAP e presença de carvão ativado proporcionaram um bom aspecto das brotações, com folhas bem desenvolvidas e

coloração verde-escura típica da espécie. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por WIECHETECK (1990) com *Eucaliptus viminalis*. Na presença de carvão ativado as brotações dessa espécie apresentavam-se alongadas e bem desenvolvidas. THORPE e PATEL (1984); KRIKORIAN e KANN (1987); SOMMER e WETZSTEIN (1987) também afirmam ser benéfica a adição de carvão ativado no meio de cultura durante a multiplicação. O carvão ativado tem capacidade de reter concentrações excessivas de reguladores e compostos tóxicos que inibem a morfogênese (FRIDBORG et al., 1978). Portanto, pode ser benéfico para brotações que permaneceram por longos períodos em meio de multiplicação.

O bom desenvolvimento das brotações é importante na medida que proporcionará um enraizamento melhor e posterior transplante da muda. SOMMER e WETZSTEIN (1987) verificaram com *Liquidambar styraciflua* que brotações que permaneceram na forma de rosetas não enraizaram.

TABELA 5. Efeito do meio de cultura, concentração de BAP, subcultivo e presença de carvão ativado sobre o número médio de brotações de *Ilex paraguariensis* St. Hil. cultivadas in vitro.

Carvão ativado(g/l)	M P M				M S			
	0		1		0		1	
Subcultivo \ BAP(mg/l)	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
1	1,20 (25)	1,73 (30)	1,16 (25)	1,17 (30)	1,10 (40)	1,37 (30)	1,00 (30)	1,00 (30)
2	1,40 (25)	2,20 (30)	1,16 (25)	1,17 (30)	1,15 (40)	1,33 (30)	1,00 (30)	1,00 (30)
3	1,40 (25)	2,33 (30)	1,16 (25)	1,17 (30)	1,15 (40)	1,40 (30)	1,00 (30)	1,00 (30)
Média	1,36	2,09	1,16	1,17	1,13	1,37	1,00	1,00
Desvio Padrão	0,54	1,40	0,37	0,37	0,45	0,66	0,00	0,00
Tamanho amostra	75	90	75	90	120	90	90	90

Os valores entre parênteses correspondem ao número médio de explantes avaliados.

5.3 ENRAIZAMENTO E TRANSPLANTE DE MUDAS

Na tabela 6, pode-se verificar que o melhor resultado para o enraizamento de brotações de erva-mate foi obtido em duas fases: indução e desenvolvimento das raízes (12 + 18 dias de exposição). As raízes foram induzidas em um meio de cultura na presença de auxina e, posteriormente, o alongamento das raízes se deu em um meio sem auxina. Nesse tratamento, a concentração de 3 mg/l de AIB induziu a formação de raízes no meio WPM/2 em 86,2% das brotações. As concentrações de AIB diferiram estatisticamente entre si, sendo as mais baixas percentagens de enraizamento (66,66 e 63,33%) foram observadas com as concentrações de 4 e 5 mg/l respectivamente. A adição de AIB no meio de cultura foi essencial ao enraizamento, porém, concentrações mais elevadas do que 3,0 mg/l reduziram as taxas de enraizamento. GRAÇA *et al.* (1988) também verificou em estacas de erva-mate, que uma concentração excessiva de AIB (10.000 ppm) pode ser tóxica para a iniciação e desenvolvimento do sistema radical dessas estacas.

TABELA 5. Enraizamento in vitro de brotações de *Ilex paraguariensis* St. Hil. que permaneceu 30 dias em meio indutor e brotações que passaram por 12 dias em meio indutor e depois transferidas para meio de desenvolvimento das raízes.

AIB(mg/l)	PERÍODO DE EXPOSIÇÃO (dias)			
	30		12+18	
	ENRAIZAMENTO (%)	Nº MÉDIO DE RAÍZES/EXPLANTE	ENRAIZAMENTO (%)	Nº MÉDIO DE RAÍZES/EXPLANTE
0	0	0	0	0
3	20	1,66	86,20	8,20
4	15,38	2	66,66	6,35
5	11,53	2	63,33	9,74

A permanência das brotações em meio de indução acrescido de AIB por 12 dias e posterior transferência das brotações para meio WPM/2 + 1 g/l de carvão ativado, induziu um aumento significativo na taxa de enraizamento quando comparadas com as brotações mantidas em meio com AIB por 30 dias (Teste de KW, $P < 0,01$), como pode ser observado nas Figuras 3A e 3B. Isto pode ser explicado pelo fato da primeira fase ser dependente de auxina, e o crescimento e alongamento das raízes ser inibido pela mesma (BONNER e GALSTON, 1973; JAMES e THURBON, 1979). Esses resultados confirmam os obtidos por LANE, 1978; CHALUPA, 1987; RIBAS, 1991 que obtiveram maiores taxas de enraizamento quando o mesmo foi realizado em duas fases. REY e MOGRINSKI (1988) trabalhando com erva-mate verificaram uma taxa média de enraizamento de 50%. Neste caso, a indução da iniciação radical ocorreu como resposta ao tratamento com 100 mg/l de AIB durante 4 horas com posterior transferência para meio MS/4.

Em testes preliminares, o procedimento empregado por REY e MOGRINSKI (1988) para o enraizamento de erva-mate foi repetido e rejeitado por não induzir a rizogênese.

As concentrações de AIB utilizadas durante 30 dias de exposição, não foram significativas para a indução do enraizamento. Para as brotações que permaneceram 12 dias em meio de indução e mais 18 dias em meio de desenvolvimento das raízes, o aumento das concentrações de AIB diminuiu o enraizamento. Entretanto, como o desvio de regressão foi significativo, isto significa que o modelo não foi adequado para representar os dados (Tabelas 1A, 1B e 1C-ANEXOS).

Os melhores resultados quanto ao número médio de raízes por explante, também foram obtidos em meio de enraizamento em duas fases (12+18 dias) acrescido de 3, 4 e 5 mg/l de AIB, como pode ser observado na Tabela 6. Brotações com maior número de raízes, certamente terão melhor sobrevivência após o transplante quando comparadas às brotações com poucas raízes.

Após 30 dias, as brotações enraizadas foram transplantadas para bandejas de semeadura com terra e regadas diariamente, até 4 vezes, durante os sete primeiros dias. Após três meses foram transplantadas para sacos plásticos com terra e tiveram um bom desenvolvimento (Figuras 4 e 5).

Figura 3A Enraizamento in vitro das brotações de *Ilex paraguariensis* St. Hil., após 30 dias em meio de enraizamento WPM/2, contendo 5 mg/l de AIB.

