

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**TATIANA MAZON CÉZAR**

**ORGANOGENESE DIRETA DE *Pinus taeda* L.**

**CURITIBA**

**2011**

**TATIANA MAZON CÉZAR**

**ORGANOGENESE DIRETA DE *Pinus taeda* L.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Botânica, Área de concentração: Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Botânica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes Fortes Ribas  
Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Soares Koehler

**CURITIBA**

**2011**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BOTÂNICA



## “ORGANOGENESE DIRETA DE *PINUS TAEDA* L.”

por

**TATIANA MAZON CÉZAR**

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos Professores

**Profa. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR) - PRESIDENTE**

**Profa. Dra. Rosete Pescador (UFSC)**

**Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi (UFPR)**

**Curitiba, 06 de julho de 2011.**

Dedico este trabalho a todos os que se empenham para que as ações do homem sobre nosso planeta não sejam tão desastrosas a ponto de esgotarem sua capacidade de renovação natural. A todos que acreditam que o desenvolvimento sustentável é possível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, bênção e proteção.

Aos meus pais, Luciane e Juscelino, e aos meus irmãos, Nádia, Felipe e Lucas, por todo o apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

À professora Luciana Ribas, pela confiança, paciência e orientação em todos esses anos, tanto durante o mestrado quanto durante a graduação, e por ter sido a pessoa que acreditou em meu potencial, até mais do que eu mesma, e me deu a oportunidade de dar meus primeiros passos na carreira científica. Ao professor Henrique, pelas correções e auxílios na análise estatística dos dados. À professora Marguerite pela correção do abstract.

A todos os mais de 120 envolvidos no Projeto Pinus, dentre professores, profissionais e alunos de graduação e pós-graduação, em especial àqueles com quem convivi e que contribuíram diretamente com o meu trabalho: Bruno Henrique, Evandro, Jasmine, Ricardo, Leandro, Marcelo, Rorai, Lorenzo e Nathália.

A todos os colegas do Laboratório de Micropropagação e Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Botânica da UFPR.

À colega e amiga Luciana Luiza Pellegrini, pelos conselhos e ajudas com os relatórios, trabalhos e tarefas no laboratório.

A todos os colegas de mestrado, em especial às amigas Jesiani e Marizete. Estes dois anos de convivência foram marcantes na minha vida e essa turma fez parte disso e estará sempre no meu coração.

A Renato Rocco, Elizandra Krause e Selma Axelrud, cujos auxílios e profissionalismo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À prof<sup>a</sup> Cleusa, à secretaria Beth, ao técnico Nilson e aos professores Érika e Gedir. À engenheira florestal Fernanda Silveira e ao prof. Antonio Higa. Aos professores Luiz Antonio Biasi e Rosete Pescador por aceitarem o convite para a composição da banca, bem como por suas correções e sugestões.

À Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Botânica.

À Battistella Florestal pelo projeto e financiamento.

À Capes, pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução e desenvolvimento deste trabalho.

Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.

*Fernando Pessoa - Mar Português*

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| RESUMO.....   | iii       |
| ABSTRACT.....   | iv        |
| LISTA DE FIGURAS.....   | v         |
| LISTA DE TABELAS.....   | vii       |
| LISTA DE ABERVIATURAS.....  | ix        |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 OBJETIVO GERAL.....   | 2         |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 3         |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1 CARACTERÍSTICAS DE <i>Pinus taeda</i> L. E BREVE HISTÓRICO DE SUA SILVICULTURA NO SUL DO BRASIL.....  | 3         |
| 2.2 ASPECTOS SOBRE A CLONAGEM ASSOCIADA AO MELHORAMENTO E SOBRE A PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE CONÍFERAS..... | 5         |
| 2.3 ORGANOGÊNESE de <i>Pinus</i> spp e <i>Pinus taeda</i> .....   | 8         |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>14</b> |
| 3.1 COLETA DAS SEMENTES.....  | 14        |
| 3.2 SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> .....                           | 15        |
| 3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....   | 15        |
| 3.4 ORGANOGÊNESE.....   | 16        |
| <b>3.4.1 Brotações apicais obtidas de plântulas com cinco dias de germinação.....</b>                     | <b>16</b> |
| 3.4.1.1 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WV <sub>5</sub> .....                           | 16        |
| 3.4.1.2 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WPM.....  | 17        |
| <b>3.4.2 Brotações apicais obtidas de plântulas com dez dias de germinação.....</b>                       | <b>17</b> |
| <b>3.4.3 Variáveis avaliadas.....</b>   | <b>18</b> |
| 3.5 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES A PARTIR DE GEMAS AXILARES.....  | 18        |
| <b>3.5.1 Segmentos nodais.....</b>  | <b>18</b> |
| 3.5.1.1 Experimento I.....  | 18        |
| 3.5.1.2 Experimento II.....   | 19        |
| 3.5.1.3 Experimento III.....  | 19        |
| <b>3.5.2 Brotações apicais.....</b>   | <b>19</b> |
| 3.5.2.1 Experimento I.....  | 19        |
| 3.5.2.2 Experimento II.....   | 20        |
| 3.5.2.3 Experimento III.....  | 20        |
| <b>3.5.3 Variáveis avaliadas.....</b>   | <b>20</b> |
| 3.6 ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> .....  | 20        |
| <b>3.6.1 Experimento I.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>3.6.2 Experimento II.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3.6.3 Variáveis avaliadas.....</b>   | <b>21</b> |
| 3.7 ACLIMATIZAÇÃO.....  | 21        |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 22        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>  | <b>23</b> |
| 4.1 SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES.....   | 23        |
| 4.2 ORGANOGÊNESE.....   | 24        |

|   |    |
|---|----|
| <b>4.2.1 Brotações apicais obtidas de plântulas de cinco dias de germinação</b> ..... | 24 |
| 4.2.1.1 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WV <sub>5</sub> .....       | 24 |
| 4.4.1.2 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WPM.....                    | 25 |
| <b>4.2.2 Brotações apicais obtidas de plântulas de dez dias de germinação</b> .....   | 26 |
| <b>4.3 MULTIPLICAÇÃO A PARTIR DE GEMAS AXILARES</b> .....                             | 28 |
| <b>4.3.1 Multiplicação a partir de segmentos nodais</b> .....                         | 28 |
| 4.3.1.1 Experimento I.....  | 28 |
| 4.3.1.2 Experimento II.....   | 29 |
| 4.3.1.3 Experimento III.....  | 31 |
| <b>4.3.2 Multiplicação a partir de brotações apicais</b> .....                        | 33 |
| 4.3.2.1 Experimento I.....  | 33 |
| 4.3.2.2 Experimento II.....   | 35 |
| 4.3.2.3 Experimento III.....  | 36 |
| <b>4.4 ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i></b> .....   | 38 |
| <b>4.4.1 Experimento I</b> .....  | 38 |
| <b>4.4.2 Experimento II</b> .....   | 39 |
| <b>4.5 ACLIMATIZAÇÃO</b> .....  | 40 |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....  | 41 |
| 6.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS.....                                       | 41 |
| 6.2 ORGANOGÊNESE.....   | 43 |
| 6.3 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS E BROTAÇÕES APICAIS.....           | 45 |
| 6.4 INFLUÊNCIA GENOTÍPICA.....  | 50 |
| 6.5 ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> E ACLIMATIZAÇÃO.....                                 | 51 |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....   | 56 |
| <b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 57 |
| <b>FIGURAS</b> .....  | 58 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 65 |
| <b>ANEXOS</b> .....   | 75 |



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação para *Pinus taeda*, pelas técnicas de organogênese direta e multiplicação de gemas axilares. Sementes de famílias selecionadas (F27 e B05) e de pomar comercial, fornecidas pela empresa Battistella Florestal (Rio Negrinho – SC) foram submetidas a tratamento de estratificação ( $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 25 dias) para a superação da dormência. Brotações apicais obtidas de plântulas com cinco ou dez dias de germinação foram as fontes de explantes. Para a indução da formação de brotações adventícias e/ou axilares, foram utilizados meio de cultura  $\text{WV}_5$  com 0, 11, 22 ou 44  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina (BAP) combinada com 0,05  $\mu\text{M}$  de ácido naftaleno acético (ANA) e meio de cultura WPM com 11 a 44,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0; 0,5 ou 0,75  $\mu\text{M}$  de ANA durante 14 dias, e subcultivo para meio sem reguladores e WPM. Para a técnica de multiplicação de brotações axilares, utilizaram-se brotações apicais (0,5 a 2,0 cm de comprimento) e segmentos nodais (1,0 a 4,0 cm de comprimento), em meios de cultura  $\text{WV}_5$  e GDM, acrescidos de concentrações de 0,1 à 4,0  $\mu\text{M}$  de BAP, e cultivo durante quatro e oito semanas. Brotações de 1,5 cm de comprimento foram submetidas à indução ao enraizamento, por nove dias em meios GDM/2,  $\text{WV}_5/2$ ,  $\text{WV}_3/2$  ou em ágar-água, com 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP seguida de subcultivo em meio de cultura sem reguladores. A aclimatização de mudas foi feita diretamente em casa de vegetação ou com período prévio em sala de crescimento. Os melhores resultados para a indução de brotações múltiplas foram obtidos com explantes de cinco dias de idade, cultivados em meio de cultura  $\text{WV}_5$ , 44,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA, obtendo-se 50% de explantes com brotações e número médio de 4,8 brotações por explante. Para a multiplicação de gemas axilares, segmentos nodais de 1,0 cm de comprimento, inoculados em meio  $\text{WV}_5$  contendo 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP foram os mais eficientes, com 90% de explantes com brotações e 4,0 brotações por explante em média. Com brotações apicais, observou-se maior porcentagem de alongamento (286,5%) em meio  $\text{WV}_5$  sem reguladores, com explantes de 0,5 cm de comprimento. A melhor duração do subcultivo foi de oito semanas. O genótipo influenciou os resultados de germinação, indução e multiplicação de brotações, sendo que as melhores respostas ocorreram com a família F27, seguido da B05 e genótipos do pomar comercial. O meio de cultura  $\text{WV}_5$  permitiu a manutenção prolongada das culturas *in vitro*, as quais apresentaram vigor durante dois anos. Para indução de raízes, recomenda-se a formulação de ágar-água, acrescida de 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP durante nove dias, seguida de transferência para meio GDM/2, sem reguladores para o desenvolvimento de raízes (55,6% de enraizamento). A sobrevivência das mudas aclimatizadas foi de 85% após 40 dias, sendo os 20 primeiros dias em sala de crescimento e os dias posteriores em casa de vegetação. Concluiu-se que foi estabelecido um protocolo de micropropagação para *P. taeda*.

Palavras-chave: micropropagação, cultura *in vitro*, espécie florestal.

## ABSTRACT

The aim of this study was to establish a micropropagation protocol for *Pinus taeda* through direct organogenesis and axillary bud multiplication. Seeds of selected families (F27 and B05) and of commercial orchards were obtained from Battistella Florestal Company (Rio Negrinho – SC) and stratified ( $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 25 days) to overcome dormancy. Apical shoots from five or ten day old seedlings were the explant source. Culture media WV<sub>5</sub> with addition of 0, 11, 22 ou 44  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine (BAP) combined with 0.05  $\mu\text{M}$  naphthalene acetic acid (NAA), and culture media WPM with addition of 11 to 44  $\mu\text{M}$  BAP and 0; 0.5 or 0.75  $\mu\text{M}$  NAA were used for the induction of adventitious and/or axillary shoot formation, during 14 days, followed by subculture in growth regulator-free culture media. Multiplication of axillary shoots was conducted using apical shoots (0.5 to 2.0 cm long) and nodal segments (1.0 to 4.0 cm long), WV<sub>5</sub> or GDM culture media, BAP concentrations ranging from 0.1 to 4.0  $\mu\text{M}$ , and culture period of four or eight weeks. Shoots (1.5 cm long) were submitted to root induction for nine days in GDM/2, WV<sub>5</sub>/2, WV<sub>3</sub>/2 or water-agar medium containing 2.68  $\mu\text{M}$  NAA and 0.44  $\mu\text{M}$  BAP, followed by subculture on culture media without regulators. Acclimatization of rooted shoots was conducted directly in greenhouse or with a previous period in the growth room. Best results for induction of shoots were verified for five day old explants, cultivated on WV<sub>5</sub> culture media, with 44.0  $\mu\text{M}$  BAP and 0.05  $\mu\text{M}$  NAA, showing 50% of shoot formation and an average of 4.8 shoots per explant. For multiplication of axillary buds, nodal segments 1.0 cm long, inoculated in WV<sub>5</sub> media containing 2.5  $\mu\text{M}$  BAP were the most efficient, showing 90% of shoot formation and an average of 4.0 shoots per explant. With apical shoots 0.5 cm long a higher shoot elongation (286.5%) was observed in WV<sub>5</sub> culture media without growth regulator. The best subculture period was eight weeks. The genotype affected the results of germination, shoot induction and multiplication, and the best responses were obtained for family F27, followed by B05 and commercial orchard genotypes. WV<sub>5</sub> culture media allowed prolonged and healthy *in vitro* culture for two years. For root induction, it is suggested to use water-agar formulation, with 2.68  $\mu\text{M}$  NAA and 0.44  $\mu\text{M}$  BAP for nine days, followed by transfer to GDM/2 medium without regulator for the root development (55.6% of rooting). The rooted shoots showed 85% of survival after 40 days, the first 20 days in the growth room and the next days in the greenhouse. It can be concluded that a micropropagation protocol was established for *P. taeda*.

Keywords: micropropagation, *in vitro* culture, forestry specie

## LISTA DE FIGURAS

- 1 PREPARO DOS EXPLANTES. FIGURA 1A: Sementes de *P.taeda*, da família selecionada F27, após cinco dias de germinação. FIGURA 1B: Plântula de *P. taeda* após cinco dias de germinação com radícula e megagametófito removidos com o uso de bisturi. FIGURA 1C: Explante obtido de plântula de *P. taeda* com cinco dias de germinação recém inoculado em meio de cultura WPM acrescido de 44  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA. FIGURA 1D: Plântula de *P. taeda* com dez dias de germinação, após remoção da radícula e dos ápices dos cotilédones, para a obtenção de explante de comprimento total de 3,0 cm. FIGURA 1E: Explantes obtidos de plântulas de *P. taeda* com dez dias de germinação após uma semana em meio de cultura MS sem reguladores vegetais; FIGURA 1F: Explantes obtidos de plântulas de *P. taeda* com dez dias de germinação após subcultivo para meio  $\text{WV}_5$  acrescido de 44  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA.....59
- 2 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS – EXPLANTES OBTIDOS A PARTIR DE PLÂNTULAS DE CINCO DIAS DE GERMINAÇÃO. FIGURA 2A: Brotações adventícias e/ou axilares sobre cotilédone de explante de plântula de *P. taeda* de cinco dias de germinação, após quatro semanas em meio de cultura  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais. FIGURA 2B: Brotações adventícias sobre ápice de cotilédone de explante de cinco dias de germinação após quatro semanas do segundo subcultivo consecutivo em meio de cultura  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais.FIGURA 2C: Brotações adventícias e/ou axilares sobre cotilédone de explante de plântula de *P. taeda* de cinco dias de germinação, após quatro semanas em meio de cultura WPM sem reguladores vegetais. FIGURA 2D: Brotações alongadas em explante de *P. taeda* de cinco dias de germinação após quatro semanas do segundo subcultivo consecutivo em meio de cultura WPM sem reguladores.....60
- 3 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS – EXPLANTES OBTIDOS A PARTIR DE PLÂNTULAS DE DEZ DIAS DE GERMINAÇÃO. FIGURA 3A: Explante obtido de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas em meio de cultura  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais e com 0,5% de carvão ativado, sem formação de brotações múltiplas. FIGURA 3B: Brotações axilares em explante obtido de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas em meio de cultura  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais e com 0,5% de carvão ativado. FIGURA 3C: Primórdios de brotações adventícias sobre acícula de explante de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas em meio de cultura  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais e com 0,5% de carvão ativado. FIGURA 3D: Brotações múltiplas em explante obtido de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas do primeiro subcultivo para meio  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais e sem carvão. FIGURA 3E: Brotações múltiplas individualizadas, obtidos a partir de explante de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas do primeiro subcultivo para meio  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais e sem carvão.....61
- 4 MULTIPLICAÇÃO A PARTIR DE GEMAS AXILARES. FIGURA 4A: Brotações axilares em segmento nodal de 2,0 a 2,9 cm, após quatro semanas em meio de cultura  $\text{WV}_5$  acrescido de 0,1  $\mu\text{M}$  de BAP e após oito semanas de subcultivo em meio  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais. FIGURA 4B: Brotações axilares em segmentos nodais de 3,0 a 4,0 cm, após quatro semanas em meio de cultura  $\text{WV}_5$  acrescido de 0,1  $\mu\text{M}$  de BAP e após oito semanas de subcultivo em meio  $\text{WV}_5$  sem reguladores vegetais. FIGURA 4C: Brotações axilares em segmento nodal de 1,0 cm de comprimento, em explante da família F27, após quatro semanas em meio  $\text{WV}_5$  acrescido de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP. FIGURA 4D: Alongamento de brotação apical de *Pinus taeda*, de comprimento inicial de 1,0 cm, após oito semanas em meio GDM sem reguladores. FIGURA 4E: Alongamento de brotação apical de *Pinus taeda*, de comprimento inicial de 1,0 cm, após oito semanas em meio  $\text{WV}_5$  sem reguladores. FIGURA 4F: Brotações axilares em brotação apical de *Pinus taeda*, de comprimento inicial de 1,0 cm, após oito semanas em meio  $\text{WV}_5$  acrescido de 4,0  $\mu\text{M}$  de BAP.....62

|  |    |
|--|----|
| 5 ENRAIZAMENTO. FIGURA 5A: Raiz adventícia em vista lateral, após duas semanas em meio de cultura GDM com concentração de sais reduzida à metade, 20 g.L <sup>-1</sup> de sacarose e sem reguladores vegetais, induzida ao enraizamento durante nove dias em ágar-água sem sacarose acrescido de 2,68 µM de ANA e 0,44 µM de BAP. FIGURA 5B: Primórdios radiciais e raiz adventícia vistos de baixo, formados após duas semanas em meio de cultura GDM com concentração de sais reduzida à metade, 20 g.L <sup>-1</sup> de sacarose e sem reguladores vegetais, induzida ao enraizamento durante nove dias em ágar-água sem sacarose acrescido de 2,68 µM de ANA e 0,44 µM de BAP. FIGURA 5C: Escurecimento de raízes e formação de raízes secundárias em brotação enraizada, após seis semanas em meio de cultura GDM com concentração de sais reduzida à metade, 20 g.L <sup>-1</sup> de sacarose e sem reguladores vegetais, com indução ao enraizamento ocorrida em meio de cultura GDM com redução da concentração de sais à metade, 20 g.L <sup>-1</sup> de sacarose e 2,68 µM de ANA e 0,44 µM de BAP, durante nove dias. FIGURA 5D: Presença de calo, escurecimento de raízes e formação de raízes secundárias em brotação enraizada, após seis semanas em meio de cultura WV <sub>5</sub> com concentração de sais reduzida à metade, 20 g.L <sup>-1</sup> de sacarose e sem reguladores vegetais, com indução ao enraizamento ocorrida em meio de cultura WV <sub>5</sub> com redução da concentração de sais à metade, 20 g.L <sup>-1</sup> de sacarose e 2,68 µM de ANA e 0,44 µM de BAP, durante nove dias..... | 63 |
| 6 ESQUEMA ILUSTRANDO AS ETAPAS PARA A REALIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Pinus taeda</i> .....  | 64 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| 1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE FAMÍLIAS SELECIONADAS E POMAR COMERCIAL (PC) DE <i>Pinus taeda</i> FORNECIDAS PELA EMPRESA BATTISTELLA FLORESTAL, LOCALIZADA EM RIO NEGRINHO (SC), APÓS 25 DIAS DE TRATAMENTO DE ESTRATIFICAÇÃO PARA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA.....  | 23 |
| 2 FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES OBTIDOS DE PLÂNTULAS DE CINCO DIAS DE GERMINAÇÃO DAS FAMÍLIAS F27, B05 E DE POMAR COMERCIAL DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS DUAS SEMANAS DE INDUÇÃO EM MEIO WV <sub>5</sub> COM CONCENTRAÇÕES DE BAP E ANA, SEGUIDA DE DOIS SUBCULTIVOS CONSECUTIVOS, DE QUATRO SEMANAS CADA, PARA MEIO WV <sub>5</sub> SEM REGULADORES.....  | 25 |
| 3 FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES OBTIDOS DE PLÂNTULAS DE CINCO DIAS DE GERMINAÇÃO DAS FAMÍLIAS F27, B05 E DE POMAR COMERCIAL DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS DUAS SEMANAS DE INDUÇÃO EM MEIO WPM COM CONCENTRAÇÕES DE BAP E ANA, SEGUIDA DE DOIS SUBCULTIVOS, DE QUATRO SEMANAS CADA, PARA MEIO WPM SEM REGULADORES.....   | 26 |
| 4 FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES OBTIDOS DE PLÂNTULAS DE DEZ DIAS DE GERMINAÇÃO DA FAMÍLIA F27 DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS DUAS SEMANAS DE INDUÇÃO EM MEIO WV <sub>5</sub> ACRESCIDO DE 33 OU 44 µM BAP E 0,05 µM ANA, SEGUIDA DE SUBCULTIVO PARA MESMO MEIO SEM REGULADORES VEGETAIS ACRESCIDO DE 0,5% DE CARVÃO ATIVADO E DE DOIS SUBCULTIVOS PARA WV <sub>5</sub> SEM REGULADORES E SEM CARVÃO ATIVADO, SENDO OS TRÊS SUBCULTIVOS COM DURAÇÃO DE SEIS SEMANAS CADA..... | 28 |
| 5 FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DA FAMÍLIA F27 DE <i>P. taeda</i> , DE DIFERENTES COMPRIMENTOS, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS DE SUBCULTIVO PARA MEIO WV <sub>5</sub> SEM REGULADORES, PRECEDIDO DE QUATRO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA COM 0,1 µM DE BAP.....   | 29 |
| 6 FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DE DIFERENTES FAMÍLIAS SELECIONADAS DE <i>P. taeda</i> , COM 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS EM MEIO WV <sub>5</sub> ACRESCIDO DE 0,25; 0,5 OU 2,5 µM DE BAP.....   | 31 |
| 7 FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DAS FAMÍLIAS F27, B05 E DE POMAR COMERCIAL DE <i>P. taeda</i> , DE 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS QUATRO SEMANAS EM MEIO WV <sub>5</sub> E GDM ACRESCIDOS DE 1,0; 2,0 OU 4,0 µM DE BAP.....  | 32 |
| 8 FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DAS FAMÍLIAS F27, B05 E DE POMAR COMERCIAL DE <i>P. taeda</i> , DE 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS OITO SEMANAS EM MEIO WV <sub>5</sub> E GDM ACRESCIDOS DE 1,0; 2,0 OU 4,0 µM DE BAP.....  | 33 |

|   |    |
|---|----|
| 9 RESPOSTAS DE BROTAÇÕES APICAIS DA FAMÍLIA F27 DE <i>P. taeda</i> , COM 0,5; 1,0 E 2,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS OITO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA WV <sub>5</sub> OU GDM DESPROVIDO DE REGULADORES VEGETAIS.....  | 34 |
| 10 RESPOSTAS DE BROTAÇÕES APICAIS DA FAMÍLIA F27 DE <i>P. taeda</i> , DE 0,5 E 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS OITO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA WV <sub>5</sub> COM 0,5; 1,0 E 2,0 μM DE BAP.....  | 36 |
| 11 RESPOSTAS DE BROTAÇÕES APICAIS DA FAMÍLIA F27 DE <i>Pinus taeda</i> , DE 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA WV <sub>5</sub> COM 1,0; 2,0 OU 4,0 μM DE BAP.....   | 37 |
| 12 ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DA FAMÍLIA F27 DE <i>P. taeda</i> , SUBMETIDAS A INDUÇÃO POR NOVE DIAS EM MEIOS DE CULTURA GDM, WV <sub>5</sub> , WV <sub>3</sub> COM CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA À METADE E 20 G.L <sup>-1</sup> DE SACAROSE E MEIO ÁGAR-ÁGUA SEM SAIS OU SACAROSE, EM PRESENÇA DE 2,68 μM DE ANA E DE 0,44 μM DE BAP, APÓS SEIS SEMANAS DE SUBCULTIVO PARA MEIOS DE CULTURA SEM REGULADORES..... | 39 |
| 13 ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DAS FAMÍLIAS F27 E B05 E DE POMAR COMERCIAL DE <i>P. taeda</i> , SUBMETIDAS A INDUÇÃO POR NOVE DIAS EM MEIO DE CULTURA GDM/2 OU AA, ACRESCIDO OU NÃO DE 20 G.L <sup>-1</sup> DE SACAROSE, NA PRESENÇA DE 2,68 μM DE ANA E DE 0,44 μM DE BAP, APÓS SEIS SEMANAS DE SUBCULTIVO PARA MEIO GDM/2 COM 20 GL <sup>-1</sup> DE SACAROSE E SEM REGULADORES.....                              | 40 |
| 14 PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE BROTAÇÕES DE <i>P. taeda</i> ENRAIZADAS <i>in vitro</i> , APÓS DEZ, 20, 30 E 40 DIAS CONTADOS A PARTIR DA RETIRADA DAS BROTAÇÕES DO MEIO DE CULTURA, SOB TRÊS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACLIMATIZAÇÃO.....   | 41 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| 2-ip            | N <sup>6</sup> -(2-isopentenil)adenina  |
| AA              | Ágar-água   |
| ABA             | Ácido abscísico   |
| AIB             | Ácido indolbutírico   |
| ANA             | Ácido $\alpha$ -naftalenoacético  |
| BAP             | 6-benzilaminopurina   |
| B05             | Família selecionada B05   |
| CIN             | Cinetina  |
| F27             | Família selecionada F27   |
| GDm             | Meio de cultura GD de Gresshoff e Doy modificado por Mehra-Palta <i>et al.</i> (1978) |
| MS              | Meio de cultura de Murashigue e Skoog (1962)  |
| PC              | Pomar comercial   |
| WPM             | Woody Plant Medium (LLOYD; McCOWN, 1980)  |
| WV <sub>3</sub> | Meio de cultura Westvasco 3 (COKE, 1996b)   |
| WV <sub>5</sub> | Meio de cultura Westvasco 5 (COKE, 1996a)   |
| ZEA             | Zeatina   |

## 1 INTRODUÇÃO

*Pinus taeda* L., juntamente com *P. elliottii* Engelm., são as principais espécies do gênero *Pinus* plantadas na região Sul do Brasil (SHIMIZU, 2006). Nas últimas três décadas, o uso e aplicação da madeira do gênero *Pinus* cresceu substancialmente, transformando-a em matéria-prima fundamental para movimentar um setor produtivo de relevante importância para a economia brasileira (VASQUES *et al.*, 2007). *P. taeda* tem sido utilizado para as indústrias madeireira e de celulose e papel (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e seu cultivo constitui em torno de 46% das plantações comerciais do gênero *Pinus* no país (BALLARIN; PALMA, 2003).

No sul do Brasil, *Pinus taeda* costuma ser propagado via sementes e trabalhos básicos de melhoramento permitiram a seleção de características que aumentaram a qualidade das florestas de *P. taeda* nacionais (SHIMIZU, 2006). Como forma de manter o ganho genético obtido com o melhoramento e produzir em larga escala genótipos superiores de uma população, as técnicas de propagação vegetativa são uma ferramenta para a obtenção de clones com características desejadas, contribuindo para a manutenção de um programa de silvicultura de uma espécie (HANDLEY *et al.*, 1995). A propagação vegetativa para o gênero *Pinus* é comumente realizada com a enxertia, porém esta técnica está longe de ser um método ideal, uma vez que depende da compatibilidade entre enxerto e porta-enxerto (ORDÁS *et al.*, 2007) e frequentemente é utilizada com a finalidade de rejuvenescer material maduro. Técnicas convencionais de estaquia são difíceis para *P. taeda* e a miniestaquia é fortemente dependente da época do ano e da juvenildade do material vegetal (ANDREJOW; HIGA, 2007).

A micropropagação é uma alternativa para a propagação vegetativa em escala massal, que permite a produção de mudas a partir de pequenas quantidades de material vegetal, livres de contaminação e em qualquer época do ano (HARTMANN *et al.*, 2011). Consiste em promover a multiplicação de tecidos de plantas *in vitro*, em ambiente asséptico, utilizando-se um meio de cultura e condições adequadas de luz e temperatura, visando obter ao final do processo plantas completas com todos os tecidos e órgãos que lhes são característicos e todas suas funções orgânicas; para estimular a formação de brotações e raízes *in vitro*, pode-se induzir a diferenciação de tecidos com a adição, em meio de cultura, de citocininas e auxinas exógenas (GEORGE *et al.*, 2008).



A principal técnica de micropropagação utilizada em coníferas é a organogênese, na qual há a indução à formação de parte aérea, seguida de indução ao enraizamento adventício (MOTT; AMERSON, 1981). A produção de brotações adventícias a partir de cotilédones ou de hipocótilos é possível para muitos gêneros de coníferas, inclusive para o gênero *Pinus*, tendo como exemplo os protocolos estabelecidos para *P. strobus* (KAUL, 1990) e *P. pinea* (ORDÁS *et al.*, 2007). Para *Pinus taeda*, apesar de existirem muitos trabalhos relatando a obtenção de brotações adventícias (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978; MOTT; AMERSON 1981; SEN *et al.*, 1989; DHUMALE; NEWTON, 1996; TANG; OUYANG, 1999; TANG; GUO, 2001), a eficiência destes protocolos ainda é baixa, especialmente nos cultivares comerciais, e maioria dos trabalhos publicados em artigos científicos relata a organogênese pela via indireta (com formação de calo) a qual produz menor fidelidade clonal do que a via direta (sem formação de calo).

Os maiores desafios no desenvolvimento de protocolos de micropropagação para coníferas, e em especial, nas espécies de *Pinus*, são os relacionados ao enraizamento (MOTT; AMERSON, 1981). Diaz-Sala *et al.* (1996) relataram que em *P. taeda* o declínio nas porcentagens de enraizamento com a maturação é bastante abrupto. Outro fator que dificulta o estabelecimento de um protocolo de micropropagação em *P. taeda* é o fato de que suas respostas *in vitro* serem fortemente influenciadas pelo genótipo e, para o enraizamento, a família de origem do material vegetal parece exercer mais variações do que os tratamentos com auxinas (FOSTER, 1990).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação para *Pinus taeda*, testando-se diferentes formulações de meio de cultura e diferentes concentrações de reguladores vegetais para a indução e a multiplicação de brotações adventícias e/ ou axilares, bem como a determinação de uma metodologia eficiente para o enraizamento *in vitro* e posterior aclimatização de mudas.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo de micropropagação a partir de plântulas de cinco ou dez dias de germinação para a propagação massal de genótipos selecionados de *Pinus taeda* L.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes formulações de meio de cultura e diferentes concentrações de reguladores vegetais para a indução e a multiplicação de brotações adventícias e/ou axilares;
- Testar diferentes comprimentos de explante e períodos de subcultivo para a multiplicação de gemas axilares de segmentos nodais e de brotações apicais;
- Determinar uma metodologia eficiente para o enraizamento *in vitro*;
- Determinar uma metodologia para a aclimatização de mudas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DE *Pinus taeda* L. E BREVE HISTÓRICO DE SUA SILVICULTURA NO SUL DO BRASIL

Pinaceae, a maior família dentre as coníferas e também a de maior importância econômica, é família à qual pertence o gênero *Pinus* L., que reúne cerca de 110 espécies, sendo um dos mais numerosos entre as gimnospermas (WYLLIARD *et al.*, 2007; JUDD *et al.*, 2008).

*Pinus taeda* L., também conhecido como pinheiro-americano ou pinheiro-amarelo é uma árvore monóica que pode atingir mais de 20 metros de altura, possui madeira resinosa, de cor branco-amarelada e fibra longa, apresenta polinização anemófila e sementes com aproximadamente 5 mm de comprimento, com alas de até 25 mm. (LORENZI *et al.*, 2003; BOGNOLA *et al.*, 2008). Suas acículas de cor verde-escura, com 15 a 20 cm de comprimento, reunidas em feixes de três em três, e seus cones femininos ovado-oblongos, sésseis ou sub-sésseis, muito persistentes e dotados de escamas espinhosas são as características que o diferem do *Pinus elliottii* Engelm. (LORENZI *et al.*, 2003).

*Pinus taeda* é oriundo das planícies adjacentes ao Golfo do México e da Costa Atlântica ao Sudeste dos Estados Unidos e cresce geralmente até a altitude de 800 m (BALLARIN; PALMA, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006). É espécie pioneira nas regiões onde ocorre naturalmente, possuindo ampla capacidade de adaptação, rapidez de crescimento, baixa exigência nutricional, rusticidade e tolerância, crescendo com frequência em solos extremamente pobres (REISSMANN; WISNIEWSKY, 2001).

A espécie foi introduzida no Brasil no final da década de 1940 e mostrou excelente adaptação às condições ambientais do Sul do país (SHIMIZU, 2006). Naquela época, o Brasil vivia o despertar do seu processo de industrialização e o crescimento de sua indústria de base florestal e, nos anos seguintes, o desenvolvimento econômico teve como consequência a extração desordenada das reservas nativas das regiões Sul e Sudeste (SIQUEIRA, 2003).

Na década de 1960, prevendo-se a falta de matéria prima de fibra longa para o abastecimento das indústrias de celulose e papel na região Sul do Brasil (anteriormente obtida a partir de *Araucaria angustifolia*), iniciou-se um grande esforço para implantação de florestas para atender a essas necessidades e o *P. taeda*, ao lado do *P. elliotii*, foi uma das principais escolhas para o reflorestamento com estes fins (BARRICHELO *et al.*, 1978; FONSECA *et al.*, 1978). Frente à necessidade de estruturar uma política mais nítida para o setor florestal, o Governo Federal editou a Lei 4.771 de 1965, que instituiu o Código Florestal Brasileiro, e a Lei 5.106 de 1966 que instituiu o Programa de Incentivos Fiscais para o Reflorestamento (SIQUEIRA, 2003).

Visando melhorias na produtividade dos plantios de pinus para a indústria crescente, o IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, criado em 1968, a partir da associação de empresas particulares), no início da década de 1970, realizou diversos estudos e ensaios de procedências para *P. taeda*, *P. elliotii*, e *P. echinata*, na região Sul, os quais demonstraram que *P. taeda* apresentava alta variação genética ao nível de procedências, não verificada, por exemplo, para *P. elliotii* var. *elliotii* (FONSECA *et al.*, 1978). Este tipo de estudo foi de grande importância para nortear estratégias para o melhoramento genético.

A partir de 1975, o IPEF iniciou, em empresas do PR e de SC, uma programação intensiva de seleção de árvores superiores de *P. taeda*, objetivando a produção de sementes melhoradas com a instalação de bancos clonais, e também o armazenamento de material genético para a instalação de pomares de sementes (FONSECA *et al.*, 1978). Estudos básicos deste tipo promoveram trabalhos de seleção e cruzamentos controlados, com os quais foi possível alterar as características iniciais das plantações, aumentando o valor das florestas nacionais de *P. taeda* (SHIMIZU, 2006). Com uso de semente geneticamente melhorada, aumentou-se não só a produtividade de madeira como também foi incrementada

substancialmente a qualidade do fuste, o que, associado ao devido manejo, permite a formação de povoamentos de alta qualidade, com árvores de fuste reto, baixa incidência de defeitos e ramos finos (SHIMIZU, 2006).

Ao final de 1988, quando se encerraram as últimas modalidades de incentivo ao reflorestamento, o país apresentava um panorama florestal constituído, com projeção reconhecida internacionalmente, criação de infra-estrutura de grande escala e de uma “escola florestal” devido à importância das pesquisas para a evolução tecnológica dos plantios (SIQUEIRA, 2003).

Atualmente, a cadeia produtiva da madeira no Brasil é relevante e importante para a economia nacional, participando de aproximadamente 4,1% do PIB, e o faturamento total da área florestal equivale a 10% de toda exportação brasileira, sendo notória a importância do gênero *Pinus* (VASQUES *et al.*, 2007). A versatilidade de uso da madeira de *P. taeda*, a qual pode ser destinada às indústrias laminadora, de serrados (madeira beneficiada), de MDF, de papel e celulose, e que pode inclusive ter seu resíduo aproveitamento como biomassa para geração de vapor e energia, põe a espécie em destaque no cenário econômico florestal nacional (VASQUES *et al.*, 2007; BOGNOLA *et al.*, 2008).

## 2.2 ASPECTOS DA CLONAGEM ASSOCIADA AO MELHORAMENTO E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE CONÍFERAS

Técnicas de propagação vegetativa são freqüentemente utilizadas de forma integrada a programas de melhoramento genético convencionais (LIBBY; AHUJA, 1993). As características de interesse comercial, assim como qualquer outra característica de uma planta, geralmente têm uma distribuição normal dentro de uma população e os programas de melhoramento buscam selecionar indivíduos excepcionais, que estejam nas extremidades da curva de distribuição (HANDLEY *et al.*, 1995). A clonagem propiciada pelas técnicas de propagação vegetativa possibilita produzir massivamente genótipos superiores selecionados. Um clone é definido pelo conjunto de organismos produzidos assexuadamente a partir de um único indivíduo parental (SALISBURY, 1992), constituindo um grupo de indivíduos geneticamente uniforme (TERMIGNONI, 2005). Com a clonagem associada ao melhoramento é possível utilizar-se tanto as porções aditivas quanto as não-aditivas

da variação genética de uma população, aumentando o ganho genético potencial (AMERSON *et al.*, 1985; LIBBY; AHUJA, 1993; HANDLEY *et al.*, 1995).

Programas de melhoramento genético convencionais de espécies florestais são dificultados pela altura dos indivíduos, que implica na dificuldade em manter o controle sobre processos de polinização e fecundação, e pela complexidade da análise dos descendentes após os cruzamentos e retrocruzamentos, bem como pela necessidade de uma grande área de plantio experimental (ATREE; FOWKE, 1995; STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003). O longo ciclo de vida necessário para as árvores atingirem a maturidade reprodutiva e fenotípica é apontado como o principal fator limitante do melhoramento; também são considerados obstáculos o restrito conhecimento dos mapas genéticos da maioria das espécies florestais e a dificuldade para a identificação de parentais adequados para os cruzamentos (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003).

Dentre os métodos convencionais de propagação vegetativa de coníferas, para a avaliação do desempenho de genótipos pela clonagem, está a enxertia, a qual, para muitas espécies é a única técnica disponível (ORDÁS *et al.*, 2007). Esta técnica, porém, está distante de ser um método ótimo, pois avaliar o mesmo clone em diferentes portas-enxerto comumente apresenta variabilidade, devido à interação enxerto – porta-enxerto; o uso de porta-enxerto clonado propiciaria uma avaliação mais confiável de cada clone (ORDÁS *et al.*, 2007). Fonseca *et al.* (1978), em trabalho com enxertia de *P. taeda*, verificaram variação de 6 a 90% de pegamento em função da compatibilidade da matriz e das condições climáticas durante o período para pegamento do enxerto. Verificaram também que o pegamento à campo tem menos sucesso do que sob condições controladas, porém condições controladas podem afetar o bom desenvolvimento das raízes. Além disso, os resultados com a técnica são fortemente influenciados pela época do ano em que são realizados (FONSECA *et al.*, 1978; MEHRA-PALTA *et al.*, 1978).

O enraizamento de estacas é amplamente utilizado em espécies de *Sequoia*, *Cryptomeria* e *Thuja*, e é possível para muitas espécies de *Pinus*. Porém, é notoriamente difícil para *Pinus taeda*, apresentando alta variabilidade conforme a procedência das estacas e declínio acentuado na porcentagem de sucesso logo nos primeiros meses de desenvolvimento de uma muda (FOSTER, 1990; WEIR; GOLDFARB, 1993; DIAZ-SALA *et al.*, 1996; SCHULTZ, 1997). A miniestaquia, a

qual pode ser considerada uma especialização da estaquia convencional, é apontada como alternativa para suprir a necessidade de resgate da juvenilidade de material vegetativo e incremento na multiplicação de propágulos (FERRIANI *et al.*, 2010). Atualmente, é a técnica mais utilizada para a clonagem de *Eucalyptus* no Brasil e vários estudos nacionais recentes apontam para a viabilidade do método para *P. taeda*, obtendo médias de 78 a 85% de sucesso de enraizamento sob as melhores condições (ALCANTARA *et al.*, 2007 e 2008; ANDREJOW; HIGA, 2009; FERRIANI *et al.*, 2010). Porém, a técnica é restrita à época do ano e ao estado fisiológico do explante (ANDREJOW; HIGA, 2009). Rocha e Niella (2002) recomendam a técnica como coadjuvante a um protocolo de micropropagação.

Protocolos de propagação vegetal baseados na cultura de tecidos *in vitro* (micropropagação) possuem grande potencial para a produção em larga escala de espécies florestais e integrar programas de melhoramento associados com a clonagem (HARRY; THORPE, 1994). Existem basicamente duas rotas para a micropropagação de coníferas: a embriogênese e organogênese (MOTT; AMERSON 1981). A embriogênese é a técnica de micropropagação mais promissora, com maior potencial teórico de produção do que qualquer outra técnica de propagação (GEORGE *et al.*, 2008). Com ela busca-se induzir em uma única etapa a formação de uma estrutura que possua tanto ápice caulinar quanto radicular a qual, ao reconstituir os estádios do desenvolvimento do embrião zigótico, pode desenvolver uma planta completa (GUERRA *et al.*, 1999). Apesar da embriogênese somática já ter sido demonstrada para inúmeros gêneros de coníferas como *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* e *Sequoia* (TAUTORUS *et al.*, 1991), para *P. taeda* as taxas de sobrevivência, formação de embriões somáticos e desenvolvimento em planta ainda são muito baixas, principalmente em genótipos comerciais (LI *et al.*, 1998; TANG, 2000; PULLMANN; JOHNSON, 2002; PARK *et al.*, 2006).

A segunda rota é a organogênese, que consiste de duas etapas, sendo a primeira de indução à formação de brotações e a segunda de indução ao enraizamento (MOTT; AMERSON, 1981). A organogênese é a abordagem mais empregada para a micropropagação de lenhosas com o propósito de clonagem, e é fortemente influenciada pelo genótipo, estado fisiológico do explante, idade do explante, condições ambientais (luz, temperatura e composição do meio de cultura) e, principalmente, pelas concentrações de reguladores vegetais (AHUJA, 1993).

Comumente a formação de brotações é induzida em meio de cultura enriquecido com citocinina e o enraizamento é induzido em meio enriquecido com auxina (AHUJA, 1993; WERBROUCK; DEBERGH, 1994; GUERRA *et al.*, 1999; GEORGE *et al.*, 2008).

Uma breve lista de espécies de coníferas para as quais já foi relatada a formação de brotações pela via organogenética inclui: *Araucaria angustifolia* (IRITANI, 1997), *Araucaria excelsa* (MAENE; DEBERGH, 1987), *Cupressus* spp. (THOMAS *et al.*, 1977), *Larix decidua* (BONGA, 1984), *Picea abies* (VON ARNOLD, 1982), *Picea glauca* (CAMPBELL; DURZAN, 1976), *Pinus radiata* (REILLY; WASHER, 1977; AITKEN *et al.*, 1981), *Pinus strobus* (KAUL, 1990), *Pseudotsuga menziessi* (CHENG, 1977; DUSTAN *et al.*, 1986) e *Sequoiadendron giganteum* (MONTEUUIS, 1991).

### 2.3 ORGANOGÊNESE DE *Pinus* spp E *Pinus taeda*

A organogênese é uma técnica de cultivo *in vitro* na qual há uma etapa de indução à formação de parte aérea, seguida de uma etapa de indução ao enraizamento adventício (MOTT; AMERSON, 1981; THORPE; KUMAR, 1993; SUGIYAMA, 1999). Existem duas vias para a formação de parte aérea: a adventícia (organogênese *de novo*) e a axilar (a partir de meristemas preexistentes) (WERBROUCH; DEBERGH, 1994).

Para Tang e Guo (2001) a organogênese é dita direta, quando a diferenciação das brotações adventícias ocorre diretamente sobre o fragmento de tecido, ou então indireta, quando ocorre formação prévia de massa celular indiferenciada (calo), sobre a qual podem se formar as brotações. A rota morfogênética predominantemente relatada para a formação de brotações adventícias em coníferas é a organogênese direta, sem o envolvimento de um estágio intermediário de calo (THORPE; BIONDI, 1984). A formação de novas brotações em coníferas também pode se dar a partir de gemas já formadas, como as gemas axilares e terminais, com as quais se costuma obter boa resposta de formação (CHALUPA, 1977).

George *et al.* (2008) restringiram o termo organogênese para culturas *in vitro* nas quais há processo de formação *de novo* de órgãos, tanto diretamente quanto sobre fragmentos de tecido (explante), quanto indiretamente, a partir de culturas

desorganizadas e desdiferenciadas de células. George *et al.* (2008) separaram, portanto, as técnicas que visam a produção adventícia de brotações das técnicas nas quais os explantes já possuem estruturas teciduais organizadas comprometidas com a formação e/ ou manutenção de determinado órgão. Por este motivo, seguindo a nomenclatura proposta por George *et al.* (2008), adotou-se no presente trabalho a subdivisão de termos entre organogênese e multiplicação por meio de gemas axilares, para classificar os procedimentos utilizados para a produção de brotações múltiplas, embora seja possível ter ocorrido tanto a formação de brotações axilares a partir de gemas pré-existentes na etapa que foi chamada de organogênese, quanto a formação de brotações adventícias na etapa chamada de multiplicação de brotações axilares.

É conhecida a recalcitrância de coníferas em geral e, especificamente, do gênero *Pinus* na propagação *in vitro* (TAUTORUS, 1991; HARRY; THORPE, 1994). No entanto, devido à grande importância econômica do gênero, há grande número de trabalhos relatando a proposição e aprimoramento de protocolos de micropropagação para *Pinus* spp. Nas espécies de *Pinus*, brotações axilares geralmente se originam de meristemas quiescentes pré-existentes, como os localizados na face adaxial de acículas juvenis, nas axilas dos cotilédones, no centro do fascículo de um braquiblasto, e na face adaxial de escamas de acículas maduras (ROCHA; NIELLA, 2002).