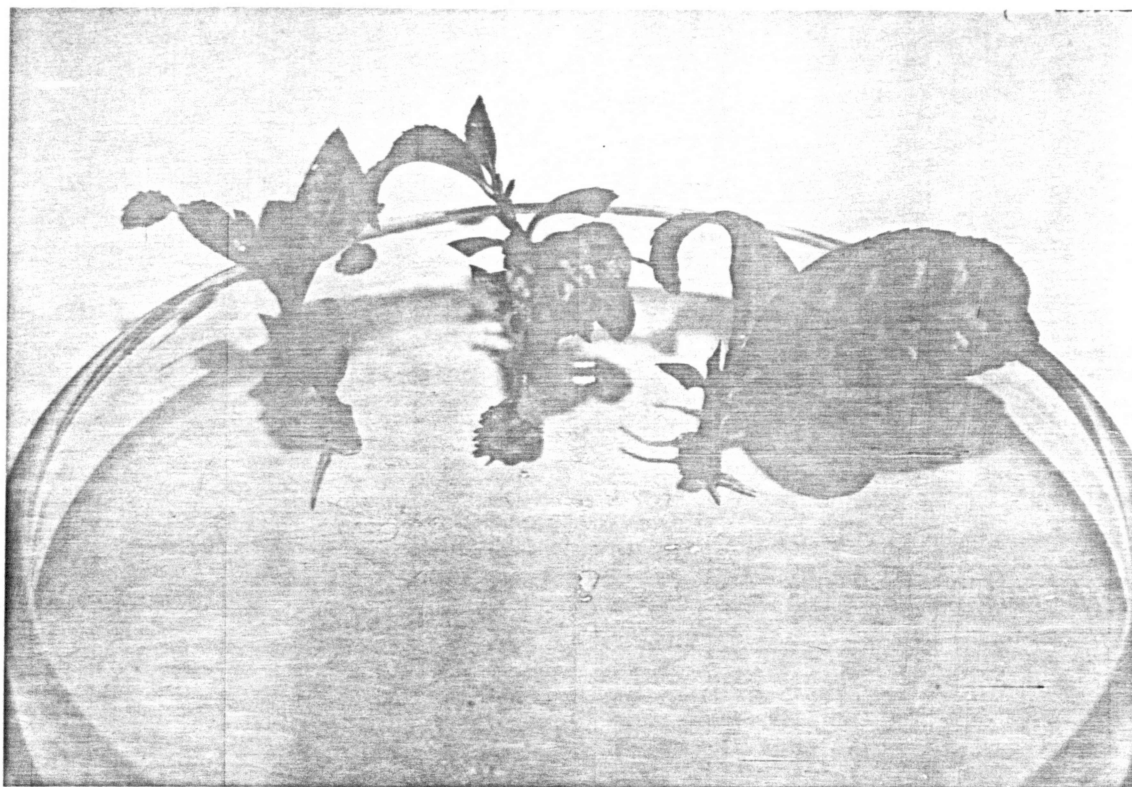


Figura 3B Enraizamento in vitro das brotações de *Ilex paraguariensis* St. Hil., após 12 dias de permanência no meio de indução WPM/2, contendo 5 mg/l de AIB e posterior transferência para meio de desenvolvimento das raízes, contendo 1 g/l de carvão ativado, durante 18 dias.

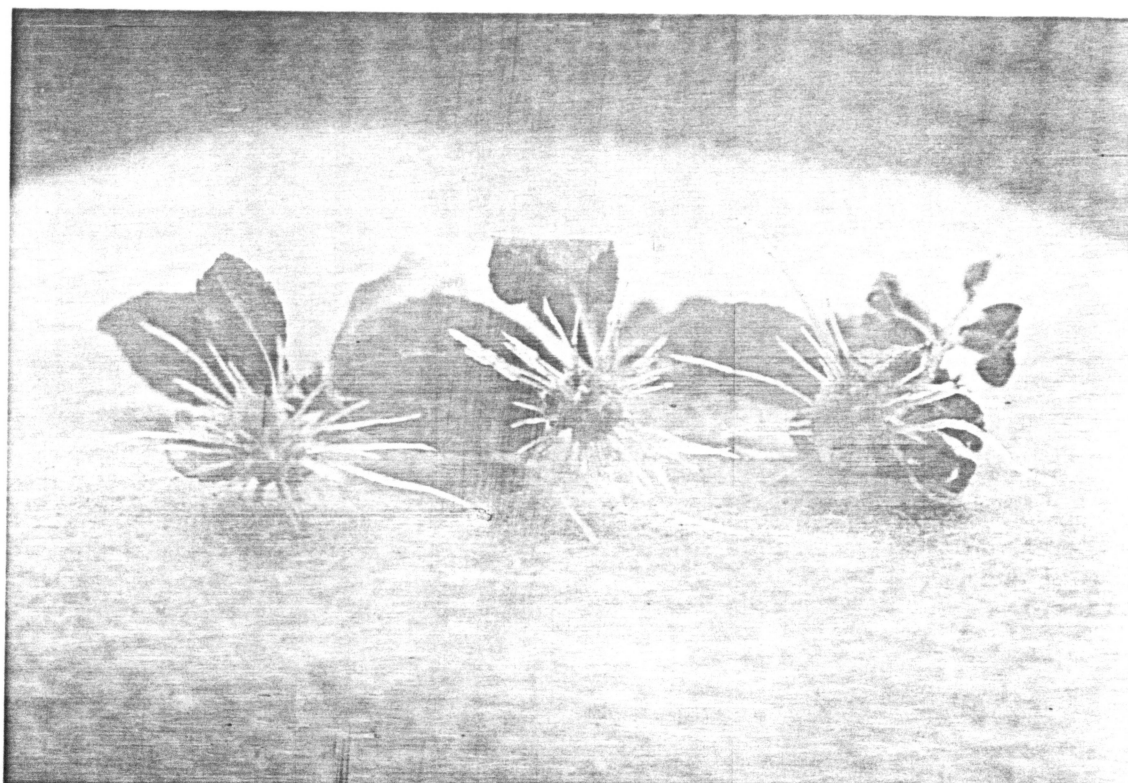


Figura 4 Sobrevivência de mudas de *Ilex paraguariensis* St. Hil., regeneradas in vitro e mmantidas em casa de vegetação, após 2 meses.



Figura 5 Sobrevivência de mudas de *Ilex paraguariensis* St. Hil., regeneradas *in vitro* e mantidas em casa de vegetação, após 6 meses.



5.4 DESCRIÇÃO COMPARATIVA DA SUPERFÍCIE FOLIAR

A descrição com auxílio de microscopia de varredura e microscopia fotônica revelou diferenças acentuadas ao nível de células epidérmicas, tanto na face adaxial quanto abaxial da folha, nos 3 casos citados.

A face abaxial das folhas revelou a presença de estômatos dos tipos anisocítico e/ou anomocítico, que podem se dispor no mesmo nível das células epidérmicas ou acima destas (Figuras 16 a 18 e 6,8 e 10).