O primeiro relato de regeneração bem sucedida de plântulas de *Pinus* a partir da cultura de tecidos, pela via organogenética, é de Sommer *et al.* (1975), para *Pinus palustris* e, desde então, foram realizados trabalhos com várias espécies. A organogênese direta já foi relatada para *P. radiata* (REILLY; WASHER, 1977), *P. contorta* (VON ARNOLD; ERIKSSON, 1981), *P. sylvestris* (ZEL *et al.*, 1988), *P. caribaea*, *P. oocarpa*, *P. tecunumanii* (BAXTER *et al.*, 1989), *P. strobus* (KAUL, 1990), *P. virginiana* (CHANG *et al.*, 1991; JANG; TAINTER, 1991), *P. echinata* (JANG; TAINTER, 1991), *P. halepensis* (LAMBARDI *et al.*, 1993), *P. pinea* (GARCÍA-FÉRRIZ *et al.*, 1994), *P. kesiya* (NANDWANI *et al.*, 2001), *P. massoniana* (ZHANG *et al.*, 2006), *P. roxburghii* (PARASHARAMI *et al.*, 2006), *P. armandii* (ISHII *et al.*, 2007) e *P. pinaster* (ÁLVAREZ *et al.*, 2009) dentre outras espécies e trabalhos. A organogênese indireta também já foi observada para o gênero, como observado, por



exemplo, para *P. eldarica* (WAGLEY *et al.*, 1987) e *P. elliottii* (TANG; NEWTON, 2007).

A organogênese direta de *Pinus taeda* já foi relatada em artigos científicos por: Amerson *et al.* (1985), Jang e Tainter (1991) e Tang e Guo (2001), e a organogênese indireta foi obtida por Tang e Ouyang (1999), Tang *et al.* (1998) e Tang (2000), tendo como explantes mais frequentes embriões zigóticos maduros e cotilédones, mas também relatando a formação de brotações axilares e fasciculares em explantes mais maduros.

Um fator crítico para a formação de novas brotações a partir de explantes *in vitro* é a fonte de material vegetal a ser utilizada, e os melhores resultados frequentemente são obtidos com material juvenil ou rejuvenescido. Ápices caulinares, acículas, hipocótilos, epicótilos, cotilédones, embriões zigóticos, gemas dormentes, feixes de acículas e gemas laterais podem ser utilizados como explantes para a indução de brotações em coníferas (THORPE; BIONDI, 1984). De maneira geral, quanto mais juvenil ou rejuvenescido for o tecido doador de explantes e quanto mais meristemática for sua condição fisiológica, maiores serão as possibilidades do controle da morfogênese *in vitro* (GUERRA *et al.*, 1999).

Os explantes mais utilizados para a organogênese de *Pinus* spp são os juvenis, como embriões zigóticos maduros (SOMMER *et al.*, 1975; CHANG *et al.*, 1991; PARASHARAMI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; HARGREAVES; MENZIES, 2007; ISHII *et al.*, 2007; TANG; NEWTON, 2007; ÁLVAREZ *et al.*, 2009), cotilédones e hipocótilos (AITKEN-CHRISTIE *et al.*, 1985; JANG; TAINTER, 1991; LAMBARDI *et al.*, 1993; GARCÍA-FÉRRIZ *et al.*, 1994; TANG; GUO, 2001), brotações apicais de plântulas (WAGLEY *et al.*, 1987; ZEL *et al.*, 1988; KAUL, 1990; NANDWANI *et al.*, 2001) e epicótilos e brotações axilares intercotiledonares (BAXTER *et al.*, 1989).

A composição do meio de cultura e as condições de cultivo são de igual importância ao estado fisiológico do explante para a manipulação do crescimento e desenvolvimento organizado (THORPE; KUMAR, 1993). Existem diversas formulações de meio de cultura relatadas na literatura, as quais variam quanto à composição salina, concentrações e fontes de carboidratos e nitrogênio reduzido, bem como de reguladores vegetais, e cada formulação pode proporcionar diferentes respostas morfogenéticas (THORPE; KUMAR, 1993). Cada espécie possui requerimentos próprios de macro e micronutrientes presentes nas concentrações

salinas dos meios de cultura e uma composição inadequada pode aumentar o estresse dos tecidos, causar sintomas de deficiência ou toxicidade, favorecer a produção de compostos fenólicos, podendo culminar na necrose dos explantes (BONGA; Von ADERKAS, 1992; PREECE, 1995).

Além dos sais inorgânicos, as formulações possuem fontes de carbono, e a fonte mais comumente utilizada é a sacarose, porém outros carboidratos, como frutose e amido, também podem ser utilizados (GEORGE *et al.*, 2008). O hexitol mio-inositol é considerado importante em cultura de tecidos vegetais e relata-se que pode atuar como fonte de carboidrato e ter ação semelhante a de vitaminas (SMITH, 2000; GEORGE *et al.*, 2008).

Harry e Thorpe (1994) citaram que várias formulações de meio de cultura são comumente utilizadas para organogênese de espécies de *Pinus*, como os meios GD (GRESSHOFF; DOY, 1972), DCR (GUPTA; DURZAN, 1985), SH (SHENK; HILDEBRANDT, 1972), LP (VON ARNOLD; ERIKSSON, 1981), Litvay (LITVAY *et al.*, 1981) e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Para *P. taeda*, o meio de cultura mais citado é o GD, em sua formulação original ou em sua formulação modificada por Mehra-Palta *et al.* (1978). Coke (1996a; 1996b) propôs as formulações WV<sub>3</sub> e WV<sub>5</sub>, como sendo adequadas especificamente para *Pinus taeda* e podendo ser utilizadas com sucesso para outras coníferas. Rocha e Niella (2002) obtiveram formação de brotações adventícias em cotilédones de *P. taeda* com o uso da formulação WV<sub>5</sub> de Coke (1996a). Tang *et al.* (1998) propuseram o meio de cultura TE em um protocolo de organogênese indireta a partir de embriões zigóticos maduros de *Pinus taeda*.

Com relação aos reguladores vegetais, sua ação relaciona-se com os padrões apontados pelos estudos de Skoog e Miller na década de 1950, os quais indicaram que maiores proporções de citocininas favorecem a formação de parte aérea, enquanto que balanços favoráveis às auxinas promovem a rizogênese (GUERRA *et al.*, 1999). Apesar da influência dos reguladores vegetais na diferenciação de tecido em cultura já ter sido diversas vezes demonstrada, o exato papel em cada etapa nos processos morfogenéticos é complexo de ser determinado, pois cada classe de reguladores tem um amplo espectro de atuação, e existem numerosos relatos nos quais o tipo de morfogênese observada foi diferente ou mesmo oposta à esperada (AHUJA, 1993). Os níveis endógenos de reguladores do

tecido em cultura não podem ser desconsiderados, pois interagem com os reguladores aplicados exogenamente (GEORGE *et al.*, 2008).

Para a obtenção de brotações múltiplas de *Pinus taeda*, Mehra-Palta *et al.* (1978) testaram as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZEA), cinetina (CIN) e 2-isopentenil adenina (2-iP), obtendo melhores resultados com BAP e ZEA, principalmente quando em combinação com baixas concentrações da auxina ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA).

Mott e Amerson (1981) recomendaram o uso de 44,0  $\mu$ M de BAP pelo período de duas semanas em meio GD (GRESHOFF; DOY, 1972), seguido de subcultivo para mesmo meio sem reguladores, para a indução de brotações adventícias em *P. taeda*. O uso de outros reguladores vegetais na organogênese de *P. taeda* é relatado no trabalho de Tang e Ouyang (1999), que obtiveram plântulas regeneradas por organogênese indireta a partir de embriões zigóticos maduros de *P. taeda*, com o uso de ácido indolbutírico (AIB) e BAP na indução de brotações e de ácido giberélico para a formação de raízes.

Para o alongamento das brotações obtidas, é necessário o subcultivo para meio de cultura desprovido ou com menor concentração de citocininas e isolamento de cada brotação do explante original, para evitar a dominância de uma única brotação sobre as outras (WERBROUCK; DEBERGH, 1994). Outras abordagens que podem ser feitas para promover o alongamento são a mudança de uma citocinina forte, como BAP, para outras mais fracas, como CIN e 2-iP (GEORGE *et al.*, 2008) ou o subcultivo dos explantes para meio acrescido de carvão ativado (MOTT; AMERSON, 1981).

A ação promotora do carvão ativado no alongamento de brotações pode estar relacionada à adsorção de compostos como metabólitos tóxicos, compostos fenólicos e reguladores vegetais, ou mesmo à liberação gradual e lenta de substâncias orgânicas promotoras (PAN; STADEN, 1998; THOMAS, 2008). O modo como o carvão ativado atua na liberação de compostos, tornando-os novamente disponíveis às plantas, ainda é pouco esclarecido (THOMAS, 2008).

Quanto às auxinas, são acrescidas ao meio de cultura principalmente com o objetivo de promover o enraizamento adventício, bem como para aumentar as taxas de crescimento, quando em baixas concentrações (FRANKLIN; DIXON, 1994). As concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) utilizadas para o enraizamento

variam entre 0,2 a 2  $\mu$ M, podendo ser testado sozinho ou em combinação com outras auxinas (BONGA; Von ADERKAS, 1992). O ANA é um análogo sintético do ácido indolacético (AIA) e possui maior estabilidade *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008).

Os maiores desafios no desenvolvimento de protocolos de organogênese para o gênero *Pinus* são os relacionados ao enraizamento das brotações depois de formadas. *Pinus taeda* é uma espécie na qual se tem grande dificuldade para o enraizamento adventício (FOSTER, 1990), motivo pelo qual a eficiência dos protocolos ainda é baixa, especialmente nos cultivares comerciais.

As causas prováveis para a dificuldade de enraizamento são as mudanças devidas à maturação, que são bastante pronunciadas em coníferas (GREENWOOD; HUTCHISON, 1993) e o declínio no enraizamento adventício é um dos eventos mais frequentes ao longo da maturação (MURRAY *et al.*, 1994). Diaz-Sala *et al.* (1996) relataram que em *P. taeda* a queda na porcentagem de enraizamento com a maturação do explante é bastante abrupta. Greenwood e Weir (1995) relataram que estacas de *P. taeda* obtidas a partir de plantas de um a dois anos de idade apresentaram uma marcante redução na competência ao enraizamento quando comparadas com estacas de hipocótilos de plantas de 20 a 25 dias de idade.

Outra característica das respostas de enraizamento adventício para *Pinus taeda* é a forte influência do genótipo da família de origem do material vegetal, que parece exercer mais variações nas porcentagens de enraizamento do que os tratamentos com auxinas (FOSTER, 1990; WISE; CALDWELL, 1992). Mehra-Palta *et al.* (1978), propuseram a adição de baixas concentrações da citocinina BAP ao meio de cultura de enraizamento com auxina, obtendo maior sucesso do que com o uso apenas de auxina.

A aclimatização é a etapa final do processo, por meio da qual se prepara a planta obtida *in vitro* para as condições ambientais que serão encontradas à campo (GEORGE *et al.*, 2008). A transição do ambiente *in vitro* para o ambiente externo é bastante crítica para a sobrevivência das plantas micropropagadas (AHUJA, 1993). *In vitro*, a umidade relativa é praticamente 100% e as plantas estão vivendo em condições heterotróficas, com baixa atividade fotossintética e sendo supridas de sais e carboidratos (HARTMANN *et al.*, 2011). Usualmente, faz-se necessária a transferência das plantas micropropagadas para casa-de-vegetação, com irrigação abundante e/ou proteção da parte aérea com sacos plásticos, antes do plantio a

campo, pois as condições de umidade relativa precisam ser diminuídas gradualmente, para permitir o espessamento da cutícula nas folhas, para o desenvolvimento do sistema radicial e para que as plantas se tornem fotossinteticamente ativas (AHUJA, 1993; HAZARIKA, 2006).

A sobrevivência de plantas aclimatizadas é uma etapa crucial para que os ganhos de produção com o uso de técnicas de cultivo *in vitro* sejam efetivos (GEORGE *et al.*, 2008).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba-Paraná (PR).

#### 3.1 COLETA DAS SEMENTES

Foram utilizadas sementes de famílias selecionadas (F27 e B05) e sementes do pomar comercial coletadas de fazenda da Empresa Battistella Florestal, localizada no município de Rio Negrinho, Estado de Santa Catarina.

Cada família representa as sementes vindas de uma árvore selecionada, na proporção de 1:10.000, de primeira geração de seleção. O pomar comercial (Pomar São Pedro – PC) é constituído de 129 árvores (famílias) selecionadas. Estas 129 famílias são classificadas em um *ranking*, o qual leva em consideração características fenotípicas e genotípicas relacionadas à qualidade do fuste. As variáveis analisadas para a elaboração do *ranking* foram: volume, sanidade, conicidade, retidão, diâmetro e ângulo dos galhos, distância internódios e quantidade de galhos. Com as dez melhores famílias, realizou-se cruzamento controlado, com isolamento dos estróbilos femininos e injeção de pólen beneficiado.

Quanto aos genótipos utilizados no presente trabalho, a família F27 é a segunda melhor família do *ranking* da Empresa e a família B05 está na 41ª colocação no mesmo *ranking*. As sementes da família F27 foram, portanto, originadas de polinização controlada, de origem materna e paterna. As sementes da família B05 são de polinização aberta, com controle apenas da origem materna. Também foram utilizadas sementes do pomar comercial (PC), as quais constituíram

de uma mistura de sementes das 129 famílias selecionadas da Empresa, obtidas por polinização aberta.

As sementes utilizadas foram provenientes de coletas realizadas no verão, em janeiro de 2009 e 2010 e foram mantidas em sacos plásticos e armazenadas em refrigeração a 5°C, pelo período de um a cinco meses.

### 3.2 SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Pinus taeda*

Para a superação da dormência, realizou-se embebição das sementes em água destilada, durante 24 horas, na ausência de luz e em temperatura ambiente. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em placas de Petri (100 X 20 mm) contendo papel filtro umedecido e mantidas sob refrigeração (5°C) durante 25 dias.

Para a germinação, as sementes foram retiradas do refrigerador, colocadas em novas placas de Petri com papel filtro umedecido, e levadas à sala de crescimento, com condições controladas conforme item 3.3.

Foi considerada germinada a semente que apresentava emissão da radícula de 0,1 cm de comprimento. Utilizou-se oito placas, contendo 40 sementes cada, tanto na superação da dormência quanto na germinação.

### 3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27°C ± 2°C durante o dia e 18°C ± 2°C durante a noite, e iluminação com lâmpadas fluorescentes brancas com intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8 com NaOH e/ ou HCl a 0,1 N, antes da adição de 5,6 g.L<sup>-1</sup> de ágar Himedia® e da esterilização a 121°C durante 20 minutos.

Foram utilizados tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura para a etapa de indução de brotações. Foram utilizados frascos de vidro com dimensões de 125 mm de altura e 65 mm de diâmetro para as etapas de multiplicação e enraizamento. Os frascos foram vedados com tampas plásticas e continham 40 mL de meio de cultura.

Para as etapas de indução de brotações múltiplas, utilizou-se sacarose na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup>. Para os experimentos de enraizamento também foram utilizadas formulações com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose bem como desprovidas deste carboidrato.

### 3.4 ORGANOGÊNESE

#### 3.4.1 Brotações apicais obtidas de plântulas com cinco dias de germinação

Sementes germinadas das famílias selecionadas F27 e B05 e do pomar comercial (PC) (FIGURA 1 A) tiveram seus tegumentos removidos com o auxílio de pinças, em capela de fluxo laminar, mantendo os megagametófitos e as radículas, as quais tinham em média 0,8 cm de comprimento.

Para a desinfestação, primeiramente realizou-se imersão das sementes germinadas em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30% durante 20 minutos com agitação manual. Logo em seguida, e sem enxágüe, as sementes germinadas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 6%, acrescida de 0,1% de Tween 20<sup>®</sup>, durante dez minutos com agitação manual. Foram efetuados três enxágües com água destilada esterilizada. As sementes foram então imersas em solução de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) a 0,05%, acrescida de Tween 20<sup>®</sup> a 0,1%, durante cinco minutos em agitação manual. Ao término deste procedimento, realizaram-se seis enxágües em água destilada esterilizada.

Após a desinfestação, foram removidos os megagametófitos e as radículas, para a excisão dos explantes. Os explantes foram então colocados, na posição vertical, em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura de indução de brotações.

##### 3.4.1.1 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WV<sub>5</sub>

Brotações apicais de plântulas das famílias F27, B05 e de pomar comercial, com cerca de 0,8 cm de comprimento e seis cotilédones em média foram colocadas em meio de cultura WV<sub>5</sub> (COKE, 1996a), contendo 0; 11; 22 ou 44 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), acrescido de 0,05 μM de ácido naftalenoacético (ANA) durante 14 dias.

Após esse período, os explantes foram subcultivados duas vezes consecutivas para meio WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais e cada subcultivo teve duração de quatro semanas.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e unidade experimental de dez explantes.

#### 3.4.1.2 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WPM

Brotações apicais com cerca de 0,8 cm de comprimento e seis cotilédones em média oriundas de plântulas das famílias F27, B05 e de pomar comercial (FIGURAS 1B e 1C), foram colocadas em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com 0; 11; 22 de BAP sem adição de auxina, ou com 44  $\mu$ M de BAP combinado com 0,5 ou 0,75  $\mu$ M de ANA, pelo período de 14 dias.

Em seguida, os explantes foram subcultivados duas vezes meio WPM sem a adição de reguladores vegetais. Cada subcultivo teve duração de quatro semanas.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e unidade experimental de dez explantes.

#### 3.4.2 Brotações apicais obtidas de plântulas com dez dias de germinação

Plântulas originadas de sementes da família F27, aos dez dias de germinação, com comprimento total de 8,0 cm em média, tiveram seus cotilédones seccionados, mantendo cerca de 1/3 do seu comprimento original, e a radícula retirada, de modo a obter-se um explante com cerca de 3,0 cm de comprimento total (FIGURAS 1D, 1E e 1F).

A desinfestação foi realizada primeiramente com solução de HgCl<sub>2</sub> (0,05%, com 0,1% Tween<sup>®</sup> 20) durante dez minutos em agitação manual, seguida de três enxágues com água destilada esterilizada. Posteriormente, fez-se a desinfestação com solução de NaOCl (1%, acrescida de 0,1% Tween<sup>®</sup> 20) durante 15 minutos em agitação manual, seguida de seis enxágues com água destilada esterilizada. Após a desinfestação, os explantes foram introduzidos na posição vertical em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem reguladores, no qual permaneceram por 14 dias.

Após este período, os explantes tiveram seus hipocótilos novamente seccionado, ficando com comprimento médio de 1,5 cm, e foram colocados em meio



WV<sub>5</sub> suplementado com 33 ou 44 µM de BAP em combinação com 0,05 µM ANA para indução de brotações múltiplas.

A permanência dos explantes em meio de cultura WV<sub>5</sub> com reguladores foi de 14 dias, seguida de um subcultivo para meio WV<sub>5</sub> sem a adição de reguladores vegetais e acrescido de 0,5% de carvão ativado durante seis semanas. Foram realizados mais dois subcultivos para meio WV<sub>5</sub> sem carvão e sem reguladores, ambos pelo período de seis semanas.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e unidade experimental de 20 explantes.

### **3.4.3 Variáveis avaliadas**

Os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de sobrevivência, porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante, porcentagem de necrose e porcentagem de contaminação bacteriana e/ou fúngica, ao término de cada subcultivo.

## **3.5 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES A PARTIR DE GEMAS AXILARES**

Brotações de *Pinus taeda* obtidas após a indução foram alongadas em meio de cultura WV<sub>5</sub> sem reguladores, com ou sem carvão ativado (0,5%), por no mínimo dois subcultivos, durante no mínimo oito semanas, somando-se os períodos dos subcultivos (FIGURAS 4A e 4B). As brotações foram então seccionadas e padronizadas, em segmentos nodais e brotações apicais de diversos comprimentos, e inoculadas em formulações de meio de cultura visando a multiplicação a partir de suas gemas axilares.

### **3.5.1 Segmentos nodais**

#### **3.5.1.1 Experimento I**

Brotações obtidas da família F27 foram seccionadas em segmentos nodais de diferentes comprimentos (1,0 a 1,9 cm; 2,0 a 2,9 cm; 3,0 a 4,0 cm), os quais foram cultivados em meio de cultura WV<sub>5</sub>, com 0,1 µM de BAP durante quatro semanas e depois subcultivados para meio WV<sub>5</sub> sem reguladores por oito semanas. Foram

realizadas duas avaliações, após quatro e oito semanas de subcultivo para meio sem reguladores, para comparação de períodos de duração de subcultivo.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2 (classes de tamanho x períodos de duração de subcultivo), com três repetições e unidade experimental de 15 explantes.

#### 3.5.1.2 Experimento II

Segmentos nodais de 1,0 cm, oriundos de duas famílias selecionadas (F27, B05) e de pomar comercial, foram cultivados em meio  $WV_5$ , com três concentrações de BAP (0,25; 0,5; 2,5  $\mu$ M) durante oito semanas.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 3 (famílias x concentrações de BAP), com quatro repetições e unidade experimental de dez explantes.

#### 3.5.1.3 Experimento III

Segmentos nodais de 1,0 cm foram cultivados nos meios  $WV_5$  e GDm (Mehra-Palta *et al.*, 1978), acrescidos de três concentrações de BAP (1, 2 ou 4  $\mu$ M) durante oito semanas. Todos os tratamentos possuíam explantes oriundos de brotações alongadas das famílias F27 e B05 e do pomar comercial.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3 (meios de cultura x concentrações de BAP), com três repetições e unidade experimental de 15 explantes.

### 3.5.2 Brotações apicais

#### 3.5.2.1 Experimento I

Brotações apicais com três comprimentos (0,5; 1,0 e 2,0 cm), oriundas da família F27, foram cultivadas em dois diferentes meios de cultura ( $WV_5$  e GDm), sem adição de reguladores vegetais, durante oito semanas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2 (comprimento x meio de cultura), com quatro repetições e unidade experimental de 15 explantes.

### 3.5.2.2 Experimento II

Brotações apicais de dois comprimentos diferentes (0,5 e 1,0cm), oriundas da família F27, foram submetidas a três diferentes concentrações de BAP (0,5; 1,0 ou 2,0  $\mu\text{M}$ ), em meio de cultura  $\text{WV}_5$ , durante oito semanas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3 (comprimento x concentração de BAP), com quatro repetições e unidade experimental de 15 explantes.

### 3.5.2.3 Experimento III

Brotações apicais de 1,0 cm, pertencentes à família F27, foram cultivadas em meio  $\text{WV}_5$  com concentrações de 1, 2 ou 4  $\mu\text{M}$  de BAP, num período total de oito semanas, sendo avaliadas após quatro e oito semanas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2 (concentração de BAP x período de cultivo – quatro e oito semanas), com três repetições e unidade experimental de 15 explantes.

### 3.5.3 Variáveis avaliadas

Nos experimentos de multiplicação realizou-se avaliação das variáveis porcentagem de explantes com brotações axilares, número médio de brotações por explante, porcentagem de alongamento e porcentagem de necrose, após quatro e/ou oito semanas de subcultivo.

## 3.6 ENRAIZAMENTO *in vitro*

Após período de no mínimo oito semanas em meio de cultura  $\text{WV}_5$  sem reguladores, brotações apicais foram padronizadas em 1,5 cm de comprimento, com corte reto da base, e submetidas a tratamentos para indução da formação de raízes adventícias.

### 3.6.1 Experimento I

Brotações originadas da família F27 foram submetidas à indução ao enraizamento por nove dias, em quatro formulações de meio de cultura,  $\text{WV}_5$ ,  $\text{WV}_3$  (COKE, 1996b), GDM, ou água destilada gelificada com ágar (ágar-água ou AA), nas quais se adicionou 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP (MEHRA-PALTA *et al.*,

1978). Os meios WV<sub>5</sub>, WV<sub>3</sub>, GDm tiveram a concentração de sais reduzida à metade e foram acrescidos de 20,0 gL<sup>-1</sup> de sacarose. No meio ágar-água, não houve adição de sacarose.

Após a indução, os explantes foram subcultivados para suas respectivas formulações desprovidas de reguladores vegetais, exceto os explantes induzidos em AA, os quais foram subcultivados para GDm/2 com 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e unidade experimental de dez explantes.

### **3.6.2 Experimento II**

Brotações originadas das famílias F27, B05 e do pomar comercial foram submetidas à indução ao enraizamento, com nove dias de duração, em meios GDm/2 e ágar-água em combinação com 0 ou 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose, acrescidos de 2,68 µM de ANA e 0,44 µM de BAP.

A indução ao enraizamento foi seguida de subcultivo de todos os explantes para meio GDm/2 acrescido de 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose, sem reguladores vegetais. Todos os tratamentos possuíam explantes de todos os genótipos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 (meio de cultura x concentração de sacarose) com quatro repetições e unidade experimental de 12 explantes.

### **3.6.3 Variáveis avaliadas**

Nos experimentos de enraizamento, os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de enraizamento, número médio de raízes por explante, comprimento médio das raízes, porcentagem de formação de calo e porcentagem de necrose, após duas e seis semanas.

## **3.7 ACLIMATIZAÇÃO**

Foram realizadas três aclimatizações, sendo que as duas primeiras foram realizadas no período do inverno de 2010 e a terceira ocorreu durante a primavera de 2010.

Mudas enraizadas foram retiradas do meio de cultura, tiveram suas raízes lavadas em água corrente até a remoção completa do ágar e foram então plantadas em substrato.

Inicialmente, mudas enraizadas da família F27 foram transferidas para sacos plásticos (12 x 5 cm) contendo cerca de 70 cm<sup>3</sup> de substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> Florestal SFA e levadas diretamente à casa de vegetação, com iluminação natural, temperatura mínima de 18°C ± 3°C e máxima de 35°C ± 4°C, com nebulização duas vezes ao dia.

Outras mudas das famílias F27, B05 e pomar comercial, antes de serem levadas à casa de vegetação, passaram pelo período de quatro semanas em frasco (125 x 65 mm) aberto contendo 70 cm<sup>3</sup> de substrato Plantmax<sup>®</sup>, em sala de crescimento, nas mesmas condições ambientais do cultivo em meio de cultura.

Outro procedimento de aclimatização também foi realizado com mudas da família F27, transferindo-as primeiramente para frascos com 70 cm<sup>3</sup> de vermiculita expandida de granulometria média e Plantmax<sup>®</sup> (na proporção de 1:1) e mantendo-as em sala de crescimento durante três semanas. Os frascos foram vedados com plástico filme durante os dez primeiros dias de aclimatização e depois abertos até completar-se o período de três semanas. Após, as mudas foram levadas à casa de vegetação, onde foram acomodadas em sacos plásticos 12 x 5 cm contendo 70 cm<sup>3</sup> de vermiculita e Plantmax<sup>®</sup> na proporção de 1:1.

Em todos os procedimentos de aclimatização, as mudas foram borrifadas com solução de fungicida Cercobim a 0,1% duas vezes por semana. Nos procedimentos com as mudas em frascos, em sala de crescimento, as plantas foram regadas com água da torneira em dias alternados, devido ao fato dos frascos não possuírem sistema de drenagem. Na casa de vegetação, houve nebulização a cada 4 horas (seis vezes ao dia).

As mudas foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência após dez, 20, 30 e 40 dias contados a partir da data de remoção das mudas do meio de cultura com ágar.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizados. A homogeneidade das variâncias foi verificada com o Teste de Bartlett a 5% de

probabilidade. Variáveis com variâncias não homogêneas foram transformadas por  $\log(X + 10)$  ou  $[\log(X + 10)]^{1/2}$ . Foi realizada análise das variâncias (ANOVA) e comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Experimentos com delineamento fatorial foram testados quanto à interação de fatores pelo Teste F de Fisher a 1% de probabilidade.

As análises foram feitas com auxílio dos programas MSTAT-C® e Microsoft Excel 2003.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

O período de 24h de embebição seguido de estratificação por 25 dias foi eficiente na superação da dormência das sementes. O início da germinação se deu em dois ou três dias, ocorrendo variação da porcentagem e do tempo de germinação conforme a família de origem das sementes (TABELA 1).

A família F27 apresentou 99,4% de germinação em cinco dias enquanto nas demais famílias a porcentagem no mesmo período foi de 18,3% (família B05) e de 34,3% (pomar comercial) (TABELA 1).

A família B05 apresentou germinação mais lenta, com 57,6% das sementes germinadas após 30 dias (TABELA 1). O tempo de armazenamento das sementes pode ter influenciado os resultados, porém estudos preliminares já apontavam para diferenças na germinação entre diferentes genótipos mesmo em condições de armazenamento similares (dados não mostrados).

TABELA 1 – GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE FAMÍLIAS SELECIONADAS E POMAR COMERCIAL (PC) DE *Pinus taeda* FORNECIDAS PELA EMPRESA BATTISTELLA FLORESTAL, LOCALIZADA EM RIO NEGRINHO (SC), APÓS 25 DIAS DE TRATAMENTO DE ESTRATIFICAÇÃO PARA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA.

| Família | Início da germinação (dias) | Germinação (%) |             |             |             |
|---------|-----------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
|         |                             | 5 dias         | 7 dias      | 14 dias     | 30 dias     |
| F27     | 3                           | 99,4 ± 1,2     | 100,0 ± 0,0 | ---         | ---         |
| B05     | 2                           | 18,3 ± 24,8    | 27,1 ± 26,1 | 35,1 ± 14,4 | 57,6 ± 25,0 |
| PC      | 3                           | 34,3 ± 13,2    | 42,8 ± 11,8 | 57,1 ± 11,6 | 100,0 ± 0,0 |

## 4.2 ORGANOGÊNESE

### 4.2.1 Brotações apicais obtidas de plântulas de cinco dias de germinação

Avaliando-se a sobrevivência dos explantes e a contaminação bacteriana e/ou fúngica ocorrida durante o período de duas semanas em meios de indução à formação de brotações WV<sub>5</sub> e WPM, verificou-se que a desinfestação com imersão em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% - 20 min), seguida de imersão em NaOCl (6% + 0,1% Tween 20<sup>®</sup> - 10 min) e de imersão em HgCl<sub>2</sub> (0,05% + 0,1% Tween 20<sup>®</sup> - 5 min) resultou em 76,5% de sobrevivência dos explantes e 23,5% de contaminação microbiana, predominantemente bacteriana.

#### 4.2.1.1 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WV<sub>5</sub>

A formação de brotações múltiplas (adventícias e/ou axilares) foi observada no primeiro subcultivo em meio de cultura sem reguladores vegetais, apenas nos explantes previamente induzidos com 44 µM de BAP e 0,05 µM de ANA (TABELA 2; FIGURA 2A).

No segundo subcultivo para meio sem reguladores foram observadas brotações também nos explantes vindos de indução em WV<sub>5</sub> com 0 e 22 µM de BAP em combinação com 0,05 µM de ANA, em 16,7 e 33,33% dos explantes, respectivamente (TABELA 2). A porcentagem de formação de brotações em explantes vindos do tratamento de indução com 44 µM de BAP e 0,05 µM de ANA também foi superior aos demais tratamentos no segundo subcultivo (37,5%). No entanto, diminuiu em relação ao observado no primeiro subcultivo (50,0%), devido à ocorrência de necrose (TABELA 2; FIGURA 2B).

As brotações múltiplas se formaram principalmente sobre os cotilédones, em toda sua superfície ou restritas à região apical dos mesmos (FIGURAS 2A e 2B), e também se formaram no hipocótilo, proximamente à região basal dos cotilédones. Houve alongamento das brotações durante o segundo subcultivo.

O maior número médio de brotações por explante foi de 4,8 (TABELA 2), obtido com a combinação de 44 µM de BAP e 0,05 µM de ANA, no segundo subcultivo em meio sem regulador vegetal

Verificou-se elevada porcentagem de necrose, a qual aumentou no segundo subcultivo, sobretudo nos explantes que haviam sido induzidos em meio de cultura sem BAP e com 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA (TABELA 2).

TABELA 2 – FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES OBTIDOS DE PLÂNTULAS DE CINCO DIAS DE GERMINAÇÃO DAS FAMÍLIAS F27, B05 E DE POMAR COMERCIAL DE *Pinus taeda*, APÓS DUAS SEMANAS DE INDUÇÃO EM MEIO WV<sub>5</sub> COM CONCENTRAÇÕES DE BAP E ANA, SEGUIDA DE DOIS SUBCULTIVOS DE QUATRO SEMANAS CADA, PARA MEIO WV<sub>5</sub> SEM REGULADORES

| Reguladores na indução ( $\mu\text{M}$ ) | Explantes c/ brotações (%)       |                                  | Número médio de brotações/ explante |                                | Necrose (%)         |                     |
|--|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
|  | 1 <sup>o</sup> subc              | 2 <sup>o</sup> subc              | 1 <sup>o</sup> subc                 | 2 <sup>o</sup> subc            | 1 <sup>o</sup> subc | 2 <sup>o</sup> subc |
|  | 4 sem-s/ regs                    | 4 sem-s/ regs                    | 4 sem-s/ regs                       | 4 sem-s/ regs                  | 4 sem-s/ regs       | 4 sem-s/ regs       |
| 0 BAP                                    |                                  |                                  |                                     |                                |                     |                     |
| 0,05 ANA                                 | 0,0 $\pm$ 0,0                    | 16,7 $\pm$ 23,6                  | 0,0 $\pm$ 0,0                       | 1,0 $\pm$ 0,0                  | 50,0 $\pm$ 23,6     | 83,3 $\pm$ 23,6     |
| 11 BAP                                   |                                  |                                  |                                     |                                |                     |                     |
| 0,05 ANA                                 | 0,0 $\pm$ 0,0                    | 0,0 $\pm$ 0,0                    | 0,0 $\pm$ 0,0                       | 0,0 $\pm$ 0,0                  | 35,7 $\pm$ 10,1     | 52,4 $\pm$ 26,9     |
| 22 BAP                                   |                                  |                                  |                                     |                                |                     |                     |
| 0,05 ANA                                 | 0,0 $\pm$ 0,0                    | 33,3 $\pm$ 0,0                   | 0,0 $\pm$ 0,0                       | 3,0 $\pm$ 0,0                  | 16,7 $\pm$ 23,6     | 50,0 $\pm$ 23,6     |
| 44 BAP                                   |                                  |                                  |                                     |                                |                     |                     |
| 0,05 ANA                                 | <b>50,0 <math>\pm</math>17,7</b> | <b>37,5 <math>\pm</math>17,7</b> | 3,0 $\pm$ 1,2                       | <b>4,8 <math>\pm</math>2,1</b> | 37,5 $\pm$ 17,7     | 50,0 $\pm$ 35,4     |

\* Subc = subcultivo, Regs = reguladores vegetais, Sem = semanas.

#### 4.4.1.2 Indução de brotações múltiplas em meio de cultura WPM

A formação de brotações em meio de cultura WPM ocorreu no primeiro subcultivo dos explantes de todos os tratamentos, exceto da testemunha (TABELA 3; FIGURA 2C). No segundo subcultivo, foi observada formação de brotações em todos os tratamentos, sendo de 3,3% para a testemunha, cerca de 15% para os tratamentos de 11 e 22  $\mu\text{M}$  de BAP e de cerca de 30% para os tratamentos com 44  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com 0,5 ou 0,75  $\mu\text{M}$  de ANA (TABELA 3).

O maior número médio de brotações por explante (5,7) foi observado no primeiro subcultivo sem regulador vegetal nos explantes induzidos em meio WPM contendo 44  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,75  $\mu\text{M}$  de ANA (TABELA 3). No segundo subcultivo, esse valor se reduziu para 3,8, devido à ocorrência de necrose das brotações (TABELA 3).

As brotações se formaram sobre os cotilédones e hipocótilos de modo semelhante ao observado na indução em meio WV<sub>5</sub>. As brotações múltiplas obtidas em meio de cultura WPM cresceram em comprimento no segundo subcultivo para



meio sem reguladores (FIGURA 2D), apesar de terem apresentado menor alongamento do que as obtidas em meio WV<sub>5</sub>.

As porcentagens de necrose foram mais elevadas nos explantes oriundos de tratamentos com menores concentrações de reguladores na indução (TABELA 3), semelhante ao ocorrido na indução em meio WV<sub>5</sub>.

TABELA 3 – FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES OBTIDOS DE PLÂNTULAS DE CINCO DIAS DE GERMINAÇÃO, DAS FAMÍLIAS F27, B05 E DE POMAR COMERCIAL de *Pinus taeda*, APÓS DUAS SEMANAS DE INDUÇÃO EM MEIO WPM COM CONCENTRAÇÕES DE BAP E ANA, SEGUIDA DE DOIS SUBCULTIVOS DE QUATRO SEMANAS CADA, PARA MEIO WPM SEM REGULADORES.

| Reguladores na indução (µM) | Explantes c/ brotações (%) |                   | Número médio de brotações/ explante |                 | Necrose (%)  |              |
|-----------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------|--------------|--------------|
|                             | 1º subc                    | 2º subc           | 1º subc                             | 2º subc         | 1º subc      | 2º subc      |
|                             | 4 sem-s/regs               | 4 sem-s/regs      | 4 sem-s/regs                        | 4 sem-s/regs    | 4 sem-s/regs | 4 sem-s/regs |
| Testemunha (s/ regs)        | 0,0 ±0,0                   | 3,3 ±5,8          | 0,0 ±0,0                            | 1,0 ±0,0        | 61,9 ±20,6   | 68,6 ±17,9   |
| 11 BAP                      | 21,2 ±16,3                 | 14,5 ±4,8         | 2,0 ±0,0                            | 3,0 ±1,0        | 35,6 ±33,6   | 52,2 ±13,5   |
| 22 BAP                      | 11,1 ±11,1                 | 15,3 ±6,1         | 3,0 ±1,0                            | 3,0 ±1,0        | 50,0 ±26,7   | 62,0 ±11,2   |
| 44 BAP<br>0,5 ANA           | 28,3 ±7,2                  | 31,9 ±10,2        | 2,7 ±0,7                            | <b>3,8 ±1,8</b> | 26,4 ±9,7    | 28,7 ±7,5    |
| 44 BAP<br>0,75ANA           | 27,6 ±16,6                 | <b>35,9 ±10,5</b> | <b>5,7 ±5,4</b>                     | <b>3,8 ±2,6</b> | 28,2 ±12,2   | 39,4 ±26,3   |

\* Subc = subcultivo, Regs = reguladores vegetais, Sem = semanas.

#### 4.2.2 Brotações apicais obtidas de plântulas de dez dias de germinação

Após 14 dias de estabelecimento em meio MS sem reguladores, os explantes desinfestados em imersão em solução de 0,05% de HgCl<sub>2</sub> (+ 0,1% Tween 20<sup>®</sup>, 10 min) seguida de imersão em solução de 1% de NaOCl (+ 0,1% Tween 20<sup>®</sup>, 15 min) apresentaram 71,6 % de sobrevivência e contaminação bacteriana e/ou fúngica de 28,4 %.

Passadas duas semanas de indução em meio de cultura WV<sub>5</sub> contendo combinações de 33 ou 44 µM de BAP acrescido de 0,05 µM de ANA observou-se nova contaminação bacteriana e/ou fúngica (10 %), e 3,8 % de necrose. Não foi observada formação de brotações adventícias e/ou axilares durante o período de indução.

Depois da realização de subcultivo para meio WV<sub>5</sub> sem reguladores acrescido de 0,5% de carvão ativado muitos explantes, apesar de vigorosos e com crescimento apical, não apresentaram formação de brotações (FIGURA 3A). Contudo, muitos explantes responderam formando brotações tanto axilares quanto adventícias, sendo as adventícias formadas nas bordas e no meio nas acículas mais velhas (primeiras acículas do epicótilo) (FIGURAS 3B e 3C). As brotações axilares ocorreram nas gemas laterais do epicótilo, nas gemas da face adaxial de acículas, nas gemas centrais de braquiblastos e nas gemas intercotiledonares (FIGURA 3B). Os cotilédones não apresentaram crescimento e não houve formação de brotações adventícias sobre eles (FIGURAS 3 A e 3B).

O tratamento de indução em meio WV<sub>5</sub> contendo 44 µM de BAP e 0,05 µM de ANA apresentou porcentagem superior de explantes com brotações no primeiro subcultivo, para meio com 0,5% de carvão ativado, porém, nos dois subcultivos para meio sem reguladores e sem carvão, a porcentagem caiu de 50% para 29%, devido ao aumento de explantes necrosados (TABELA 4).

No tratamento de indução em meio WV<sub>5</sub> contendo 33 µM de BAP e 0,05 µM de ANA, foi observado o inverso: a porcentagem de explantes com brotações aumentou ao longo dos subcultivos, de 31,4 % para 35,0 % (TABELA 4).

As brotações apresentaram alongamento ao final do primeiro subcultivo em meio sem reguladores e sem carvão ativado (FIGURAS 3D E 3E) e foram individualizadas antes de serem inoculadas no subcultivo seguinte (FIGURA 3E), para propiciar o melhor desenvolvimento das mesmas.

Ao final dos três subcultivos, obteve-se número médio de 3,2 brotações por explante para o tratamento de indução com 33 µM de BAP e 0,05 µM de ANA e número médio de 4,8 brotações por explante para o tratamento de indução com 44 µM de BAP e 0,05 µM de ANA (TABELA 4). Considerando as porcentagens de formação de brotações e os números médios de brotações por explante de ambos os tratamentos, verificou-se que os dois possuem taxas de multiplicação similares.

A porcentagem de necrose de ambos os tratamentos, ao final dos subcultivos, ficou em torno de 40% (TABELA 4).

TABELA 4 – FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES OBTIDOS DE PLÂNTULAS DE DEZ DIAS DE GERMINAÇÃO DA FAMÍLIA F27 DE *Pinus taeda*, APÓS DUAS SEMANAS DE INDUÇÃO EM MEIO WV<sub>5</sub> ACRESCIDO DE 33 OU 44 µM BAP E 0,05 µM ANA, SEGUIDA DE SUBCULTIVO PARA MESMO MEIO SEM REGULADORES VEGETAIS ACRESCIDO DE 0,5% DE CARVÃO ATIVADO E DE DOIS SUBCULTIVOS PARA WV<sub>5</sub> SEM REGULADORES E SEM CARVÃO ATIVADO, SENDO OS TRÊS SUBCULTIVOS COM DURAÇÃO DE SEIS SEMANAS CADA.

| Reguladores na indução (µM) | Explantes com brotações (%) |                    |                    | Número médio de brotações/ explante |                    |                    | Necrose (%)          |                    |                    |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
|                             | 1º subc<br>0,5% c.a.        | 2º subc<br>s/ c.a. | 3º subc<br>s/ c.a. | 1º subc<br>0,5% c.a.                | 2º subc<br>s/ c.a. | 3º subc<br>s/ c.a. | 1º subc<br>0,5% c.a. | 2º subc<br>s/ c.a. | 3º subc<br>s/ c.a. |
| 33 BAP<br>0,05 ANA          | 31,4±12,6                   | 35,0±15,1          | 35,0±15,1          | 2,0±0,8                             | 3,0±1,9            | 3,2±2,1            | 30,0±9,1             | 44,3±4,2           | 44,3±4,2           |
| 44 BAP<br>0,05 ANA          | <b>50,1±18,8</b>            | 29,3±9,5           | 29,3±9,5           | 1,5±0,7                             | 3,0±1,1            | <b>4,8±1,5</b>     | 28,7±6,7             | 43,3±13,1          | 43,3±13,1          |

\*Subc = subcultivo; c.a. = carvão ativado.

### 4.3 MULTIPLICAÇÃO A PARTIR DE GEMAS AXILARES

Tanto em segmentos nodais, quanto em brotações apicais como explantes, as novas brotações obtidas foram predominantemente axilares, sendo observados três padrões: brotações formadas a partir de gemas laterais, a partir de gema do braquiblasto e brotações secundárias (brotação da brotação). Em explantes com formação de braquiblastos e acículas trifolioladas, a formação de novas brotações se deu preferencialmente nas gemas de braquiblastos do que nas gemas laterais de acículas unifolioladas. Houve pouca formação de brotações adventícias, as quais foram vistas na região mediana e nas bordas de acículas mais velhas e próximas da base do explante.

#### 4.3.1 Multiplicação a partir de segmentos nodais

##### 4.3.1.1 Experimento I

Não houve interação significativa entre os fatores período de cultivo e comprimento do segmento nodal para as variáveis porcentagem de explantes com brotações e número médio de brotações por explante (ANEXO 1).

Segmentos nodais de diferentes comprimentos apresentaram porcentagem de formação de brotações estatisticamente iguais (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ; TABELA 5). Sendo assim, é mais vantajoso o uso de segmentos menores, de 1,0-1,9 cm, os quais podem ser confeccionados em maior quantidade com um

mesmo número de matrizes. A porcentagem de explantes com brotações apresentou incremento significativo após oito semanas de subcultivo (TABELA 5; FIGURAS 4A e 4B).

Os valores obtidos para o número médio de brotações por explante não apresentaram diferença significativa nem entre os diferentes comprimentos de explante, nem entre os dois períodos de subcultivo (TABELA 5; ANEXO 1). O percentual de explantes necrosados foi baixo (menor do que 8%) e não variou entre os tratamentos.

TABELA 5 – FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DA FAMÍLIA F27 DE *P. taeda*, DE DIFERENTES COMPRIMENTOS, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS DE SUBCULTIVO PARA MEIO WV<sub>5</sub> SEM REGULADORES, PRECEDIDO DE QUATRO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA COM 0,1 µM DE BAP.

| Variáveis                          | Período de cultivo | Comprimento do explante (cm) |         |         | Média  |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------|---------|---------|--------|
|                                    |                    | 1,0-1,9                      | 2,0-2,9 | 3,0-4,0 |        |
| Explantes com brotações (%)        | 4 sem              | 77,8                         | 76,2    | 63,6    | 72,7 B |
|                                    | 8 sem              | 85,0                         | 97,6    | 98,1    | 93,6 A |
|                                    | Média              | 81,4 A                       | 86,9 A  | 80,8 A  |        |
| Número médio de brotações/explante | 4 sem              | 1,7                          | 1,8     | 1,9     | 1,8 A  |
|                                    | 8 sem              | 2,2                          | 2,2     | 3,0     | 2,5 A  |
|                                    | Média              | 1,9 A                        | 2,0 A   | 2,5 A   |        |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou na mesma linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Sem = semanas.

#### 4.3.1.2 Experimento II

Não houve interação significativa entre os fatores família e concentração de BAP para as variáveis porcentagem de explantes com brotações e número médio de brotações por explante, após quatro e oito semanas de cultivo (ANEXOS 2 e 3).

Após quatro semanas de cultivo em meio WV<sub>5</sub> acrescido de 0,25; 0,5 ou 2,5 µM de BAP, os segmentos nodais da família F27 apresentaram superioridade na formação de brotações e no número médio de brotações por explante, quando comparada com os resultados obtidos para segmentos da família B05 e do pomar comercial (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ; TABELA 6; FIGURA 4C). A família F27 apresentou melhores características a campo, quanto à qualidade do fuste, do que a

família B05 e provavelmente superiores às características das sementes de cruzamentos não controlados vindas do pomar comercial.