5.4.1 Folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação

A parede das células epidérmicas da face adaxial apresentou-se levemente sinuosas nas folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação (Figura 13).

A presença de estrias epicuticulares foi muito acentuada, com disposição irregular das mesmas nas faces abaxial e adaxial (Figuras 6 e 7).

Pontuações de parede foram observadas nas epidermes abaxial e adaxial (Figuras 13 e 16). Tricomas, do tipo tector, foram evidenciados apenas na nervura principal, na face abaxial (Figura 12). A presença de tricomas contraria a descrição da espécie realizada por REITZ (1967), que coloca a espécie como sendo inteiramente glabra. A presença de tricomas é uma característica de plantas que crescem em habitat seco (FAHN, 1990).

5.4.2 Folhas de plantas cultivadas in vitro

Na parede das células epidérmicas de plantas cultivadas in vitro a sinuosidade é muito acentuada (Figuras 14 e 17). Comparações entre plantas de *Liquidambar styraciflua* cultivadas in vitro e em casa de vegetação revelaram os mesmos resultados (WETZSTEIN e SOMMER, 1983). Resultados similares também foram obtidos a partir de comparações entre folhas de sol e folhas de sombra de *Colubrina glandulosa* por MERUVIA (1990). SOLEREDER (1908) afirma que células epidérmicas com paredes anticlinais curvas são encontradas em espécies que crescem em habitat úmido. A umidade relativa é alta nos frascos de cultivo, assim, a sinuosidade de parede das células epidérmicas é justificada.

A epiderme da face adaxial apresenta menor incidência de estrias epicuticulares, em relação a epiderme da face adaxial da folha da planta cultivada em casa de vegetação. As estrias epicuticulares se dispuseram em um único sentido (Figura 9). Na epiderme abaxial, as estrias se restringem às células estomáticas (Figura 8). Plantas que crescem em ambientes onde a umidade relativa é alta, têm menor desenvolvimento de estrias epicuticulares (SUTTER e LANGHANS, 1976; BRAINERD, 1981; WETZSTEIN e SOMMER, 1982).

5.4.3 Folhas atípicas de plantas cultivadas in vitro

As folhas atípicas apresentam as paredes anticlinais das células epidérmicas levemente sinuosas (Figuras 15 e 16).

Na epiderme da face adaxial, a incidência de estrias epicuticulares foi mínima, apenas se restringindo ao nível de conexão entre células contíguas (Figura 11). Na epiderme da face abaxial, não se evidencia a presença de estrias (Figura 10).

A folha atípica cultivada *in vitro* não apresentou características da folha de uma planta normal cultivada *in vitro*. Provavelmente, essa folha atípica é a folha de uma planta vitrificada, mesmo não apresentando o aspecto vítreo. Segundo GASPAR *et al.* (1987) as folhas de plantas vitrificadas apresentam menor incidência de estrias epicuticulares e essas não são contínuas. Essa característica também foi encontrada nas folhas atípicas. Uma das possíveis causas de vitrificação está na presença de BAP no meio de cultura, e folhas espessas, quebradiças e enrugadas são também encontradas em plantas vitrificadas.

Figura 6 Epiderme da face abaxial da folha da planta cultivada em casa de vegetação. 1620x.

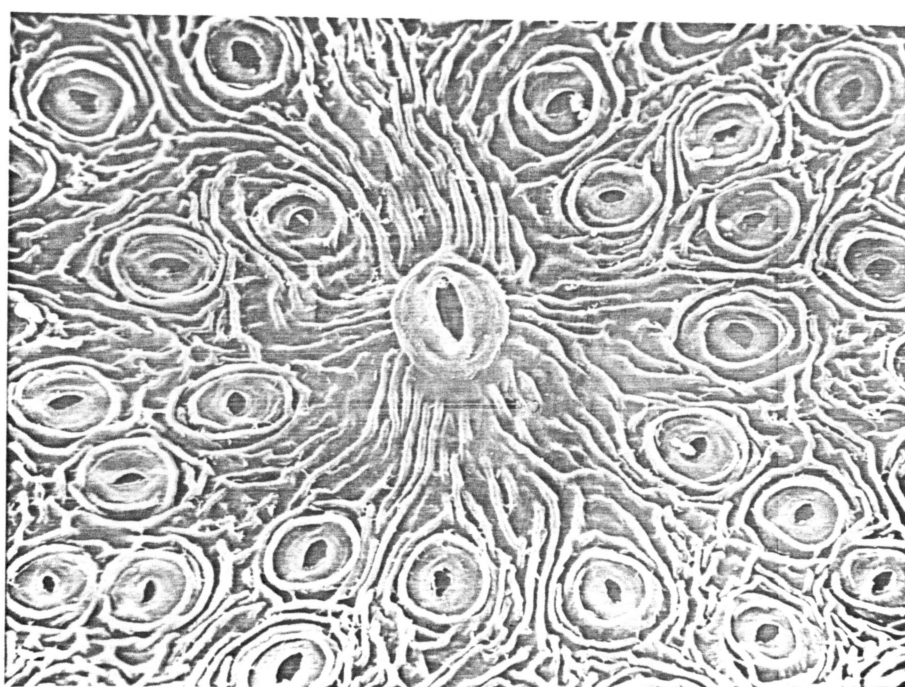


Figura 7 Epiderme da face adaxial da folha de planta cultivada em casa de vegetação. 1620x.

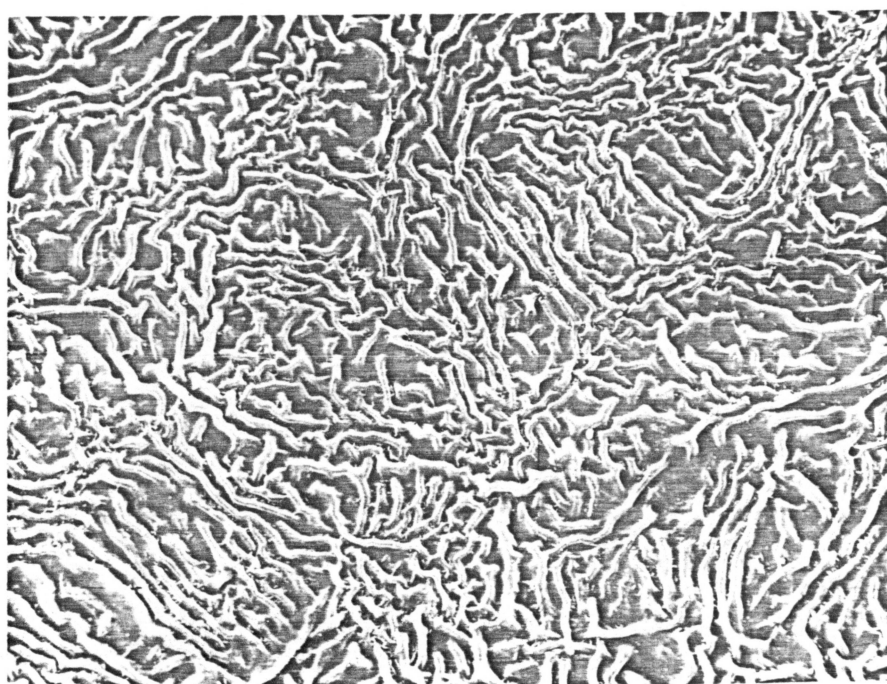


Figura 8 Epiderme da face abaxial da folha da planta cultivada in vitro. 1620x.

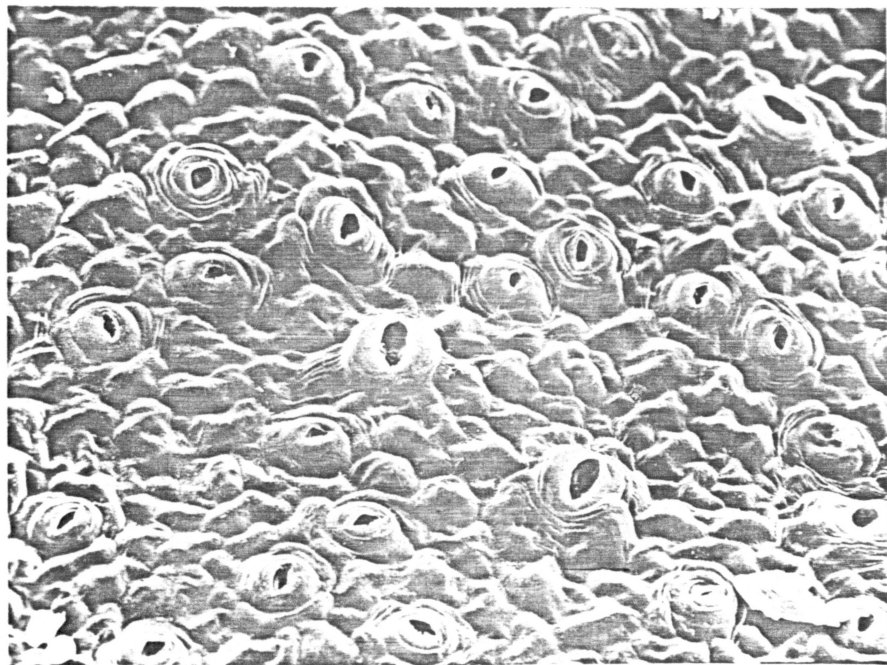


Figura 9 Epiderme da face adaxial da folha de planta cultivada in vitro. 1620x.

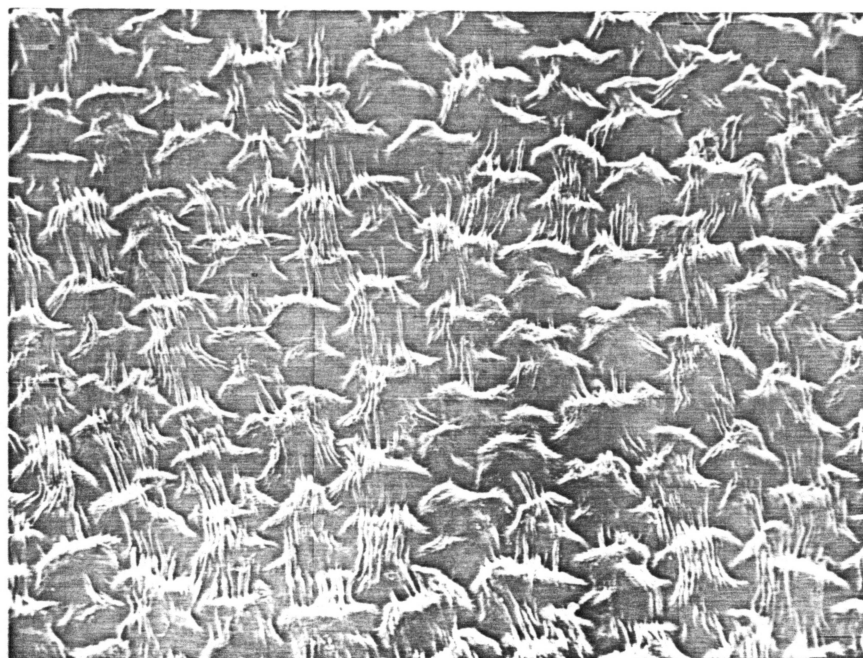


Figura 10 Epiderme da face abaxial da folha da planta cultivada in vitro atípica. 1963x.

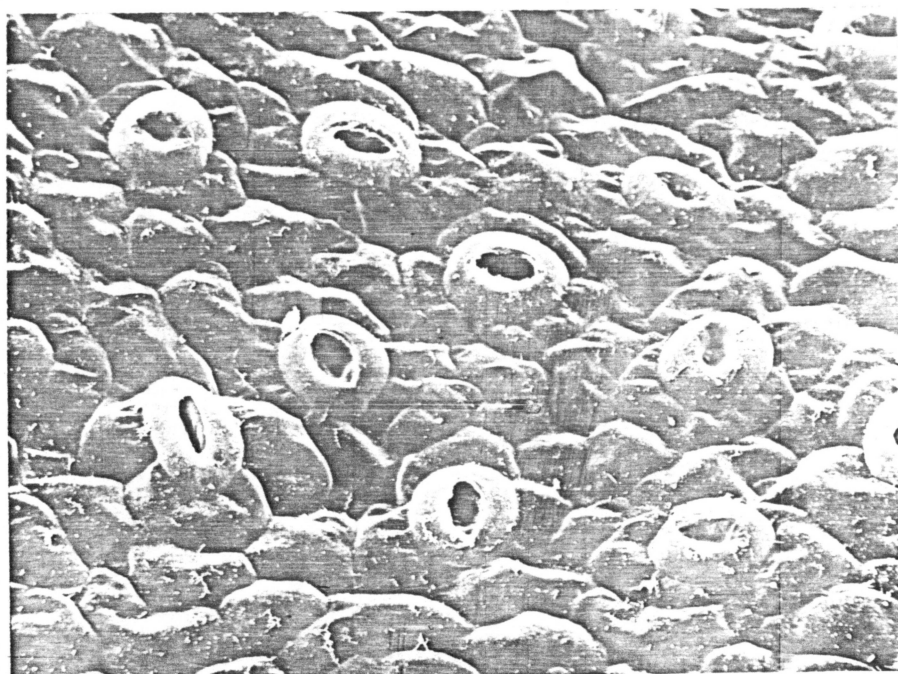


Figura 11 Epiderme da face adaxial da folha da planta cultivada in vitro atípica. 1620x.