Quando comparadas as três diferentes concentrações de BAP, não foram observadas diferenças na porcentagem de formação de brotações e no número médio de brotações após quatro semanas de subcultivo (TABELA 6, ANEXO 2).

Após oito semanas em cultivo nas mesmas formulações de meio de cultura, os segmentos nodais apresentaram percentual de formação de brotações em torno de 90% para todas as famílias e concentrações de BAP testadas (TABELA 6, ANEXO 3). A família F27 apresentou resultado estatisticamente superior ao observado para os explantes de pomar comercial para esta variável (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ , TABELA 6). Novamente, as concentrações de BAP não apresentaram desempenho diferente para a porcentagem de explantes com brotações (TABELA 6).

O número médio de brotações por explante aumentou em todos os tratamentos quando comparado ao obtido para quatro semanas (TABELA 6). Para esta mesma variável, em oito semanas, observou-se diferença entre as concentrações de BAP, sendo o maior valor obtido (4,0 brotações por segmento em média) com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP (TABELA 6). O número médio de brotações por explante não variou entre as famílias após oito semanas de cultivo, segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade (TABELA 6, ANEXO 3).

A porcentagem necrose se manteve baixa, com valores menores do que 9 %, em todos os tratamentos.

TABELA 6 – FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DE DIFERENTES FAMÍLIAS SELECIONADAS DE *P. taeda*, COM 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS EM MEIO WV<sub>5</sub> ACRESCIDO DE 0,25; 0,5 OU 2,5 µM DE BAP.

| Variáveis                          | Famílias                           | Concentração de BAP (µM)    |        |        |        |        |         |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|
|                                    |                                    | 0,25                        | 0,5    | 2,5    | Média  |        |         |
| 4 semanas                          | Explantes com brotações (%)        | F27                         | 97,5   | 95,0   | 100,0  | 97,5 A |         |
|                                    |                                    | B05                         | 70,7   | 72,8   | 77,7   | 73,7 B |         |
|                                    |                                    | PC                          | 63,9   | 65,0   | 52,5   | 60,5 B |         |
|                                    |                                    | Média                       | 77,4 A | 77,6 A | 76,7 A |        |         |
|                                    | Número médio de brotações/explante | F27                         | 2,7    | 2,9    | 2,8    | 2,8 A  |         |
|                                    |                                    | B05                         | 1,8    | 1,9    | 1,9    | 1,9 B  |         |
|                                    |                                    | PC                          | 1,7    | 1,6    | 1,7    | 1,7 B  |         |
|                                    |                                    | Média                       | 2,2 A  | 2,2 A  | 2,2 A  |        |         |
|                                    | 8 semanas                          | Explantes com brotações (%) | F27    | 97,6   | 100,0  | 100,0  | 99,2 A  |
|                                    |                                    |                             | B05    | 92,8   | 91,8   | 90,5   | 91,7 AB |
| PC                                 |                                    |                             | 94,4   | 100,0  | 77,8   | 90,7 B |         |
| Média                              |                                    |                             | 95,0 A | 97,3 A | 89,4 A |        |         |
| Número médio de brotações/explante |                                    | F27                         | 3,0    | 3,4    | 4,6    | 3,6 A  |         |
|                                    |                                    | B05                         | 2,3    | 2,4    | 4,3    | 3,0 A  |         |
|                                    |                                    | PC                          | 3,1    | 2,8    | 3,2    | 3,0 A  |         |
|                                    |                                    | Média                       | 2,7 B  | 2,8 B  | 4,0 A  |        |         |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou na mesma linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. PC = pomar comercial.

#### 4.3.1.3 Experimento III

Não houve interação entre os fatores meio de cultura e concentrações de BAP para as variáveis porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose, após quatro semanas de cultivo (ANEXO 4).

Durante este período, não foi observada diferença entre as porcentagens de explantes com brotações observadas nos segmentos nodais cultivados em meio de

cultura WV<sub>5</sub> e em meio de cultura GDm (TABELA 7). Quanto à concentração de BAP, foi observada porcentagem de explantes com brotações superior para os segmentos nodais tratados com 4,0 µM desta citocinina (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ , TABELA 7).

As variáveis número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (TABELA 7, ANEXO 4).

TABELA 7 – FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DAS FAMÍLIAS F27, B05 E DE POMAR COMERCIAL DE *P. taeda*, DE 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS QUATRO SEMANAS EM MEIO WV<sub>5</sub> E GDm ACRESCIDOS DE 1,0; 2,0 ou 4,0 µM DE BAP.

| Variáveis                    | Meio de cultura | Concentração de BAP (µM) |         |        |        |
|------------------------------|-----------------|--------------------------|---------|--------|--------|
|                              |                 | 1,0                      | 2,0     | 4,0    | Média  |
| Explantes com brotações (%)  | WV <sub>5</sub> | 79,5                     | 82,1    | 87,2   | 82,9 A |
|                              | GDm             | 69,2                     | 74,4    | 87,2   | 76,9 A |
|                              | Média           | 74,4 B                   | 78,2 AB | 87,2 A |        |
| Número de brotações/explante | WV <sub>5</sub> | 2,1                      | 1,9     | 2,0    | 2,0 A  |
|                              | GDm             | 1,5                      | 1,9     | 2,1    | 1,8 A  |
|                              | Média           | 1,8 A                    | 1,9 A   | 2,0 A  |        |
| Necrose (%)                  | WV <sub>5</sub> | 7,7                      | 2,6     | 5,1    | 5,1 A  |
|                              | GDm             | 2,6                      | 7,7     | 5,1    | 5,1 A  |
|                              | Média           | 5,1 A                    | 5,1 A   | 5,1 A  |        |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou na mesma linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após oito semanas de subcultivo, foi observada interação entre os fatores meio de cultura e concentrações de BAP para a variável número médio de brotações por explante (Teste F,  $p \leq 0,01$ , ANEXO 5), a qual apresentou menor valor em meio GDm na concentração de 1,0 µM de BAP (TABELA 8). Para as outras variáveis, não foi observada interação (ANEXO 5).

Observou-se aumento na porcentagem de formação de brotações com relação ao período de quatro semanas, sendo o maior valor obtido com segmentos nodais mantidos em meio de cultura acrescido de 4,0 µM de BAP, em comparação com a concentração de 1,0 µM de BAP (TABELA 8).

A porcentagem de necrose não ultrapassou 13% e foi significativamente maior nos explantes tratados com 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP.

TABELA 8 – FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DAS FAMÍLIAS F27 E B05 E DE POMAR COMERCIAL DE *P. taeda*, DE 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS OITO SEMANAS EM MEIO WV<sub>5</sub> E GDm ACRESCIDOS DE 1,0; 2,0 OU 4,0  $\mu\text{M}$  DE BAP.

| Variáveis                    | Meio de cultura | Concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ ) |         |               | Média  |
|------------------------------|-----------------|---------------------------------------|---------|---------------|--------|
|                              |                 | 1,0                                   | 2,0     | 4,0           |        |
| Explantes com brotações (%)  | WV <sub>5</sub> | 87,2                                  | 97,4    | 94,9          | 93,2 A |
|                              | GDm             | 79,5                                  | 82,1    | 94,9          | 85,5 A |
|                              | <b>Média</b>    | 83,3 B                                | 89,7 AB | <b>94,9 A</b> |        |
| Número de brotações/explante | WV <sub>5</sub> | 2,9 Aa                                | 2,3 Aa  | 2,7 Aa        | 2,6    |
|                              | GDm             | <b>1,5 Ab</b>                         | 2,1 Aa  | 2,2 Aa        | 1,9    |
|                              | <b>Média</b>    | 2,2                                   | 2,2     | 2,5           |        |
| Necrose (%)                  | WV <sub>5</sub> | 10,3                                  | 2,6     | 5,1           | 6,0 A  |
|                              | GDm             | 12,8                                  | 7,7     | 5,1           | 8,6 A  |
|                              | <b>Média</b>    | <b>11,5 A</b>                         | 5,1 B   | 5,1 B         |        |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou na mesma linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a variável número médio de brotações por explante, letras maiúsculas comparam médias por linha e letras minúsculas comparam médias por coluna.

### 4.3.2 Multiplicação a partir de brotações apicais

#### 4.3.2.1 Experimento I

Não houve interação entre os fatores meio de cultura e comprimento inicial do explante para as variáveis porcentagem de explantes com brotações, porcentagem de alongamento e porcentagem de necrose (ANEXO 6).

Devido à presença da gema apical, as brotações apicais produzem baixas porcentagens de formação de brotações axilares quando comparadas com segmentos nodais. Após oito semanas em meios WV<sub>5</sub> e GDm sem reguladores, a porcentagem de formação de novas brotações foi bastante baixa, não ultrapassando 5%, sem diferença entre os meios de cultura e entre os diferentes comprimentos de explante (TABELA 9).



A porcentagem de alongamento foi superior nos explantes de menor comprimento inicial (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ , TABELA 9), ou seja, as brotações apicais inicialmente menores cresceram proporcionalmente mais do que as de comprimento inicial maior. Para esta variável, também foi observada diferença significativa quanto ao meio de cultura utilizado, sendo o melhor desempenho observado em meio WV<sub>5</sub> (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ , TABELA 9, FIGURAS 4D e 4E).

Apesar do maior alongamento, a porcentagem de necrose apresentou-se significativamente maior para os explantes de tamanho inicial de 0,5 cm de comprimento (TABELA 9).

TABELA 9 – RESPOSTAS DE BROTAÇÕES APICAIS DA FAMÍLIA F27 DE *P. taeda*, COM 0,5; 1,0 E 2,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS OITO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA WV<sub>5</sub> OU GDm DESPROVIDO DE REGULADORES VEGETAIS.

| Variáveis                   | Meio de cultura | Comprimento inicial (cm) |         |        | Média          |
|-----------------------------|-----------------|--------------------------|---------|--------|----------------|
|                             |                 | 0,5                      | 1,0     | 2,0    |                |
| Explantes com brotações (%) | WV <sub>5</sub> | 0,0                      | 2,8     | 4,2    | 2,3 A          |
|                             | GDm             | 0,0                      | 0,0     | 0,0    | 0,0 A          |
|                             | Média           | 0,0 A                    | 1,4 A   | 2,1 A  |                |
| Alongamento (%)             | WV <sub>5</sub> | 286,5                    | 206,3   | 162,0  | <b>218,3 A</b> |
|                             | GDm             | 41,0                     | 15,0    | 10,8   | 22,3 B         |
|                             | Média           | <b>163,8 A</b>           | 110,7 B | 86,4 B |                |
| Necrose (%)                 | WV <sub>5</sub> | 20,6                     | 0,0     | 0,0    | 6,9 A          |
|                             | GDm             | 16,7                     | 1,6     | 0,0    | 6,1 A          |
|                             | Média           | <b>18,7 A</b>            | 0,8 B   | 0,0 B  |                |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou na mesma linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.3.2.2 Experimento II

Para as variáveis analisadas neste experimento, não houve interação significativa entre os fatores (ANEXO 7).

Após oito semanas de cultivo em meio de cultura  $WV_5$  com adição de BAP, houve 53,2% de formação de brotações nos explantes com 1,0 cm de comprimento, valor significativamente maior do que o obtido para explantes de 0,5 cm (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ; TABELA 10). Inversamente, a porcentagem de alongamento apresentou valor superior para os explantes de comprimento inicial de 0,5 cm (116,2%) em relação ao observado em explantes de comprimento inicial de 1,0 cm (72,4%) (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ; TABELA 10). Essas duas variáveis não apresentaram valores diferentes quando comparadas quanto às três diferentes concentrações de BAP utilizadas (TABELA 10).

O número médio de brotações por explante não diferiu para os dois comprimentos de explante testados, no entanto, variou entre as concentrações de BAP: foi maior nos explantes tratados com 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP (2,4 brotações por explante) do que nos tratados com 2,0  $\mu\text{M}$  de BAP (1,7 brotações por explante) (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ; TABELA 10).

Os explantes de 0,5 cm apresentaram maiores percentuais de necrose do que explantes de 1,0 cm de comprimento inicial (TABELA 10), sendo que a necrose foi mais intensa nos explantes tratados com maiores concentrações de BAP. Foi observada a ocorrência de hiperhidricidade em 5,4% dos explantes de 0,5 cm, o que não ocorreu nos explantes de 1,0 cm de comprimento.

TABELA 10 – RESPOSTAS DE BROTAÇÕES APICAIS DA FAMÍLIA F27 DE *P. taeda*, DE 0,5 E 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS OITO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA WV<sub>5</sub> COM 0,5; 1,0 E 2,0 µM DE BAP.

| Variáveis                          | Comprimento (cm) | Concentração de BAP (µM) |        |         |         |
|------------------------------------|------------------|--------------------------|--------|---------|---------|
|                                    |                  | 0,5                      | 1,0    | 2,0     | Média   |
| Explantes com brotações (%)        | 0,5              | 5,4                      | 13,8   | 8,9     | 9,4 B   |
|                                    | 1,0              | 48,5                     | 67,7   | 43,4    | 53,2 A  |
|                                    | Média            | 26,9 A                   | 40,8 A | 26,2 A  |         |
| Alongamento (%)                    | 0,5              | 118,0                    | 104,5  | 126,0   | 116,2 A |
|                                    | 1,0              | 65,5                     | 76,5   | 75,3    | 72,4 B  |
|                                    | Média            | 91,8 A                   | 90,5 A | 100,6 A |         |
| Número médio de brotações/explante | 0,5              | 2,7                      | 2,0    | 1,4     | 2,0 A   |
|                                    | 1,0              | 2,1                      | 2,5    | 2,0     | 2,2 A   |
|                                    | Média            | 2,4 A                    | 2,3 AB | 1,7 B   |         |
| Necrose (%)                        | 0,5              | 7,1                      | 24,8   | 21,4    | 17,8 A  |
|                                    | 1,0              | 4,0                      | 0,0    | 3,9     | 2,6 B   |
|                                    | Média            | 5,6 A                    | 12,4 A | 12,6 A  |         |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou na mesma linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade

#### 4.3.2.3 Experimento III

Foi verificada interação entre os fatores período de cultivo e concentração de BAP para a variável número médio de brotações por explante (ANEXO 8). Para as variáveis porcentagem de explantes com brotações e porcentagem de alongamento, não foi verificada interação significativa (ANEXO 8).

Explantes inoculados em meio de cultura WV<sub>5</sub> com 4 µM de BAP apresentaram formação de brotações significativamente superior à obtida nos explantes em meio com 1 µM de BAP (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ; TABELA 11, FIGURA 4F). A porcentagem de explantes com brotações foi de 41,5% e 50,1%, após quatro e oito semanas de subcultivo, respectivamente, embora as respostas não sejam estatisticamente diferentes (TABELA 11). As brotações axilares obtidas se formaram principalmente junto à base dos explantes (FIGURA 4F).

O alongamento das brotações variou entre 61,5 e 69,5% (TABELA 11), sem diferença entre as concentrações de BAP e com pouco acréscimo em comprimento (2%) entre oito e quatro semanas (TABELA 11).

A variável número médio de brotações por explante foi a única na qual se verificou interação (1%) entre os fatores concentração de BAP e período de tempo (TABELA 11, ANEXO 8) e os melhores resultados foram vistos em explantes em meio de cultura com 4,0  $\mu\text{M}$  de BAP após oito semanas. Não houve necrose de explantes.

TABELA 11 - RESPOSTAS DE BROTAÇÕES APICAIS DA FAMÍLIA F27 DE *Pinus taeda*, DE 1,0 CM DE COMPRIMENTO, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS EM MEIO DE CULTURA  $\text{WV}_5$  COM 1,0; 2,0 OU 4,0  $\mu\text{M}$  DE BAP.

| Variáveis                          | Período | Concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ ) |         |        | Média  |
|------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|--------|--------|
|                                    |         | 1,0                                   | 2,0     | 4,0    |        |
| Explantes com brotações (%)        | 4 sem.  | 28,6                                  | 37,6    | 58,4   | 41,5 A |
|                                    | 8 sem.  | 31,0                                  | 53,3    | 65,9   | 50,1 A |
|                                    | Média   | 29,8 B                                | 45,5 AB | 62,2 A |        |
| Alongamento (%)                    | 4 sem.  | 60,0                                  | 68,3    | 67,3   | 65,2 A |
|                                    | 8 sem.  | 63,0                                  | 68,3    | 71,7   | 67,7 A |
|                                    | Média   | 61,5 A                                | 68,3 A  | 69,5 A |        |
| Número médio de brotações/explante | 4 sem.  | 1,0 Aa                                | 1,1 Aa  | 1,4 Ab | 1,2    |
|                                    | 8 sem.  | 1,0 Ba                                | 1,2 Ba  | 2,3 Aa | 1,5    |
|                                    | Média   | 1,0                                   | 1,1     | 1,8    |        |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a variável número médio de brotações por explante, letras maiúsculas comparam médias por linha e letras minúsculas comparam médias por coluna. Sem = semanas.

## 4.4 ENRAIZAMENTO *in vitro*

### 4.4.1 Experimento I

Após período de nove dias das brotações apicais em presença de reguladores (2,86  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP) e de duas semanas em meio de cultura sem reguladores, foi observada a formação de raízes adventícias nos tratamentos que passaram por indução em meio GDm/2, WV<sub>5</sub>/2 e AA. As raízes formadas eram de coloração branca e não possuíam raízes secundárias (FIGURAS 5A e 5B).

Após seis semanas em meios de cultura sem reguladores, as raízes passaram a ter coloração escura e a apresentar ramificações secundárias (FIGURAS 5C e 5D). Houve 35,0% de enraizamento nas brotações induzidas em meio AA (TABELA 12), valor significativamente superior ao observado para brotações induzidas ao enraizamento em WV<sub>5</sub>/2 e WV<sub>3</sub>/2 (5,0 e 0,0%, respectivamente) e estatisticamente igual ao observado em brotações induzidas em GDm/2 (17,9%; TABELA 12, Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ; ANEXO 9).

O número médio de raízes por explante foi estatisticamente igual para os explantes induzidos em GDm/2 e AA, e superior em GDm/2 quando comparado com WV<sub>5</sub>/2 (TABELA 12). Verificou-se também o crescimento das raízes, de 0,2 cm em média após duas semanas de subcultivo para cerca de 1,0 cm em média após seis semanas de subcultivo. O comprimento médio de raízes não diferiu entre os tratamentos após seis semanas (TABELA 12).

Em seis semanas, as brotações vindas de indução em meio de cultura WV<sub>5</sub>/2 apresentaram alongamento significativamente maior que as vindas de outros tratamentos (WV<sub>5</sub>/2: 92,0% > GDm/2: 30,0% = WV<sub>3</sub>/2: 47,3% = AA: 14,7%; Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ) e também foram as únicas que apresentaram formação de brotações axilares (17,5%). Nos meios WV<sub>5</sub> e WV<sub>3</sub> houve maior frequência de formação de calo na base dos explantes (FIGURA 5D), bem como calos de maior tamanho (dados não mostrados).

TABELA 12 – ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DA FAMÍLIA F27 DE *P. taeda*, SUBMETIDAS À INDUÇÃO POR NOVE DIAS EM MEIOS DE CULTURA GDm, WV<sub>5</sub>, WV<sub>3</sub> COM CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA À METADE E 20 G.L<sup>-1</sup> DE SACAROSE E MEIO ÁGAR-ÁGUA SEM SAIS OU SACAROSE, EM PRESENÇA DE 2,68 µM DE ANA E DE 0,44 µM DE BAP, APÓS SEIS SEMANAS DE SUBCULTIVO PARA MEIOS DE CULTURA SEM REGULADORES.

| Meio de indução ao enraizamento | Meio de subcultivo | Explantos enraizados (%) | Número médio de raízes/ explante | Comprimento médio das raízes (cm) |
|---------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| GDm/2                           | GDm/2              | 17,9 AB                  | 2,7 A                            | 1,2 A                             |
| WV <sub>5</sub> /2              | WV <sub>5</sub> /2 | 5,0 B                    | 1,0 B                            | 1,6 A                             |
| WV <sub>3</sub> /2              | WV <sub>3</sub> /2 | 0,0 B                    | ----                             | ----                              |
| AA**                            | GDm/2              | 35,0 A                   | 2,3 AB                           | 1,1 A                             |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.4.2 Experimento II

Não houve interação entre os fatores meio de cultura e concentração de sacarose utilizados na indução para as variáveis porcentagem de explantes enraizados, número médio de raízes por explante e comprimento médio de raízes (ANEXO 10).

Ocorreu enraizamento adventício das brotações apicais após duas semanas em meio GDm/2 sem reguladores, em todos os tratamentos, exceto no de indução em ágar-água com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. As raízes formadas eram de cor esbranquiçada e sem ramificações.

Após seis semanas de subcultivo em meio sem reguladores, as raízes formadas apresentaram cor escura e presença de ramificações. Os explantes induzidos nas formulações de ágar-água apresentaram porcentagens de enraizamento de até 55,6%, contudo, sem diferença significativa em relação aos tratamentos com GDm/2 (TABELA 13, ANEXO 10).

Quanto ao número médio de raízes, em seis semanas de subcultivo para meio sem reguladores, os explantes enraizados tratados na indução em meio GDm/2 apresentaram resultado superior ao observado para explantes tratados em ágar-água (TABELA 13; Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

O comprimento médio das raízes variou entre 0,3 e 0,5 cm após duas semanas e entre 1,3 a 1,7 cm após seis semanas de subcultivo, sem diferenças entre os tratamentos (TABELA 13).

TABELA 13 – ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DAS FAMÍLIAS F27 E B05 E DE POMAR COMERCIAL DE *P. taeda*, SUBMETIDAS A INDUÇÃO POR NOVE DIAS EM MEIO DE CULTURA GDm/2 OU AA, ACRESCIDO OU NÃO DE 20 G.L<sup>-1</sup> DE SACAROSE, NA PRESENÇA DE 2,68 µM DE ANA E DE 0,44 µM DE BAP, APÓS SEIS SEMANAS DE SUBCULTIVO PARA MEIO GDm/2 COM 20 GL<sup>-1</sup> DE SACAROSE E SEM REGULADORES.

| Variáveis                        | Meio de cultura na indução | Concentração de sacarose (G.L <sup>-1</sup> ) |        |        |
|----------------------------------|----------------------------|---|--------|--------|
|                                  |                            | 0,0   | 20,0   | Média  |
| Explantes enraizados (%)         | AA                         | 55,6  | 44,0   | 49,8 A |
|                                  | GDm/2                      | 23,3  | 40,5   | 33,4 A |
|                                  | Média                      | 40,9 A  | 42,2 A |        |
| Número médio de raízes/ explante | AA                         | 1,7   | 1,4    | 1,5 B  |
|                                  | GDm/2                      | 3,0   | 2,2    | 2,6 A  |
|                                  | Média                      | 2,0 A   | 2,2 A  |        |
| Comprimento médio de raízes (cm) | AA                         | 1,7   | 1,3    | 1,5 A  |
|                                  | GDm/2                      | 1,6   | 1,6    | 1,6 A  |
|                                  | Média                      | 1,6 A   | 1,4 A  |        |

\* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou na mesma linha não diferem estatisticamente segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.5 ACLIMATIZAÇÃO

A aclimatização realizada com transplante direto para casa de vegetação em substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, apresentou sobrevivência de 52,9% aos dez dias, queda da porcentagem de sobreviventes após 20 e 30 dias, e sobrevivência nula após 40 dias (TABELA 14).