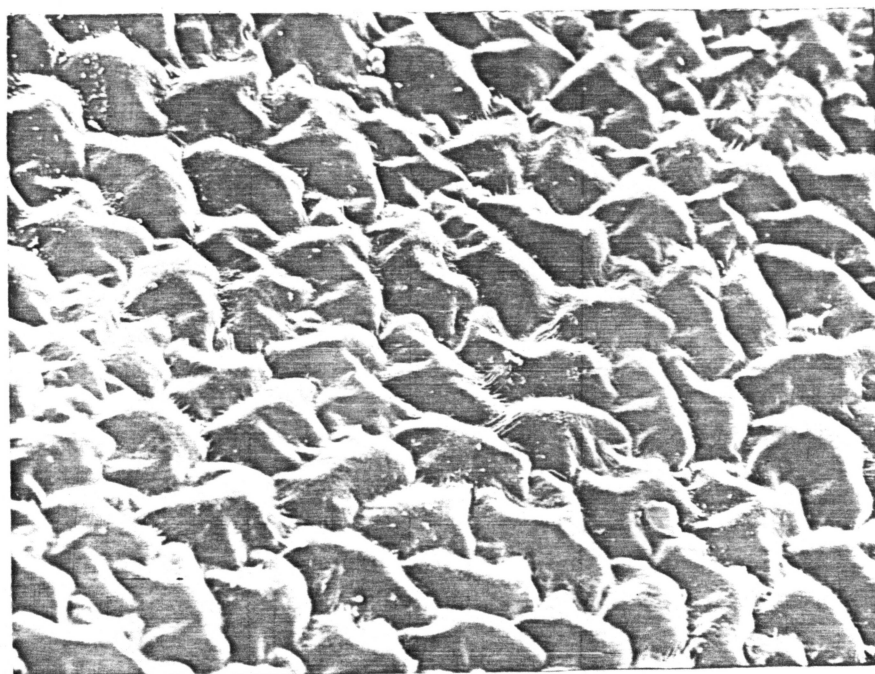


Figura 12 Tricoma tector ao nível da nervura principal, da
folha da planta cultivada em casa de vegetação. 2400x.

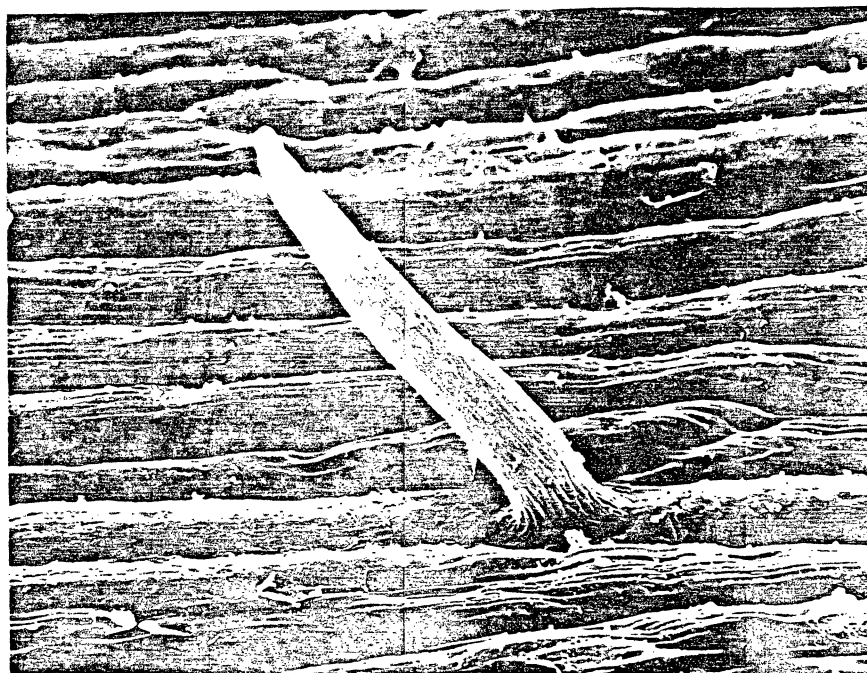


Figura 13 - Face adaxial da epiderme da folha da planta cultivada em casa de vegetação.