A aclimatização realizada com período prévio de quatro semanas em sala de crescimento, em frascos abertos contendo Plantmax<sup>®</sup>, as porcentagens de sobrevivência pouco diferiram das verificadas na primeira aclimatização, distinguindo-se apenas por ter apresentado 10% de sobrevivência após 40 dias (TABELA 14).

A aclimatização feita com período prévio em sala de crescimento em frascos vedados com plástico filme e uso de substrato vermiculita:Plantmax<sup>®</sup> (1:1), foi a que apresentou as maiores porcentagens de sobrevivência, de 100% após dez dias da retirada do meio de cultura, e de 85% após 40 dias da retirada do meio de cultura (TABELA 14).

O crescimento das mudas foi ortotrópico, sem a ocorrência de ramificações nas três condições de aclimatização.

As duas primeiras aclimatizações, nas quais houve menor sobrevivência, foram realizadas no período do inverno e a terceira aclimatização, que possibilitou maior sobrevivência (TABELA 14), ocorreu durante a primavera, quando as temperaturas na casa de vegetação estavam mais elevadas, fato o qual pode ter contribuído para os resultados obtidos.

TABELA 14: PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE BROTAÇÕES DE *P. taeda* ENRAIZADAS *in vitro*, APÓS DEZ, 20, 30 E 40 DIAS CONTADOS A PARTIR DA RETIRADA DAS BROTAÇÕES DO MEIO DE CULTURA, SOB TRÊS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACLIMATIZAÇÃO.

|         | 1ª Aclimatização<br>(C.V. – 40 dias) | 2ª Aclimatização<br>(S.C.F.A.-28 dias + C.V.-12 dias) | 3ª Aclimatização<br>(S.C.F.V.-10 dias+<br>S.C.F.A.-10 dias + C.V.-20 dias) |
|---------|--------------------------------------|---|--|
| 10 dias | 52,9                                 | 56,0  | <b>100,0</b>   |
| 20 dias | 29,4                                 | 22,0  | 90,0   |
| 30 dias | 11,8                                 | 18,0  | 85,0   |
| 40 dias | 0,0                                  | 10,0  | <b>85,0</b>  |

\* C.V. = casa de vegetação; S.C.-F.A = sala de crescimento, em frasco aberto; S.C.-F.V = sala de crescimento, em frasco vedado.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Um dos explantes mais utilizados e responsivos em estudos de organogênese de *Pinus taeda* são os cotilédones retirados do eixo embrionário das sementes (TANG *et al.*, 1998). Vários procedimentos e tratamentos de desinfestação foram realizados na tentativa de isolar esse explante, no entanto, devido ao tegumento das sementes que é muito rígido, houve dificuldade com o manuseio e elevada ocorrência de contaminação microbiana, Por isso, optou-se pela germinação das sementes em placas de Petri, mantidas em sala de crescimento e sem tratamento prévio de desinfestação porque o mesmo inibiu e retardou o início da germinação. Semelhantemente ao observado por Golle (2007) que obteve sucesso na desinfestação de sementes selecionadas de *P. taeda*, controlando a contaminação fúngica e bacteriana usando concentrações de 2, 3 e 4% de NaOCl, durante dez,



cinco e três minutos, respectivamente, resultando em apenas 6,4%, 0,8% e 1,6% de contaminação, porém, obteve baixíssimas taxas de germinação, não ultrapassando o valor de 3%.

Houve dificuldade para o estabelecimento de culturas assépticas, principalmente com os explantes mais jovens de até cinco dias de germinação. Para os explantes de cinco dias de germinação, foram realizados testes preliminares de desinfestação variando períodos de exposição, concentrações e combinações de desinfestantes (dados não mostrados) e apenas a desinfestação mencionada no item 3.4.1 ( $H_2O_2$  30% - 20 min, NaOCl 6% - 10 min,  $HgCl_2$  0,05% - 5 min) permitiu melhor controle sobre a contaminação bacteriana. Segundo Thorpe (1994), devido ao alto grau de contaminação natural encontrada em sementes, muitas vezes, utiliza-se uma combinação de hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e etanol para as gimnospermas.

A alta concentração de NaOCl utilizada pode ter potencialmente aumentado o percentual de necrose nas primeiras etapas de cultivo. Grattapaglia e Machado (1998) relataram que a relação existente entre o tempo de contato e a concentração da solução desinfestante com as fontes de explante é muito importante e pode variar muito, e que há a necessidade de regular tempo e concentrações de forma adequada para que não ocorram injúrias ou morte dos tecidos ou órgãos que serão cultivados.

Para os explantes de dez dias de germinação, também houve dificuldade de estabelecimento asséptico, embora menor do que a encontrada para os explantes de cinco dias. O estabelecimento prévio em meio de cultura MS possibilitou grande redução na contaminação bacteriana quando comparado com estabelecimento direto em meio  $WV_5$  (dados não mostrados). O uso de diferentes formulações de meio de cultura para a redução da contaminação bacteriana foi relatado também por Horgan (1993) para culturas de *P. radiata*. No entanto, o meio MS possui altas concentrações de nitrogênio na forma de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$  as quais são tóxicas para muitas espécies e consideradas inadequadas para o cultivo de *Pinus* (HARRY; THORPE, 1994; TANG; OUYANG, 1999; TANG; NEWTON, 2007) e isto pode ter influenciado os resultados para as primeiras etapas de indução.

O meio MS difere do meio  $WV_5$  por possuir glicina, ácido nicotínico e piridoxina (ausentes em  $WV_5$ ), maiores concentrações de N inorgânico e Mn, e

menores concentrações de Cu, B, S, Ca, P, Mg, Cl, inositol e tiamina (ANEXOS 12 e 15).

## 6.2 ORGANOGÊNESE

Tanto nos explantes obtidos de plântulas de cinco dias de germinação, quanto nos obtidos de plântulas de dez dias, o aparecimento de brotações ocorreu no primeiro subcultivo sem reguladores, após a remoção dos meios de cultura com altas concentrações de BAP, semelhante ao relatado para *P. taeda* por Mott e Amerson (1981), Amerson *et al.* (1985), Jang e Tainter (1991) e Rocha e Niella (2002).

Os explantes de cinco dias foram mais responsivos do que os de dez dias de germinação na indução de brotações múltiplas. Os melhores resultados obtidos com explantes de cinco dias de germinação foram com indução em meio WV<sub>5</sub>, contendo 44 µM de BAP acrescida de 0,5 µM de ANA, na qual se obteve 50,0% de formação de brotações após quatro semanas de subcultivo para meio de cultura WV<sub>5</sub> sem reguladores e 4,8 brotações por explante após oito semanas de subcultivo para meio WV<sub>5</sub> sem reguladores.

Para os explantes de dez dias de germinação foram obtidos resultados semelhantes aos de cinco dias, para uma mesma combinação de reguladores para indução de brotações em meio WV<sub>5</sub>, com 44 µM de BAP acrescida de 0,5 µM de ANA. No entanto, o período de resposta foi mais longo, 50,1% de formação de brotações após seis semanas de subcultivo para meio de cultura sem reguladores e 4,8 brotações por explante após 18 semanas de subcultivo para meio de cultura sem reguladores. Isto corrobora o observado por Mehra-Palta *et al.* (1978) para *P. taeda*, de que cotilédones jovens são mais responsivos que outros tipos de explante, em condições semelhantes de cultivo. A concentração de 44 µM de BAP foi vista como efetiva para a formação de brotações para a espécie por Amerson *et al.* (1985), Jang e Tainter (1991) e Rocha e Niella (2002), a partir de explantes cotiledonares.

Nos explantes de cinco dias de germinação, houve expansão dos cotilédones e formação de brotações adventícias sobre os mesmos, principalmente na região apical dos mesmos. Nos explantes de dez dias, foram observadas brotações adventícias sobre as primeiras acículas do epicótilo e brotações axilares nas gemas da face adaxial destas acículas e nas gemas intercotiledonares, sem formação de

brotações ou expansão nos cotilédones, semelhante ao observado por Zel *et al.* (1988) para *P. sylvestris*.

O padrão observado para a formação das brotações para os dois tipos de explante é condizente com o relatado por Aitken-Christie *et al.* (1985) para *P. radiata*, que observaram que cotilédones jovens (um dia após a germinação) apresentavam brotações adventícias em todo seu comprimento, enquanto que cotilédones mais maduros (cinco dias após a germinação) apresentavam apenas crescimento, sem formação de brotações. Cotilédones de idade intermediária (dois e três dias após a germinação) apresentaram menor porcentagem e número de brotações adventícias do que cotilédones de um dia de idade, e estas se formaram apenas próximas ao ápice dos cotilédones. Esta mudança, segundo Aitken-Christie *et al.* (1985), se deve às mudanças anatômicas e fisiológicas ocorridas ao longo da maturação do explante, pois cotilédones mais jovens apresentavam epiderme mais delgada e menor diferenciação celular e cotilédones mais maduros possuíam cera epicuticular, paredes celulares mais espessas, maior grau de hidrólise das reservas de lipídios e proteínas, além de um diferente balanço de reguladores endógenos.

Os explantes cultivados em meio WPM apresentaram coloração mais escura e entrenós mais curtos do que os cultivados em meio WV<sub>5</sub> e, visualmente, as brotações obtidas em meio WV<sub>5</sub> pareceram mais vigorosas. A formulação do meio de cultura influencia grandemente os resultados obtidos em cultivos *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008). O meio WV<sub>5</sub> é uma formulação que foi balanceada para o *P. taeda* (COKE, 1996a) e o meio WPM é uma formulação indicada para lenhosas. A principal característica do meio WPM é que a sua concentração iônica total é baixa, com exceção do íon sulfato, que está presente em uma concentração superior a comumente encontrada em outras formulações indicadas para espécies lenhosas (SATHYAMARAYANA; VARGHESE, 2007). O meio de cultura WV<sub>5</sub> apresenta maiores quantidades de K, B, Mg, Cl, P, mio-inositol e N inorgânico quando comparado ao meio WPM (ANEXOS 13 e 15).

O uso de carvão ativado nos subcultivos após indução com BAP e ANA parece ter influenciado também as freqüências de formação de brotações, pois resultados preliminares indicaram que o carvão ativado promoveu o alongamento de brotações, porém reduziu a porcentagem de brotações e o número médio de brotações.

### 6.3 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS E BROTAÇÕES APICAIS

Verificou-se que segmentos nodais apresentaram maiores porcentagens de formação de brotações axilares e número médio de brotações por explante do que brotações apicais, semelhantemente ao observado por Oliveira (2011) em explantes juvenis de *P. taeda*. Segundo Baxter *et al.* (1989) os segmentos decapitados naturalmente já possuem uma capacidade de produção de brotações, uma vez que não sofrem o efeito da dominância da gema apical. Brotações apicais podem ser utilizadas como matrizes para a formação de novos segmentos nodais, ao serem cultivadas em condições que propiciem seu alongamento, conforme proposto por Baxter *et al.* (1989) para *P. oocarpa* e *P. tecunumanii* e por Oliveira (2011) para *P. taeda*.

Ao comparar-se o desempenho de segmentos nodais de comprimentos de 1,0-1,9 cm, 2,0-2,9 cm e 3,0-4,0 cm, verificou-se que não houve diferença estatística entre os números médios de brotações por explante obtidos, diferentemente do visto por Baxter *et al.* (1989) para *P. tecunumanii* e *P. oocarpa*, nos quais o comprimento dos segmentos nodais influenciou a produção de brotações axilares. O comprimento de escolha para os segmentos nodais para os experimentos seguintes foi o de 1,0 cm, visando obter maior produtividade. Rocha e Niella (2002) relataram a possibilidade do uso de segmentos nodais ainda menores para *Pinus taeda*, com comprimento de 0,3 cm, com o número médio de duas brotações axilares por explante. Testes preliminares no presente trabalho, com segmentos de 0,5 cm, no entanto, apresentaram elevado percentual de necrose (dados não mostrados) de forma que se manteve a opção por segmentos de 1,0 cm. É conhecido que a posição original do segmento nodal de uma brotação de *Pinus* em relação à distância do ápice (proximal, mediana, distal) influencia as respostas de multiplicação de brotações axilares, sendo os segmentos proximais ao ápice mais produtivos que os demais (BAXTER *et al.*, 1989; OLIVEIRA, 2011). Por este motivo, segmentos proximais, medianos e distais foram igualmente distribuídos entre os tratamentos de todos os experimentos de multiplicação, visando minimizar a influência deste fator nos resultados.

Para brotações apicais, o comprimento do explante influenciou no alongamento, o qual foi proporcionalmente maior em brotações apicais menores, ou seja, brotações de 0,5 cm apresentaram maior alongamento que as de 1,0 cm, as quais apresentam maior alongamento que as de 2,0 cm, em meio de cultura desprovido de BAP. Apesar de propiciar maior alongamento, as brotações apicais de 0,5 cm apresentaram baixa porcentagem de formação de brotações axilares, maior necrose e presença de hiperhidricidade em alguns explantes, quando comparadas com brotações apicais de 1,0 cm em meio acrescido da citocinina BAP. A hiperhidricidade é um sintoma de que as concentrações de citocinina podem estar acima dos valores ótimos (KAUL, 1990; ZEL, 1993).

Não há relatos na literatura de comparação de comprimentos de brotações apicais em cultivos de *Pinus*, tanto para alongamento, quanto para formação de brotações axilares. As diferenças de alongamento podem ser devidas às concentrações endógenas de auxina, as quais são naturalmente maiores nas regiões meristemáticas de ápices e, em explantes mais curtos, os ápices estão mais próximos do meio de cultura e as gemas laterais sofrem influência da dominância apical (GEORGE *et al.*, 2008).

Quanto aos meios de cultura utilizados, não foram verificadas diferenças significativas quanto a formação e número de brotações axilares em segmentos nodais entre os meios WV<sub>5</sub> e GDm, porém a análise visual do vigor dos explantes indicou o meio WV<sub>5</sub> como superior para a manutenção *in vitro* de brotações axilares de *P. taeda* a longo prazo. Para brotações apicais, a formulação do meio de cultura teve influência significativa no alongamento das brotações. Com o meio WV<sub>5</sub>, obteve-se alongamento cinco vezes maior do que o obtido com o meio GDm. Sendo assim, o meio WV<sub>5</sub> foi escolhido para os experimentos posteriores.

A formulação WV<sub>5</sub> possui maior concentração de N, B, Ca, Mg, S, K, P, Mn, I, Zn, Cl e mio-inositol do que a formulação GDm (ANEXOS 11 e 15). Comparando-se as composições dos meios de cultura utilizados com as necessidades nutricionais de culturas de suspensões celulares de *P. taeda* (TEASDALE *et al.*, 1986), verifica-se que o meio de cultura GDm possui quantidades de B e Mg inferiores ao mínimo requerido pelas culturas, o que não ocorre para WV<sub>5</sub> (ANEXOS 11 e 15). Este fato poderia responder, em parte, pela diferença de desempenho das formulações WV<sub>5</sub> e GDm, no que diz respeito à formação de parte aérea e alongamento da mesma,

embora, deve-se ressaltar, culturas de suspensão celular possuem metabolismo bastante diferenciado de culturas de tecidos. Relatos de que o uso de diferentes composições de meio de cultura influenciam as respostas organogênicas do gênero *Pinus* são abundantes na literatura, como visto por Tang e Ouyang (1999) para *P. taeda*, Tang e Newton (2007) para *P. elliottii*, Lambardi *et al.* (1993) para *P. halepensis*, García-Ferriz *et al.* (1994) para *P. pinea* e Zhang *et al.* (2006) para *P. massoniana*.

Quanto à presença ou ausência de carvão ativado no meio de cultura, houve maior alongamento e menor formação de novas brotações com o acréscimo de carvão e, no meio desprovido de carvão, houve maior formação de brotações e menor alongamento, tanto para brotações apicais, quanto para segmentos nodais (dados não mostrados). Respostas semelhantes foram observadas para *P. caribaea*, *oocarpa* e *tecunumanii* (BAXTER *et al.*, 1989), *P. armandii* (ISHII *et al.*, 2007) e *P. pinaster* (ÁLVAREZ *et al.*, 2009).

Quanto à concentração de BAP, os melhores resultados para segmentos nodais foram obtidos com a concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , após oito semanas de cultivo, resultando em 89% de formação de brotações e quatro brotações por explante em média. Segmentos nodais puderam ser multiplicados sem a utilização de BAP, porém o uso desta citocinina em concentrações crescentes incrementou a porcentagem de formação de brotações e o número médio de brotações por explante. Os segmentos nodais, quando cultivados em concentrações menores que 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP apresentam formação de brotações similares a da testemunha sem reguladores (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram obtidos por Lambardi *et al.* (1994) e Nadwani *et al.* (2001) que verificaram que a adição de citocinina ao meio de cultura incrementou a multiplicação e proliferação de brotações axilares para *P. halepensis* e *P. kesiya*, respectivamente. Baxter *et al.* (1989) também verificaram que o uso de BAP em concentrações crescentes aumentou a multiplicação de brotações axilares em segmentos nodais de *P. caribaea*, *oocarpa* e *tecunumanii*, porém, a partir da concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ , os resultados começaram a decair. Baxter *et al.* (1989) notaram também que a concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP não diferiu da testemunha. Álvarez *et al.* (2009) observaram que em *P. pinaster* o desenvolvimento de gemas em brotações axilares foi possível com subcultivos em meio de cultura com baixas concentrações de citocininas, intercalados com

subcultivos em meio de cultura sem regulador, obtendo-se uma média de duas ou três brotações axilares vigorosas, semelhante ao observado no presente trabalho.

O uso de BAP foi necessário para estimular a formação de novas gemas em brotações apicais no presente estudo. Em meio de cultura desprovido de reguladores, a formação de brotações axilares é praticamente nula, diferentemente do que se observou para segmentos nodais. A melhor concentração de BAP para a formação de brotações axilares em brotações apicais foi a de 4,0  $\mu\text{M}$ , na qual os explantes apresentaram 62,2% de formação de brotações, porcentagem comparável ao obtido com segmentos nodais em meio sem reguladores (em torno de 70%).

Em contrapartida, a porcentagem de alongamento foi menor (60-90%) em meio  $\text{WV}_5$  com BAP do que a observada em subcultivo para meio  $\text{WV}_5$  sem BAP (em torno de 200%), condizente ao verificado por Amerson *et al.* (1985) para *P. taeda*, Kaul (1990) para *P. strobus* e Zel (1993) para *P. sylvestris*, os quais observaram que o aumento das concentrações de BAP aumentava o número de brotações adventícias obtidas, porém inibia ou atrasava o crescimento posterior das mesmas. Observou-se também no presente trabalho que concentrações elevadas de BAP podem ocasionar aumento da porcentagem de necrose ao longo de vários subcultivos. Deste modo, pode-se afirmar que, de forma semelhante ao padrão observado para o acréscimo de carvão ao meio de cultura, para a adição de citocininas as condições que propiciam melhor alongamento são antagônicas às que favorecem a formação de brotações axilares, o que se relaciona com a dominância do ápice em relação às gemas laterais, devido à produção de auxinas endógenas pelo mesmo. Amerson *et al.* (1985), Kaul (1990) e Zel (1993) observaram, para *P. taeda*, *P. strobus* e *P. sylvestris*, respectivamente, que o uso de concentrações crescentes de citocinina no meio de cultura aumentou o número de brotações adventícias formadas, porém comprometeu o alongamento das mesmas.

Para a variável porcentagem de brotações por explante foi verificada influência do genótipo. Verificou-se que a família F27 (2ª melhor no *ranking* da empresa) apresentou porcentagem significativamente maior de segmentos nodais com brotações (após quatro semanas de cultivo em meio  $\text{WV}_5$  com BAP) do que a obtida para o pomar comercial, e a família B05 (41º lugar no *ranking*) apresentou resultado numericamente intermediário. Essas respostas apresentam similaridade ao posicionamento das famílias no *ranking* da empresa Battistella, o qual leva em

consideração características de qualidade do fuste. Para confirmar se existem correlações são necessários mais estudos, com número maior de genótipos, e se tais relações se confirmarem é um fato positivo e desejável, uma vez que várias das características de *P. taeda* são herdadas de forma ligada uma a outra, e um bom desempenho a campo poderia não refletir necessariamente num melhor desempenho *in vitro* (SCHULTZ, 1997).

Quanto ao período de subcultivo, o período de oito semanas apresentou resultados superiores aos obtidos para quatro semanas, para os dois tipos de explantes utilizados na multiplicação. No entanto, Amerson *et al.* (1985) relataram que a exposição muito prolongada dos explantes à citocinina BAP pode acarretar crescimento lento das brotações obtidas nos subcultivos seguintes. Thorpe e Kumar (1993) enfatizaram que, uma vez presumida a existência de um período lag inicial, de aquisição da competência, antes do tecido se tornar induzido pelo estímulo específico a seguir uma morfogênese específica, é necessário determinar-se a exata duração da aquisição da competência celular, cultivando-se explantes por vários períodos de tempo antes de subcultiva-los para um meio de expressão morfogênica, de forma a obter-se uma equação que defina a curva de crescimento para a espécie. Para muitas espécies já existe a construção de curvas lag-log de crescimento, a partir de dados obtidos experimentalmente (TERMIGNONI, 2005), porém, até a presente data, não foram relatados trabalhos deste tipo para culturas organogênicas de *Pinus taeda*, sendo necessários mais estudos nesta área.

No presente trabalho, conseguiu-se a manutenção de explantes vigorosos e sem sintomas de deficiências nutricionais de *P. taeda* pelo período de 24 meses, superior ao observado para a mesma espécie por Handley *et al.* (1994) e por Jang e Tainter (1991), que conseguiram manter culturas por seis e dez meses, respectivamente. A manutenção se deu por meio de subcultivos sucessivos em meio de cultura WV<sub>5</sub>, alternando-se subcultivos com BAP com subcultivos sem reguladores por oito semanas (sem carvão ativado) ou por doze semanas (com 0,5% de carvão ativado) (dados preliminares). O subcultivo alternado, de meio de cultura com reguladores para a indução de respostas organogênicas, para meio de cultura desprovido de reguladores (com ou sem carvão ativado) é um procedimento recomendado para o cultivo *in vitro* de coníferas (MOTT; AMERSON, 1981; WEBB *et al.*, 1988; ÁLVAREZ *et al.*, 2009).



#### 6.4 INFLUÊNCIA GENOTÍPICA

No presente trabalho verificou-se a influência do genótipo nas respostas obtidas para indução, tanto entre indivíduos de uma mesma família quanto entre as diferentes famílias (dados preliminares, não mostrados), apresentando relação com resultado obtido na multiplicação de segmentos nodais e com o *ranking* da empresa Battistella, ordenado de acordo conforme a melhor qualidade de fuste. Nos primeiros estudos feitos pela Westvasco, as famílias geneticamente superiores de *Pinus taeda* responderam bem ao processo de regeneração de cotilédones desenvolvido por Mott e Amerson (1981) e todas as famílias testadas produziram brotações (HANDLEY *et al.*, 1994), havendo evidência que a família tem influência na produção de brotações, apesar de não ter sido confirmado se a capacidade de propagação estava ou não correlacionada com características no campo como crescimento em altura ou volume.