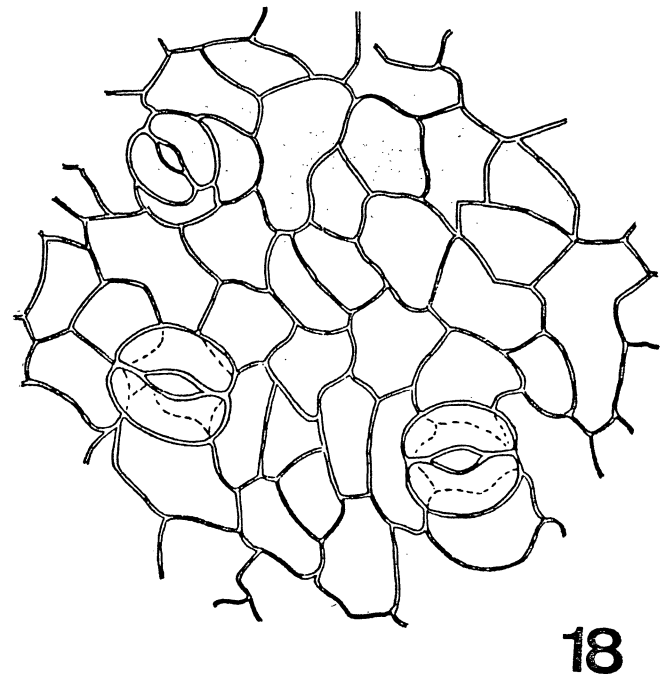
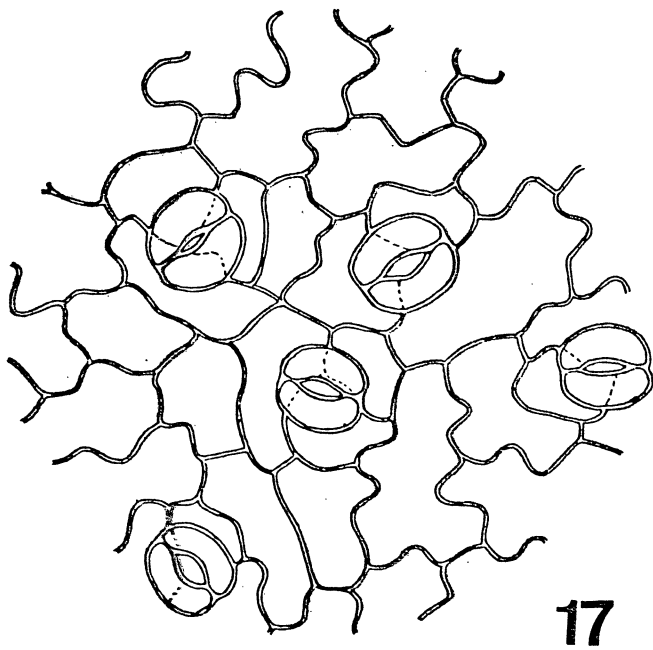
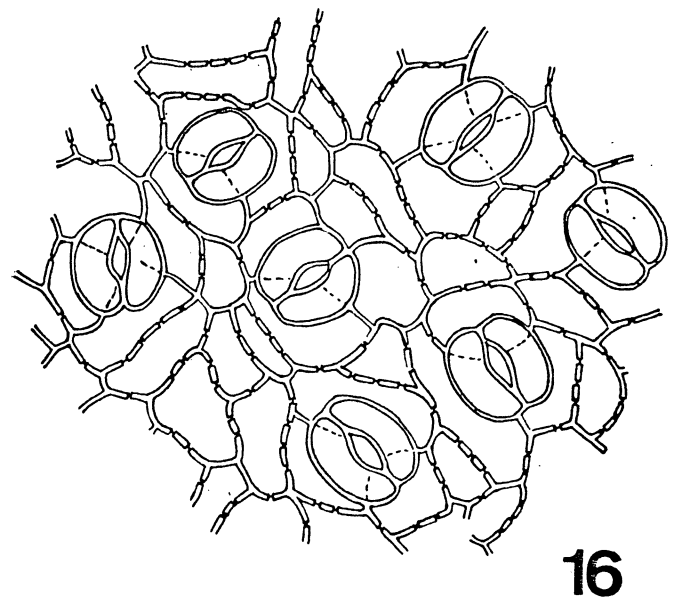
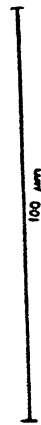
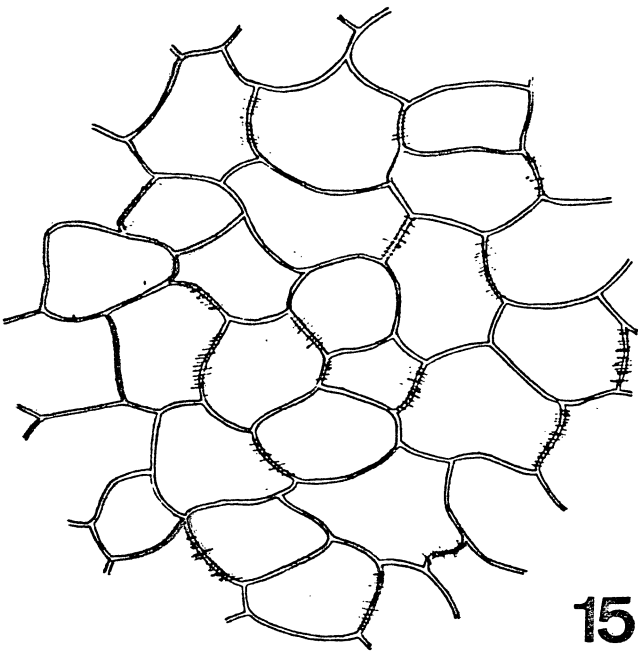
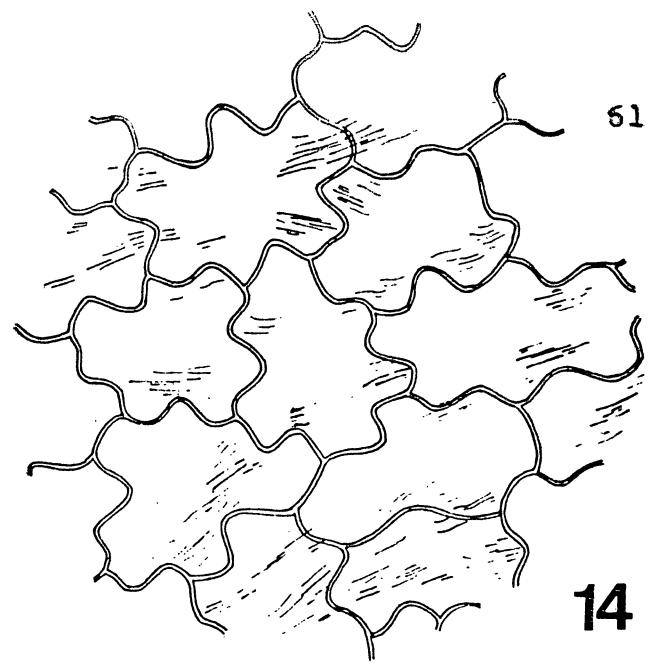
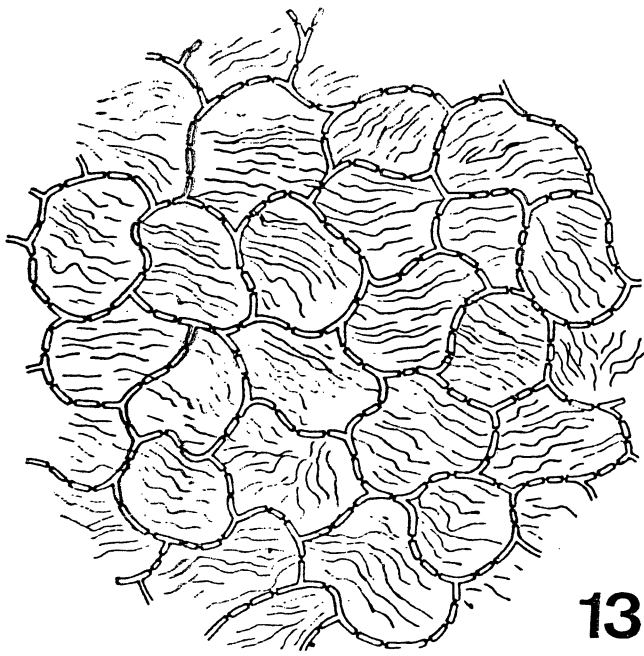
Figura 14 - Face adaxial da epiderme da folha da planta cultivada in vitro.

Figura 15 - Face adaxial da epiderme da folha da planta cultivada in vitro atípica.

Figura 16 - Face abaxial da epiderme da folha da planta cultivada em casa de vegetação.

Figura 17 - Face abaxial da epiderme da folha da planta cultivada in vitro.

Figura 18 - Face abaxial da epiderme da folha da planta cultivada in vitro atípica.