A variação genotípica também foi observada no trabalho de Handley *et al.* (1994) com resultados da ordem de 30 a 96% de formação de brotações em cotilédones cultivados (de genótipos individuais) de uma mesma família, bem como variação de com 60 a 88% dos explantes produziram brotações, com um número de 13 a 25 brotações produzidas por semente entre cinco famílias de polinização aberta. Tang *et al.* (1998) também relataram que a constituição genética das sementes de *Pinus taeda* tem um grande impacto nas respostas obtidas *in vitro*. Tang e Guo (2001), comparando os resultados de oito genótipos de *P. taeda*, verificaram que a frequência de indução de brotações adventícias variou de 8,7 a 27,8%, mesmo utilizando material bastante juvenil, como cotilédones e hipocótilos de embriões zigóticos maduros. Segundo Mott *et al.* (1977), a capacidade de produzir brotações e o número de brotações produzidas é dependente do genótipo do explante. Jang e Tainter (1991) verificaram variações da ordem de 28 a 101 brotações por indivíduo após 20 semanas de subcultivo, para duas procedências de *P. taeda*.

## 6.5 ENRAIZAMENTO *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO

Brotações obtidas em cultivo *in vitro* durante 12 a 24 meses, principalmente em meio WV<sub>5</sub>, apresentaram capacidade de enraizamento. Este resultado diferiu do obtido por Jang e Tainter (1991), que não observaram enraizamento em brotações de *P. taeda*, *P. echinata* e *P. virginiana* com mais de oito meses de cultura *in vitro* em meio GD (GRESSHOFF; DOY, 1972) ou Litvay (LITVAY *et al.*, 1981).

Houve ocorrência de enraizamento espontâneo no presente trabalho, porém em baixíssima frequência, não ultrapassando 1%. Isso confirma o relatado por Diaz-Sala *et al.* (1996) que observaram que o enraizamento adventício de *Pinus taeda* é dependente da aplicação de auxina exógena.

No presente trabalho seguiu-se o proposto por Mehra-Palta *et al.* (1978), os quais usaram a combinação de ANA e BAP para indução de raízes obtendo melhores resultados do que com ANA isolado. O acréscimo de outros reguladores, além de uma auxina, foi visto como fundamental para aumentar as taxas de enraizamento de brotações micropropagadas de *P. taeda* (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978; TANG; OUYANG, 1999).

Observou-se influência da formulação salina na indução ao enraizamento de brotações de *P. taeda*. Usando-se meio de cultura WV<sub>3</sub> (o único enriquecido com L-glutamina – ANEXO 14) não houve enraizamento e em meio WV<sub>5</sub> o enraizamento foi baixo, sendo observado alongamento e formação de brotações axilares (não observados nas outras formulações). O meio GDm, com concentrações salinas mais baixas que os meios WV<sub>3</sub> e WV<sub>5</sub>, e mesmo a formulação ágar-água, praticamente desprovida de sais, foram as formulações que permitiram maior porcentagem de enraizamento, entre 35,0 e 55,6%. Oliveira (2011) verificou que a presença de sais no meio de cultura não foi importante para a indução ao enraizamento adventício de brotações de *P. taeda*. Webb *et al.* (1988) obtiveram maior sucesso de enraizamento *in vitro* de *Pinus ponderosa* utilizando meio de cultura ágar-água para a indução do que outras formulações, como foi observado no presente trabalho, para o *Pinus taeda*.

Foi realizado um teste preliminar (dados não mostrados) para tentar novamente enraizar as brotações não enraizadas em meios WV<sub>5</sub> e WV<sub>3</sub>, realizando-se subcultivo prévio de todas as brotações para WV<sub>5</sub> sem reguladores, seguido de nova indução ao enraizamento nas formulações GDm/2 e ágar-água acrescidas de

2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP durante nove dias e subcultivo para meio GDm/2 com 20  $\text{g.L}^{-1}$  sacarose sem reguladores. Obteve-se, após seis semanas, cerca de 50% de enraizamento. Isto é um indício de que o baixo percentual de enraizamento obtido para os meios de cultura WV<sub>3</sub> e WV<sub>5</sub> foi um efeito da composição de sais destes meios, e não um efeito intrínseco daquelas brotações específicas, ou de reguladores utilizados em etapas anteriores.

Levando-se em conta que o meio de cultura WV<sub>5</sub> apresentou melhor desempenho para o alongamento e número de brotações por explante do que o meio GDm, pode-se inferir que há indício de que as condições para desenvolvimento de parte aérea e desenvolvimento de raízes requerem diferentes concentrações de sais, e que determinada formulação pode ter efeito inibitório sobre uma ou outra resposta morfogênética. As maiores concentrações de nitrogênio, inorgânico e orgânico, nos meios WV<sub>5</sub> e WV<sub>3</sub> do que nos meios GDm e ágar-água podem explicar os resultados obtidos, pois o nitrogênio é um nutriente que aumenta a razão entre parte aérea e raízes, ou seja, promove uma abundância de folhagem e sistema radicial de tamanho mínimo (SALISBURY, 1992; TINGEY *et al.*, 1996). Oliveira (2011) também observou que não há necessidade de sais durante o período de indução para aquisição de competência ao enraizamento por brotações multiplicadas *in vitro* de *P. taeda*, contudo fez a ressalva de que no período de expressão (subcultivo sem reguladores) a presença dos sais GDm/2 faz diferença, promovendo o enraizamento, enquanto que a ausência de sais no mesmo período reduz significativamente as porcentagens de enraizamento.

Quanto à influência do meio de cultura, outros trabalhos relataram resultados similares ao obtido no presente estudo. Tang e Newton (2007), comparando o desempenho de seis diferentes formulações de meio de cultura, verificaram que para o enraizamento adventício de brotações de *P. elliotii* há interferência do meio de cultura utilizado e que as maiores frequências foram observadas para os meios TE e SH. Jang e Tainter (1991) também verificaram influência do meio de cultura no enraizamento adventício de *P. taeda*, *P. echinata* e *P. virginiana* com o uso dos meios GD e Litvay, inclusive com interferência do meio de subcultivo anterior, para alongamento, sendo encontrado melhor resultado para o meio Litvay. O uso de redução da concentração salina do meio basal utilizado e da concentração de sacarose para o enraizamento é prática freqüente em protocolos de organogênese

de *Pinus* spp (ORDÁS *et al*, 2007; TANG; NEWTON, 2007) e prepara os explantes enraizados para melhor sobrevivência na aclimatização (CHANDRA *et al.*, 2010).

As porcentagens de enraizamento obtidas no presente trabalho são similares às obtidas por Mehra-Palta *et al.* (1978), que observaram 50% de enraizamento *in vitro* para *P. taeda*. Porém, no presente trabalho, os primeiros primórdios foram vistos após duas semanas do período de nove dias de indução com reguladores, enquanto que no trabalho de Mehra-Palta *et al.* (1978) os primeiros primórdios foram vistos após cinco meses de manutenção contínua em meio com reguladores. Portanto, o presente estudo conseguiu reduzir o período necessário para a obtenção de primórdios radiciais com relação ao trabalho de Mehra-Palta *et al.* (1978), com o uso da metodologia indicada por Amerson *et al.* (1985) de manutenção meio com em reguladores por poucos dias seguida de subcultivo em meio sem reguladores. O presente estudo também reduziu o tempo para a formação de primórdios radiciais quando comparado ao trabalho de Tang e Ouyang (1999), que obtiveram enraizamento após seis semanas em cultura.

Fatores genéticos podem ter influenciado os resultados obtidos, pois tratamentos idênticos (com as formulações GDm e ágar-água) apresentaram porcentagens diversas de formação de raízes. Isto foi verificado quando se observou a porcentagem de enraizamento obtida no experimento de comparação de quatro formulações de meio de cultura, com explantes apenas da família F27, (17,9% de enraizamento para GDm e 35,0% para ágar-água) com o obtido no experimento de comparação dos fatores meio de cultura e concentração de sacarose, no qual haviam explantes dos três genótipos estudados, F27, B05 e PC: 40,5% e 55,6% de enraizamento para os tratamentos equivalentes de GDm e ágar-água, respectivamente. Isto é condizente com o trabalho de Tang e Ouyang (1999) que observaram diferenças de enraizamento para seis famílias de *P. taeda*, com porcentagem de sucesso variando entre 8,7 a 46,7%, em meio TE suplementado com ácido indolbutírico, BAP e ácido giberélico.

No presente trabalho, foi obtido o enraizamento *in vitro*, seguido de aclimatização posterior para substrato. Apesar de autores como Rocha e Niella (2002) indicarem o enraizamento *ex vitro* para *P. taeda*, até o presente momento a grande maioria das tentativas bem sucedidas foram com a metodologia do enraizamento *in vitro*. Mehra-Palta *et al.* (1978) conseguiram enraizar brotações de

*P. taeda ex vitro* e, embora tenham obtido menor número de mudas sobreviventes, as mudas produzidas *ex vitro*, quando enraizadas, apresentam melhor desenvolvimento de raízes do que as mudas enraizadas *in vitro*.

O enraizamento *ex vitro* necessitaria de mais cuidados na aclimatização do que o enraizamento *in vitro*, pois enquanto as brotações apicais não estiverem enraizadas, elas estarão muito susceptíveis à desidratação, pela menor umidade relativa e maior luminosidade e temperatura das condições de casa-de-vegetação do que brotações enraizadas. Chandra *et al.* (2010) relataram que é alta a mortalidade observada após a transferência de microbrotações para as condições *ex vitro*, visto que plantas micropropagadas não possuem estômatos funcionais, cutícula pouco desenvolvida, anatomia e fisiologia alterados. Melhores resultados, para várias espécies vegetais, foram obtidos quando a alteração de condições ambientais foi feita de maneira gradual, e fatores como redução da concentração de sacarose do meio de cultura, redução da umidade relativa pela alteração da vedação de frascos, exposição à luz natural difusa, uso de antitranspirantes e retardantes de crescimento, uso de ácido abscísico e ácido ascórbico e co-cultivo com microorganismos que a planta irá encontrar a solo, são exemplos de alternativas que poderiam ser utilizadas com este objetivo (CHANDRA *et al.*, 2010)

No presente trabalho, obteve-se maior sucesso na aclimatização quanto maior foi o controle na redução da umidade relativa para as mudas enraizadas. As mudas que foram transferidas diretamente para casa-de-vegetação apresentaram as maiores porcentagens de mortalidade após 30 dias, restando apenas 11,8% de mudas sobreviventes, e após 40 dias, quando a sobrevivência foi 0%. A manutenção de mudas enraizadas em substrato na sala-de-crescimento, com frascos abertos, pouco diferiu da aclimatização direta para casa-de-vegetação, apresentando sobrevivência um pouco superior após 30 dias (18%) e sobrevivência de 10% das mudas após 40 dias. Os melhores resultados foram obtidos com a manutenção por 10 dias em frascos vedados com plástico filme, que permite uma troca gasosa maior do que as tampas de polipropileno, e retém mais umidade do que o frasco aberto. Plantas produzidas por este sistema tiveram uma sobrevivência de 85% após 40 dias de aclimatização.

Resultados semelhantes foram vistos por Ordás *et al.* (2007) que obteve, para *P. pinea* sobrevivência de 98% das mudas realizando transferência das mudas do

meio de cultura para “multipots” com substrato e manutenção por três semanas em sala de crescimento em condições de umidade decrescente, e por Tang e Newton (2007) obtiveram, para *P. elliotii*, mais de 90% de plantas aclimatizadas sobreviventes em casa de vegetação, ao realizarem um período prévio de adaptação de uma semana em sala de crescimento, com as plantas enraizadas mantidas em frascos contendo substrato. Tang e Ouyang (1999) também optaram pela aclimatização prévia em sala de crescimento, mantendo mudas enraizadas de *P. taeda* em recipientes plásticos com substrato esterilizado durante cinco semanas em sala de crescimento antes do transplante a campo, obtendo sobrevivência superior a 80%.

A época em que foi realizada a aclimatização também pode ter sido de grande importância para a sobrevivência das mudas: as duas primeiras aclimatizações foram realizadas no inverno e a terceira foi realizada durante a primavera, quando as temperaturas na casa-de-vegetação estavam mais elevadas.

## 7 CONCLUSÕES

Foi estabelecido um protocolo de micropropagação a partir de plântulas de cinco e dez dias de germinação para a propagação de *Pinus taeda* L..

O genótipo influenciou as respostas de germinação de sementes, de indução e de multiplicação de brotações *in vitro* de *P. taeda*.

O meio de cultura WV<sub>5</sub> foi superior para a indução, manutenção e multiplicação de brotações.

Explantos com cinco dias de germinação responderam melhor e mais rapidamente à indução de brotações múltiplas do que os explantes com dez dias de germinação.

A combinação de 44 µM de BAP e 0,05 µM de ANA foi a mais efetiva para a indução da formação de brotações adventícias e/ ou axilares.

A multiplicação pode ocorrer de duas formas, com brotações apicais que irão alongar e permitir o seccionamento de nós, e com segmentos nodais por meio do desenvolvimento de brotações axilares.

O comprimento de 1,0 cm foi o mais adequado para a multiplicação de brotações axilares a partir de segmentos nodais.

Para brotações apicais, o comprimento de 1,0 cm favoreceu a formação de brotações axilares, e o comprimento de 0,5 cm favoreceu o alongamento permitindo o seccionamento de nós.

O melhor período de duração para os subcultivos foi de oito semanas, tanto para segmentos nodais quanto para brotações apicais.

As condições que propiciaram o alongamento são antagônicas às condições que favoreceram a formação de brotações axilares e/ ou adventícias.

Foi possível manter brotações vigorosas durante dois anos, permitindo a manutenção de um microjardim clonal *in vitro*.

O enraizamento *in vitro* não necessita de sais durante o período de nove dias de indução com 2,68 µM de ANA e 0,44 µM de BAP.

O meio de cultura GDm com concentração de sais reduzida à metade, desprovido de reguladores vegetais e acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi recomendado para a expressão e desenvolvimento de raízes.

A aclimatização com abertura gradativa de tampas dos frascos em sala de crescimento com posterior transferência para casa-de-vegetação permitiu a sobrevivência de 85% das mudas enraizadas após 40 dias.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Recomenda-se a realização de estudos anatômicos para a verificação da origem das brotações obtidas.

É necessária a verificação da influência dos genótipos F27, B05 e PC quanto ao enraizamento *in vitro*.

São necessários estudos com maior número de famílias para estabelecer relações entre o desenvolvimento *in vitro* e o desempenho à campo.

Sugere-se a construção de curvas de crescimento para culturas organogénéticas da espécie, por meio da avaliação da porcentagem de explantes com brotações, porcentagem de alongamento e incremento da massa fresca e/ ou seca, em intervalos de tempo regulares, em um gradiente de condições que influenciam o crescimento (como a ausência ou presença de reguladores vegetais, bem como sua concentração em meio de cultura, e a presença ou não de carvão ativado) ao longo de vários subcultivos sucessivos, a fim de estabelecer com precisão o período necessário para a promoção de uma determinada resposta desejada que não comprometa as respostas em subcultivos posteriores.



## **FIGURAS**

## FIGURA 1: PREPARO DOS EXPLANTES

FIGURA 1A: Sementes de *P. taeda*, da família selecionada F27, após cinco dias de germinação. FIGURA 1B: Plântula de *P. taeda* após cinco dias de germinação com radícula e megagametófito removidos com o uso de bisturi. FIGURA 1C: Explante obtido de plântula de *P. taeda* com cinco dias de germinação recém inoculado em meio de cultura WPM acrescido de 44  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA. FIGURA 1D: Plântula de *P. taeda* com dez dias de germinação, após remoção da radícula e dos ápices dos cotilédones, para a obtenção de explante de comprimento total de 3,0 cm. FIGURA 1E: Explantes obtidos de plântulas de *P. taeda* com dez dias de germinação após uma semana em meio de cultura MS sem reguladores vegetais; FIGURA 1F: Explantes obtidos de plântulas de *P. taeda* com dez dias de germinação após subcultivo para meio  $\text{WV}_5$  acrescido de 44  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA.

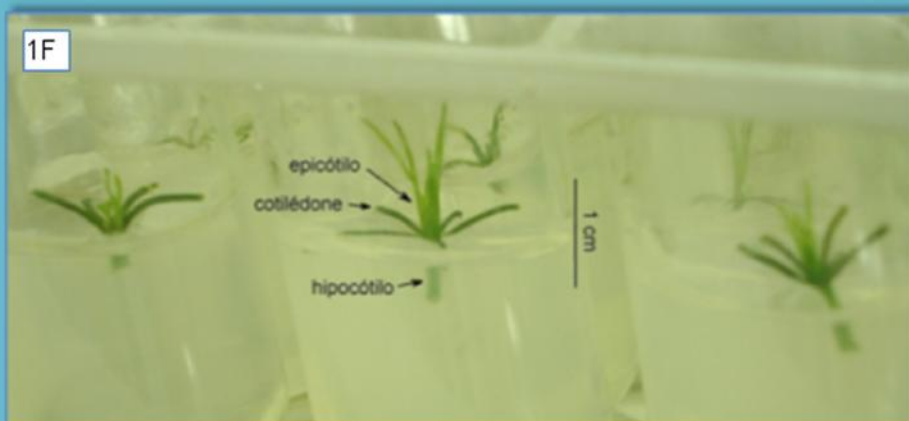
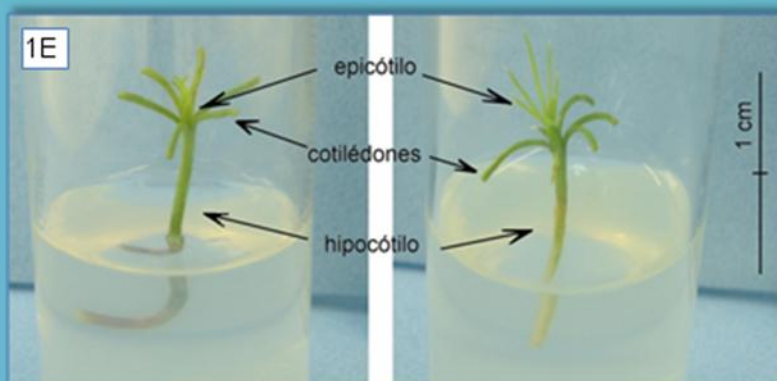
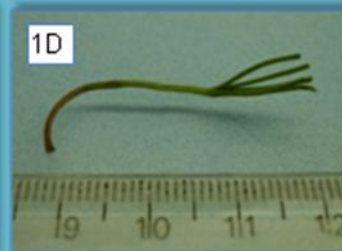
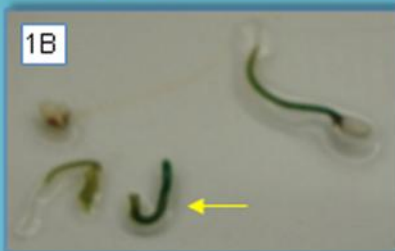
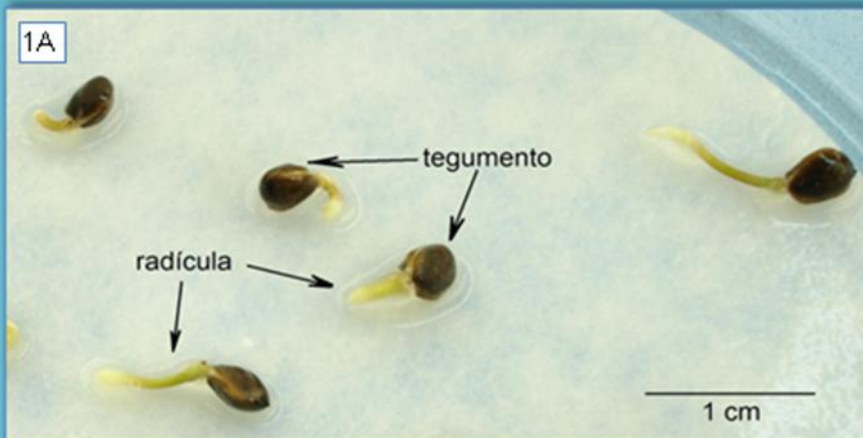


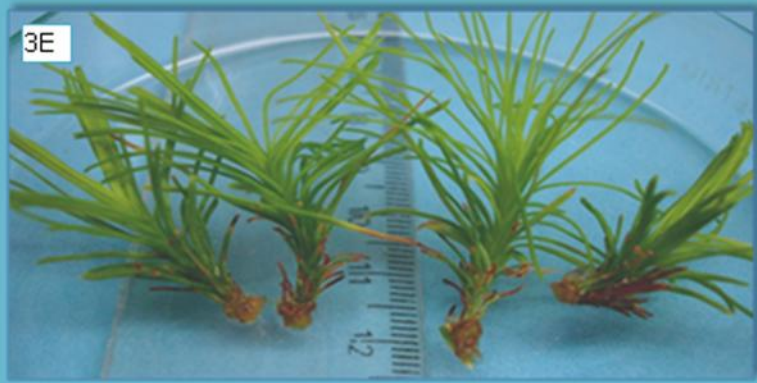
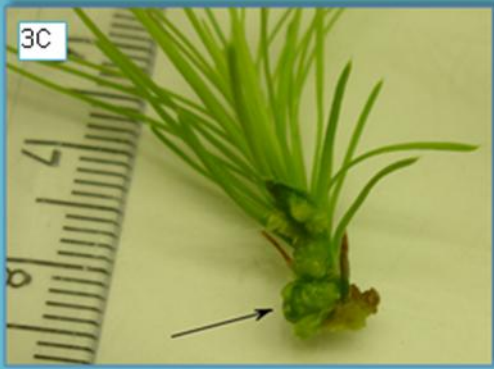
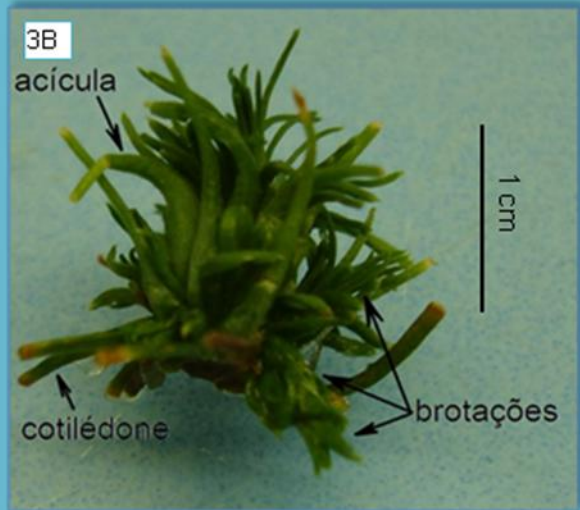
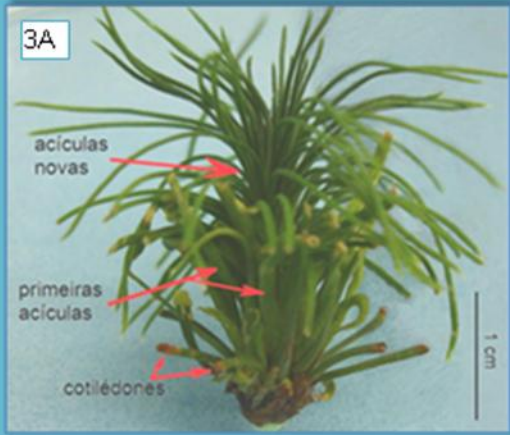
FIGURA 2: INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS – EXPLANTES OBTIDOS A PARTIR DE PLÂNTULAS DE CINCO DIAS DE GERMINAÇÃO

FIGURA 2A: Brotações adventícias e/ou axilares sobre cotilédone de explante de plântula de *P. taeda* de cinco dias de germinação, após quatro semanas em meio de cultura WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais. FIGURA 2B: Brotações adventícias sobre ápice de cotilédone de explante de cinco dias de germinação após quatro semanas do segundo subcultivo consecutivo em meio de cultura WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais. FIGURA 2C: Brotações adventícias e/ou axilares sobre cotilédone de explante de plântula de *P. taeda* de cinco dias de germinação, após quatro semanas em meio de cultura WPM sem reguladores vegetais. FIGURA 2D: Brotações alongadas em explante de *P. taeda* de cinco dias de germinação após quatro semanas do segundo subcultivo consecutivo em meio de cultura WPM sem reguladores.