6 CONCLUSÕES

1. O melhor tratamento para a desinfestação dos segmentos nodais foi o hipoclorito de sódio a 15% durante 10 minutos. Este tratamento resultou em valores médios de 20,1% de contaminação, 5,7% de oxidação e 72,9% de sobrevivência dos explantes.
2. A citocinina BAP na concentração de 2,0 mg/l proporcionou a maior taxa de multiplicação de brotações apicais no 1º subcultivo, com um número médio de brotações por explante no meio MS de 2,43 e de 2,28 no meio WPM, comparativamente à mesma concentração de 2iP e Zeatina.
3. A permanência de brotações sub-apicais durante 3 subcultivos no mesmo meio de cultura (WPM + 2 mg/l BAP) propiciou a maior taxa de multiplicação, resultando em valores médios de 3,75 brotações por explante.
4. A utilização de baixas dosagens de BAP (0,5 e 1 mg/l) e a adição de carvão ativado (1,0 g/l) no meio de cultura, resultou em baixas taxas de multiplicação, mas, proporcionou bom aspecto às brotações.
5. A permanência das brotações durante 12 dias no meio de indução do enraizamento, WPM/2, contendo 3 mg/l de AIB, e transferência para meio WPM/2 + 1 g/l de carvão ativado por mais 18 dias foi eficaz para a obtenção de 86,2% de enraizamento, com um número médio de 8,2 raízes por explante.

As brotações enraizadas tiveram bom desenvolvimento após o transplante para a terra.

6. As folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram grande incidência de estrias cuticulares. As paredes das células epidérmicas eram levemente sinuosas, e na nervura principal da face abaxial foram evidenciados tricomas tectores. As folhas de plantas cultivadas *in vitro* apresentaram menor incidência de estrias cuticulares em relação às anteriores. As paredes das células epidérmicas eram marcadamente sinuosas. Nas folhas de plantas cultivadas *in vitro* mas que se apresentavam atípicas, a incidência de estrias cuticulares era mínima, e as paredes das células epidérmicas eram levemente sinuosas. A face abaxial das folhas nas 3 situações revelou a presença de estômatos dos tipos anisocíticos e/ou anemocítico.

SUMMARY

Cuttings from *Ilex paraguariensis* St. Hil. were produced by micropropagation. The establishment and transference to other steps *in vitro* were carried out in laminar flux camera. Cultures were incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, with illumination at 2000 lux for 16 h/day. WPM and MS medium were used. Nodal segments about 3 cm long obtained from 2-years old seedlings, were disinfected in a 10 or 15% sodium hypochlorite solution during 5, 10 or 15 min and precultured in a MS medium. After 30 days, the explants were transferred to a proliferation medium. The multiplication was tested: for the influence of BAP, 2iP and Zeatin at 2 mg/l in WPM and MS medium; combinations of AIB and BAP in WPM and MS medium during 3 subcultures; addition of activated charcoal (1 g/l) and BAP (0,5 and 1,0 mg/l) in WPM and MS medium during 3 subcultures. The rooting was evaluated in two steps (induction and elongation of roots) during 12+18 days and in a unique step during 30 days, with different concentrations of AIB in WPM/2. Cuttings were transplanted in a climate greenhouse type Van der Hoeven. During multiplication were observed atypical leaves, comparisons of leaf-surface were made among leaves of plants cultivated *in vitro*, using light microscope and scanning electron. The steps *in vitro* exhibit satisfactory results, explants dipped in a 15% sodium hypochlorite solution for 10 min showed that 20,1% of contamination, 5,7% of oxidation and 72,9% of the nodal segments survived. Of the tested cytokinins, BAP was the most effective, the proliferation rate from 1 subculture had 2,43 shoots/explant in MS medium and 2,28 in WPM. Shoots maintained during 3 subcultures in WPM 2 mg/l BAP provided the greater proliferation rate (3,75 shoots/explant). The utilization of low concentrations of BAP and activated charcoal were provided good morphological aspect of the shoots. A two step of root formation were provided the greater rooting percentages (86,2%) and numbers of root per shoot (8,2). Plantlets rooted depicted a good development. The comparison of leaf-surface between the 3 situations above detected significant responses.

ANEXOS

TABELA 1A. Análise de variância das concentrações de AIB no enraizamento, após 30 dias de exposição no meio indutor, com estudo da Regressão Polinomial.

Fonte de variação	G.L	S.Q	Q.M	F
Regressão Linear	1	1,0393	1,03937	2,68 n.s
Regressão Quadrática	1	0,6240	0,6240	1,61 n.s
Desvios da Regressão	1	0,1177	0,1177	< 1 n.s
Tratamentos	(3)	(1,7811)		
Resíduos	108	41,8974	0,3879	
Total	111	43,6785		

n.s= não significativo

TABELA 1B. Análise de variância das concentrações de AIB no enraizamento em duas fases (12+18 dias), com estudo da regressão polinomial.

Fonte de variação	G.L	S.Q	Q.M	F
Regressão Linear	1	588,1166	588,1166	25,6829 **
Regressão Quadrática	1	133,0607	133,0607	5,81 *
Desvios da Regressão	1	160,3010	160,3010	7,00 *
Tratamentos	(3)	(881,4787)		
Resíduos	115	2633,3954	22,8990	
Total	118	3514,8739		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 1C Coeficientes do modelo de regressão para a concentração de AIB, no meio de enraizamento em duas fases (12+18 dias).

Variável independente	Coeficiente	Erro padrão	t
Constante	0,1209	0,8947	0,13 (n.s)
Concentração	3,1515	0,8709	3,62 (**)
(Concentração) ²	-0,4175	0,1776	-2,35 (*)

n.s não significativo

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. J. Amer. Soc. Hort. Sci., Alexandria, v.109, p.343-347, 1984.
- BAKER, E.A. Chemistry and morphology of epicuticular waxes. In: CUTLER, D.F.; ALVIN, K.L.; PRICE, C.E. The plant cuticle. London: Academic Press, 1982. p.139-165.
- BALL, E.A. Tissue culture multiplication of *Sequoia*. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.146-158.
- BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.F. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State University Press., 1976.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDANI, M.K. Plant tissue culture, theory and practice. New York: Elsevier, 1983. 501p.
- BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Tissue culture techniques. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Tissue culture in forestry 2.ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.4-35.
- BONNER, J.; GALSTON, A.W. Principios de fisiologia vegetal. Madrid, Aguillar, 1973. 485p.
- BOTCHER, I.; et al. Induction and reversion of vitrification of plants cultured in vitro. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.72, p.560-564, 1988.
- BOULAY, M. Conifer micropropagation: applied research and commercial aspects. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3. p.185-206.

- BRAINERD, K.E. *et al.* Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'pixy' plum grown under different environments. *HortScience*, Alexandria, v.16, n.2, p.173-175, 1981.
- BURGUER, D.W. *et al.* Rapid micropropagation of *Faulownia tomentosa*. *HortScience*, Califórnia, v.20, n.4, p.760-761, 1985.
- CHALUPA, V. *In vitro* propagation of birch (*Betula verrucosa* Ehrh.). *Biol. Plant.*, v.23, p.472-474, 1981.
- European hardwoods. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.224-246.
- CHÉE, R. Micropropagation: can nurserymen afford to ignore it? *Am. Nurseryman*. v.159, n.8, p.89-103, 1984.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plantas. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.
- CUNHA, G.G. Cultura de embriões de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. HIL.) *in vitro*. Porto Alegre, 1990, 51p. Tese, Mestrado em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.H. *Experiments in plant tissue culture*. New York: Cambridge University, 1982. 178p.
- EDWIN, G.; REITZ, P.R. Aquifoliáceas. *Flora Ilustrada Catarinense*, Itajaí: R. Reitz, AQUÍ, 47p, 1967.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. Oxford: Pergamon Press, 1990. 588p.
- FRIDBORG, G.C. *et al.* The effect of actived charcoal on tissue culture adsorption of metabolite inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.43, p.104-106, 1978.
- GASPAR, T. *et al.* Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. *Cell and tissue culture in forestry*.

Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1, p.152-166.

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

GIBERTI, G.C. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (Aquifoliaceae). Darwiniana, v.22, p.217-240, 1979.

GRACA, M.E.C. et al. Estaquia de erva-mate. Curitiba: EMBRAPA, 1988. 6p. (Circular Técnica, 18).

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: Antônio Carlos e Linda Caldas, 1990. p.99-169.

GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A.F. *Eucalyptus*. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.385-399. v.3.

HALDEMAN, J.H.; THOMAS, R.L.; MCKAMY, D.L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Cammelia sinensis* and *C. japonica*. HortScience, Virginia, v.22, n.2, p.306-307. 1987.

HASEGAWA, P.M. *In vitro* propagation of rose. HortScience, Alexandria, v.14, p.610-612, 1979.

----- Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. J. Amer. Soc. Hort. Sci., v.105, p.216-220, 1980.

HU, C.Y. *In vitro* culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci., New Jersey, v.100, n.3, p.221-225, 1975.

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

IRITANI, C. Ação de reguladores do crescimento na propagação vegetativa por estaquia de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire e *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. Curitiba, 1981, 163p. Tese, (Mestrado

em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná.

JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Rapid in vitro rooting of the apple rootstock M.9. J. Hort. Sci., Ashford, v.54, n.4, p.309-311, 1979.

JELASKA, S. European pines. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.42-60. v.3.

JOHN, A.; WEBB, K.J. Sitka spruce (*Picea sitchensis* (BONG.) CARR.). In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.30-41. v.3.

KEVERS, C. et al. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. Physiol. Plant., Copenhagen, v.61, p.69-74. 1984.

KRIKORIAN, A.D.; KANN, R.F. Aseptic multiplication of chinese tallow (*Sapium sebiferum* (L.) Roxb.). In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.357-369. v.3.

LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. Plant. Sci. Lett., Limerick, v.13, n.3, p.281-285, 1978.

LLOYD, G.H.; McCOWN, B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. Proc. Inter. Plant Propagator Soc., v.30, p.421-427, 1980.

McCOWN, B.H.; SELLMER, J.C. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1. p.4-13.

McCOWN, D.O.; McCOWN, B.H. North american hardwoods. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3 p.247-260.

McGRANAHAN, G.H.; DRIVER, J.A.; TULECKE, W. Tissue culture of *Juglans*. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell

- and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.261-271.
- MEHRA-PALTA, A.; THOMPSON, D.G. Tissue culture of eastern north american conifers. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.61-79.
- MERUVIA, M.Y.L. Contribuição ao conhecimento da anatomia foliar de *Colubrina glandulosa* Perkins. var. *reitzii* (M.C. Johnston. (Rhamnaceae). Curitiba, 1990, 131p. Tese, (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná.
- METCALFE, C.R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons. Oxford: Clarendon Press., 1950. v.1-2, 1499p.
- MINOCHA, S.C. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1, p.50-66.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAPP-ZINN, K. Anatomie des blattes. Blatt-anatomie der angiospermen. In: LISBAUER, K. Handbuch der Pflanzenanatomie. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1974. v.2, 658p.
- Anatomie des blattes. Blatt-anatomie der angiospermen. Experimentelle und ökologische anatomie des angiospermen blattes. Berlin: Gbruder Borntraeger, 1988. v.2.
- PASQUALETTO, P.L. et al. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, Alexandria, v.111, n.6, p.976-980, 1986.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.71-93.

- REISCH, B.I. Influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes. HortScience, Alexandria, v.111, p.138-141, 1986.
- REY, H.Y.; MOGRINSKI, L.A. Regeneración de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo *in vitro* de ápices caulinares y de segmentos nodales. Phytón, Buenos Aires, v.48, n.1/2, p.139-145, 1988.
- RIBAS, L.L.F. Micropropagação e estudo da parada de crescimento durante a aclimação de mudas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Gala, clone FZ. Curitiba, 1991. 139p. Tese (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná.
- SMITH, M.A.L.; PALTA, J.P.; MCCOWN, B.H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown asian white birch. J. Amer. Soc. Hort. Sci., Alexandria, v.111, n.3, p.437-442, 1986.
- SNIR, I.; EREZ, A. *In vitro* propagation of malling merton apple rootstocks. HortScience, Alexandria, v.15, n.5, p.597-598, 1980.
- SOLEREDER, H. Systematic anatomy of the dicotyledons. Oxford, Clarendon Press, 1908, v.1-2, 1183p.
- SOMMER, H.E.; WETZSTEIN, H.Y. Tissue culture of *Liquidambar*. In: BONGA, D.J.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.292-299.
- SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci., Alexandria, v.104, n.4, p.493-496, 1979.
- THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando: Academic Press, 1984. p.49-58.
- VASIL, J.K.; HILDEBRANDT, A.C. Variations of morphogenetic behaviour in plants tissue culture *Cichorium endivia* Linn. Ann. J. Bot., v.53, p.860-869, 1966.

- VIEITEZ, A.M. *et al.* Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chesnut regenerated *in vitro*. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.65, p.177-184, 1985.
- WEBB, D.T., VILLALOBOS, V.M. *In vitro* regeneration of central and south american conifers. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.166-175.
- WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* during acclimatization. *Amer. J. Bot.*, Columbus, v.69, n.10, p.1579-1586, 1982.
- Scanning electron microscopy of *in vitro*-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, Alexandria, v.108, n.3, p.475-480, 1983.
- WIECHETECK, M.S.S. Micropropagação de *Eucaliptus viminalis* Labill. a partir de material juvenil. Curitiba, 1990, 92p. Tese (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná.
- WILKINS, C.P.; *et al.* Tissue culture propagation of trees. *Outlook Agri.*, v.14, n.1, p.1-13, 1985.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991, p.45-93.