### FIGURA 3: INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS – EXPLANTES OBTIDOS A PARTIR DE PLÂNTULAS DE DEZ DIAS DE GERMINAÇÃO

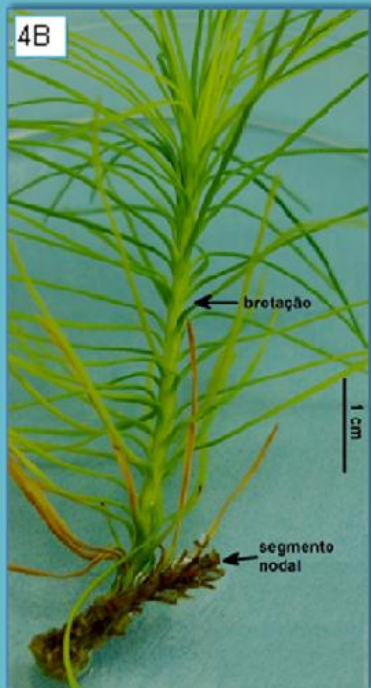
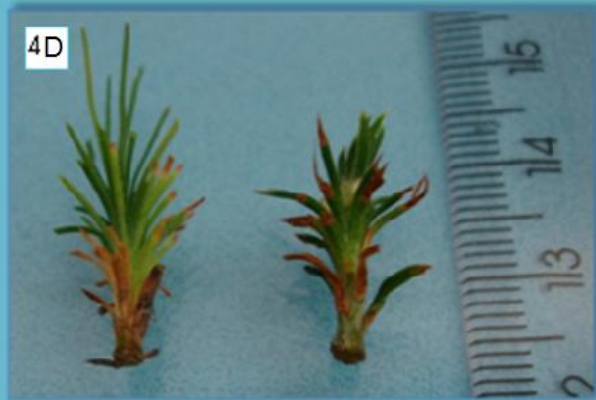
FIGURA 3A: Explante obtido de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas em meio de cultura WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais e com 0,5% de carvão ativado, sem formação de brotações múltiplas. FIGURA 3B: Brotações axilares em explante obtido de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas em meio de cultura WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais e com 0,5% de carvão ativado. FIGURA 3C: Primórdios de brotações adventícias sobre acícula de explante de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas em meio de cultura WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais e com 0,5% de carvão ativado. FIGURA 3D: Brotações múltiplas em explante obtido de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas do primeiro subcultivo para meio WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais e sem carvão. FIGURA 3E: Brotações múltiplas individualizadas, obtidos a partir de explante de plântula de dez dias de germinação de *P. taeda*, após seis semanas do primeiro subcultivo para meio WV<sub>5</sub> sem reguladores vegetais e sem carvão.



#### FIGURA 4: MULTIPLICAÇÃO A PARTIR DE GEMAS AXILARES

FIGURA 4A: Brotações axilares em segmento nodal de 2,0 a 2,9 cm, após quatro semanas em meio de cultura  $WV_5$  acrescido de  $0,1 \mu M$  de BAP e após oito semanas de subcultivo em meio  $WV_5$  sem reguladores vegetais. FIGURA 4B: Brotações axilares em segmento nodal de 3,0 a 4,0 cm, após quatro semanas em meio de cultura  $WV_5$  acrescido de  $0,1 \mu M$  de BAP e após oito semanas de subcultivo em meio  $WV_5$  sem reguladores vegetais. FIGURA 4C: Brotações axilares em segmento nodal de 1,0 cm de comprimento, em explante da família F27, após quatro semanas em meio  $WV_5$  acrescido de  $2,5 \mu M$  de BAP. FIGURA 4D: Alongamento de brotação apical de *Pinus taeda*, de comprimento inicial de 1,0 cm, após oito semanas em meio GDM sem reguladores. FIGURA 4E: Alongamento de brotação apical de *Pinus taeda*, de comprimento inicial de 1,0 cm, após oito semanas em meio  $WV_5$  sem reguladores. FIGURA 4F: Brotações axilares em brotação apical de *Pinus taeda*, de comprimento inicial de 1,0 cm, após oito semanas em meio  $WV_5$  acrescido de  $4,0 \mu M$  de BAP.





## FIGURA 5: ENRAIZAMENTO

FIGURA 5A: Raiz adventícia em vista lateral, após duas semanas em meio de cultura GDM com concentração de sais reduzida à metade,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e sem reguladores vegetais, induzida ao enraizamento durante nove dias em ágar-água sem sacarose acrescido de  $2,68 \mu\text{M}$  de ANA e  $0,44 \mu\text{M}$  de BAP. FIGURA 5B: Primórdios radiciais e raiz adventícia vistos de baixo, formados após duas semanas em meio de cultura GDM com concentração de sais reduzida à metade,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e sem reguladores vegetais, induzida ao enraizamento durante nove dias em ágar-água sem sacarose acrescido de  $2,68 \mu\text{M}$  de ANA e  $0,44 \mu\text{M}$  de BAP. FIGURA 5C: Escurecimento de raízes e formação de raízes secundárias em brotação enraizada, após seis semanas em meio de cultura GDM com concentração de sais reduzida à metade,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e sem reguladores vegetais, com indução ao enraizamento ocorrida em meio de cultura GDM com redução da concentração de sais à metade,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $2,68 \mu\text{M}$  de ANA e  $0,44 \mu\text{M}$  de BAP, durante nove dias. FIGURA 5D: Presença de calo, escurecimento de raízes e formação de raízes secundárias em brotação enraizada, após seis semanas em meio de cultura WV<sub>5</sub> com concentração de sais reduzida à metade,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e sem reguladores vegetais, com indução ao enraizamento ocorrida em meio de cultura WV<sub>5</sub> com redução da concentração de sais à metade,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $2,68 \mu\text{M}$  de ANA e  $0,44 \mu\text{M}$  de BAP, durante nove dias.

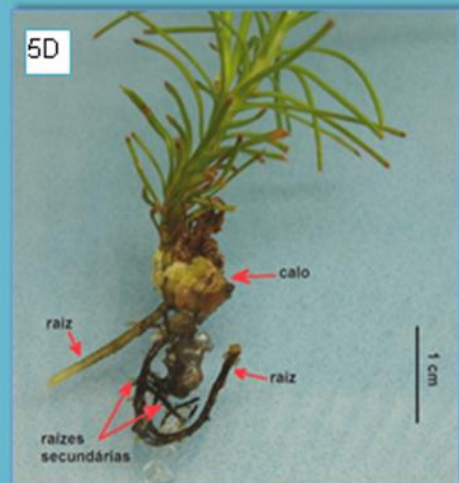
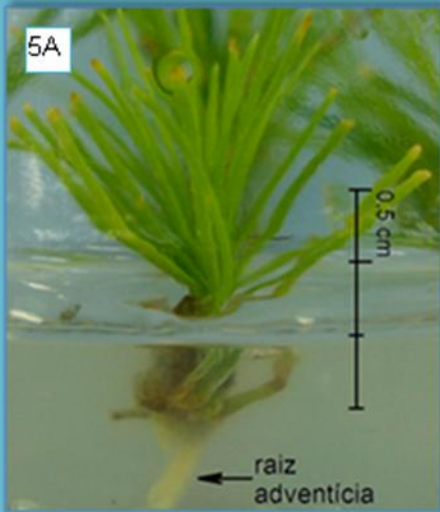
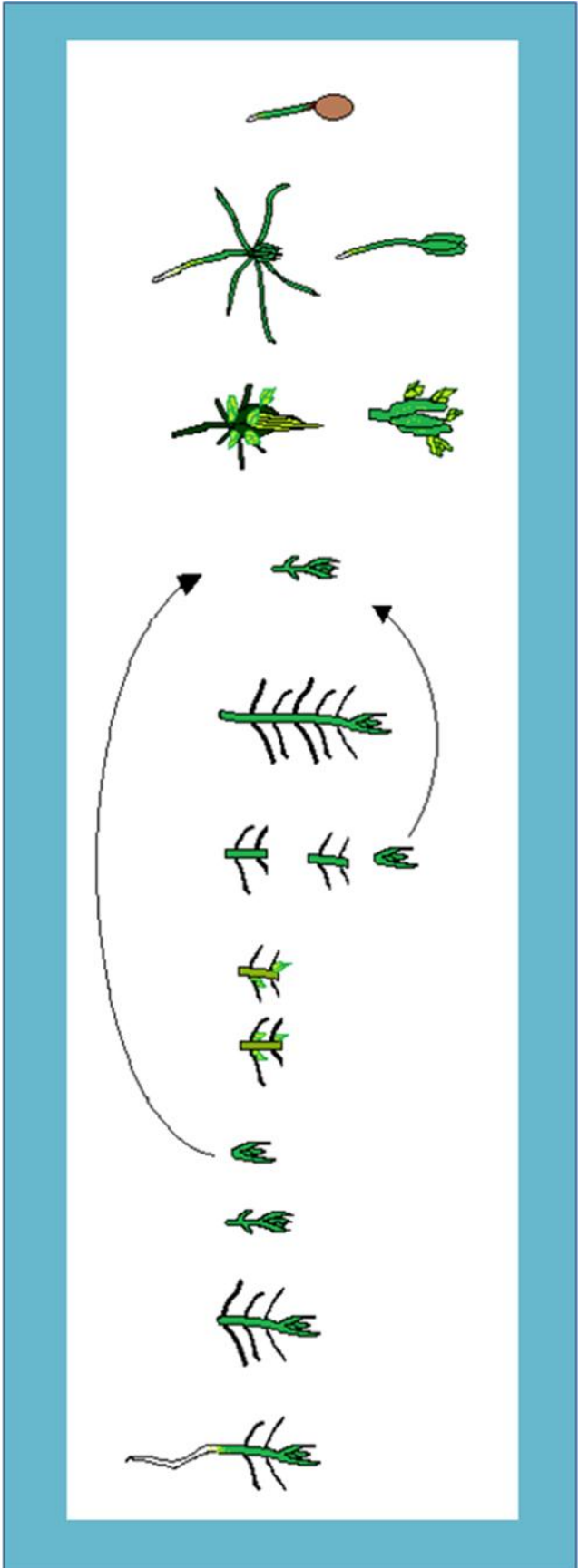


FIGURA 6: ESQUEMA ILUSTRANDO AS ETAPAS PARA A REALIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, M. R. Micropropagation à la carte. In: AHUJA, M. R. (Ed.) **Forestry Sciences – Micropropagation of Woody Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 41, p. 3-9, 1993.
- AITKEN, J.; HORGAN, K. J.; THORPE, T. A. Influence of explant selection on shoot forming capacity of juvenile tissues of *Pinus radiata*. **Canadian Journal of Forestry Research**. Ottawa, v. 11, p. 112-117, 1981.
- AITKEN-CHRISTIE, J.; SINGH, A. P.; HORGAN, K. J.; THORPE, T. A. Explant developmental state and shoot formation in *Pinus radiata* cotyledons. **Botanical Gazette**. Chicago, v. 146, n. 2, p. 196-203, 1985.
- ALCANTARA, G. B.; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S. Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**. Viçosa, v. 31, n. 3, p. 399-404, 2007.
- ALCANTARA, G. B.; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Efeitos do ácido indolbutírico (AIB) e da coleta de brotações em diferentes estações do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Scientia Florestalis**. Piracicaba, v. 36, n. 78, p. 151-156, jun 2008.
- ÁLVAREZ, J. M.; MAJADA, J.; ORDÁS, J. An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) isolated cotyledons. **Forestry**. Oxford, v. 82, p. 175-184, 2009.
- AMERSON, H. V.; FRAMPTON, L. J. Jr.; McKEAND, S. E.; MOTT, R. L.; WEIR, R. J. Loblolly pine tissue culture: laboratory, greenhouse and field studies. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A.; WILSON, C. M. **Tissue culture in forestry and agriculture**. Plenum Press, New York, p. 271-287, 1985.
- ANDREJOW, G. M. P.; HIGA, A. R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. provenientes de brotação apical de mudas jovens. **Floresta**. Curitiba, v. 39, n. 4, p. 897-903, out/dez 2009.
- ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Conifer Somatic Embryogenesis, Embryo Development, Maturation Drying, and Plant Formation. In: GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. (Eds.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: fundamental methods**. Springer-Verlag, Berlin, p. 103-113, 1995.
- BALLARIN, A. W.; PALMA, H. A. L. Propriedades de resistência e rigidez da madeira juvenil e adulta de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**. Viçosa, v. 27, n. 3, p. 371-380, 2003.
- BARRICHELO, L. E. G.; KAGEYAMA, P. Y.; SPELZ, R. M.; BONISH, H. J.; BRITO, J. O.; FERREIRA, M. Estudos de procedências de *Pinus taeda* visando seu aproveitamento industrial. **Boletim Informativo do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. Piracicaba, v. 6, n. 18, p. 4-11, jul 1978.

BAXTER, R.; BROWN, S. N.; ENGLAND, N. F.; LUDLOW, C. H. M.; TAYLOR, S. L.; WOMACK, R. W. Production of clonal plantlets of tropical pine in tissue culture via axillary shoot activation. **Canadian Journal of Forest Research**. Ottawa, v. 19, p. 1338-1342, 1989.

BOGNOLA, I. A.; RIBEIRO Jr., P. J.; SILVA, E. A. A.; LINGNAU, C.; HIGA, A. R. Modelagem uni e bivariada da variabilidade espacial de rendimento de *Pinus taeda* L. **Floresta**. Curitiba, v. 38, n. 2, abr/jun 2008.

BONGA, J. M. Adventitious shoot formation in cultures of immature female strobili of *Larix decidua*. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v. 62, p. 416-421, 1984.

BONGA, J.M.; Von ADERKAS, P. **In vitro culture of trees – Forestry Series**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 38, p. 66-106, 1992.

CAMPBELL, R. A.; DURZAN, D. J. Vegetative propagation in *Picea glauca* by tissue culture. **Canadian Journal of Forestry Research**. Ottawa, v. 6, n. 26, p. 240-243 1976.

CHALUPA, V. Organogenesis in Norway spruce and Douglas fir buds *in vitro*. **Commun. Inst. For. Czechosl.** v.10, p.79-87, 1977.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**. Leiden, v.32, n.9, p.1199-1205, set 2010.

CHANG, S.; SEN, S.; McKINLEY, C. R.; AIMERS-HALLIDAY, J.; NEWTON, R. J. Clonal propagation of Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.) by organogenesis. **Plant Cell Reports**. Berlin, v. 10, p. 131-134, 1991.

CHENG, T. Y. Factors affecting adventitious bud formation of cotyledon culture of Douglas fir. **Plant Science Letters**. Dublin, v.9, n.2, p. 179-187, jun 1977.

COKE, J.E. Basal nutrient medium for in vitro cultures of Loblolly pines. US Patent 5534434. 1996a. Disponível online: <http://www.freepatentsonline.com/5534434.html> Acesso em fev/2009.

COKE, J.E. Basal nutrient medium for in vitro cultures of Loblolly pines. US Patent 5534433. 1996b. Disponível on line: <http://www.freepatentsonline.com/5534433.html> Acesso em fev/2009.

DHUMALE, D. B.; NEWTON, R. J. Effect of mannitol induced stress and ABA on shoot enhancement from apical meristems in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Indian Journal of Plant Physiology**. New Delhi, v. 1, n. 3, p. 214-215, jul/set 1996.

DIAZ-SALA, C.; HUTCHINSON, K.; GOLDFARB, B; GREENWOOD, M. S. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: The role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, n. 97, p. 481-490, 1996.

DUNSTAN, D. I.; MOHAMMED, G. H.; THORPE, T.A. Shoot production and elongation on explants from vegetative buds excised from 17- to 20-year-old *Pseudotsuga menziesii*. **New Zealand Journal of Forestry Science**. Wellington, v. 16, p. 269-282, 1986.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agroambiente**. Boa Vista, v.4, n.2, p.102-109, jul/dez 2010.

FONSECA, S. M.; KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M.; JACOB, W. S. Síntese do Programa de Melhoramento Genético de *Pinus* spp. que vem sendo conduzido, sob a coordenação do IPEF, na Região Sul do Brasil. **Boletim Informativo do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. Piracicaba, v. 6, n. 18, p.44-52, jul 1978.

FOSTER, G.S. Genetic control of rooting ability of stem cuttings from loblolly pine. **Canadian Journal of Forest Research**. Ottawa, v.20, p. 1361-1368, 1990.

FRANKLIN, C. I.; DIXON, R. A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Eds.). **Plant Cell Culture: a practical approach**. New York: Oxford University Press, p.1-26, 1994.

GARCÍA-FÉRRIZ, L.; SERRANO, L.; PARDOS, J. A. In vitro shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Stone Pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Berlin, v. 36, p. 135-140, 1994.

GEORGE, E. F.; HALL, M. H.; DE KLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer, Berlin, 3 ed., v. 1, 2008, 501p.

GOLLE, D. P. **Germinação in vitro de *Pinus taeda* L. a partir de genótipos sementes selecionadas**. Santa Maria, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, 94p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, Brasília, v. 1, p. 183-260, 1998.

GREENWOOD, M.S.; HUTCHINSON, K.W. Maturation as a developmental process. In: AHUJA, M.R.; LIBBY, W.J. (Eds.) **Clonal Forestry: Genetics, Biotechnology and Application**. Springer-Verlag, New York, p. 14-33, 1993.

GREENWOOD, M. S.; WEIR, R. J. Genetic variation in rooting ability of loblolly pine cuttings: effects of auxin and family on rooting by hypocotyls cuttings. **Tree Physiology**. v. 15, p. 41-45, 1995.

GRESSHOFF, P. M.; DOY, C.H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Planta**. Berlin, v. 107, p. 473-497, 1972.



GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B.; Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, Brasília, v. 2, p.533-568, 1999.

GUPTA, P. K; DURZAN, D. J. Shoot multiplication from matures trees of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii*, and sugar pine, *Pinus lambertiana*. **Plant Cell Reports**. Berlin, v. 4, p. 177-179, 1985.

HANDLEY, L. W. BECWAR, M. R.; CHESICK, E. E.; COKE, J. E.; GODBEY, A. P.; RUTTER, M. R. Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine. **Tappi Journal**. Norcross, v. 78, n. 5, p. 169-175, 1995.

HARGREAVES, C.; MENZIES, M. Organogenesis and cryopreservation of juvenile radiate pine. In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (eds.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer-Verlag, Berlin, p. 51-65, 2007.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES Jr., F. T.; GENEVE, R. L. **Hartmann and Kester's Plant propagation - principles and practices**. Prentice Hall, New Jersey, 8 ed., 2011, 915 p.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. In vitro culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T.A. (Eds.) **Plant Cell and Tissue Culture**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.539-560, 1994.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**. v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

HORGAN, K. Cap. 10 - *Pinus radiata*. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D.J. (Eds.) **Forestry Sciences – Cell and Tissue Culture in Forestry, Volume 3 – Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987, v. 3, p. 128-145.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE**. Curitiba, 1997. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná, 200p.

ISHII, K.; HOSOI, Y.; MARUYAMA, E. Micropropagation of *Pinus armandii* var *amamiana*. In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (eds.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer-Verlag, Berlin, p. 41-50, 2007.

JANG, J. C.; TAINTER, F. H. Micropropagation of shortleaf, Virginia and loblolly pine x shortleaf pine hybrids via organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Berlin, v. 25, p. 61-67, 1991.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Sunderland, 3 ed., p. 210-213, 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; TORRES, M.A.V.; BASHER, L.B. **Árvores Exóticas no Brasil – madeiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2003, 368 p.

KAUL, K. Factors influencing *in vitro* micropropagation of *Pinus strobus* L. **Biologia Plantarum**. Praha, v. 32, n. 4, p. 266-272, 1990.

LAMBARDI, M.; SHARMA, K.K.; THORPE, T.A. Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). **In vitro cellular and developmental biology - plant**. v. 29, p.189-199, 1993.

LI, X. Y.; HUANG, F. H.; GBUR Jr., E.E. Effect of basal medium, growth regulators and Phytigel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Plant Cell Reports**. Berlin, v.17, p. 298-301, 1998.

LIBBY, W. J.; AHUJA, M. R. Micropropagation and clonal options in forestry. In: AHUJA, M. R. (Ed.) **Micropropagation of Woody Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.425-442, 1993.

LITVAY, J.D.; JOHNSON, M.A; VERMA, D.; EINSPAHR, D.; WEYRAUCH, K. **Conifer suspension culture medium development using analytical data from developing seeds**. Institute Paper Chemistry – Tech. Paper Series, Appleton, n. 115, 1981, 17p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society**. Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

MAENE, L.J.; DEBERGH, P.C. Cap.14 – *Araucaria*. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D.J. (Eds.) **Forestry Sciences – Cell and Tissue Culture in Forestry, Volume 3 – Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, v. 3, p. 176-184, 1987.

MEHRA-PALTA, A.; SMELTZER, R.H; MOTT, R.L. Hormonal control of induced organogenesis – Experiments with excised plant parts of loblolly pine. **Tappi Journal**. Norcross, v. 61, n. 01, p.37-40, jan 1978.

MONTEUUIS, O. Rejuvenation of a 100-year old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture – I. Organogenic and morphological arguments. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen v. 81, p. 111-115, 1991.

MOTT, R.L.; AMERSON, H. V. A tissue culture process for the clonal production of loblolly pine plantlets. **Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Research Service**, n. 271, p. 3-14, 1981.

MOTT, R.L.; SMELTZER, R.H.; MEHRA-PALTA, A. An anatomical and cytological perspective on pine organogenesis *in vitro*. Tappi Forest Biology Wood Chemistry Conference. 1977, p.9-14.

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

MURRAY, J.R.; SMITH, A.G.; HACKETT, W.P. Differential dihydroflavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.). **Planta**. Berlin, v. 194, p. 102-109, 1994.

NANDWANI, D.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Micropropagation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi pine). **Gartenbauwissenschaft**. Hannover, v. 66, p. 68-71, 2001.

OLIVEIRA, L. F. **Micropropagação de *Pinus taeda* L. a partir de material juvenil**. Curitiba, 2011. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, 108p.

OLIVEIRA, F. L.; LIMA, I. L.; GARCIA, J. N.; FLORSHEIM, S. M. B. Propriedades da madeira de *Pinus taeda* L. em função da idade e posição radial na tora. **Revista do Instituto Florestal de São Paulo**. São Paulo, v. 18, n. único, p. 59-70, dez 2006.

ORDÁS, R. J.; CUESTA, A. C.; CORTIZO, M.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, B. Micropropagation of *Pinus pinea* L.. In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (eds.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer-Verlag, Berlin, p. 33-39, 2007.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**. v. 26, n.3, p.155-163, 1998.

PARASHARAMI, V. A.; NAIK, V. B.; VON ARNOLD, S.; NADGAUDA, R. S.; CLAPHAM, D. H. Stable transformation of mature zygotic embryos and regeneration of transgenic plants of chir pine (*Pinus roxburghii* Sarg.). **Plant Cell Reports**. Berlin, v. 24, p. 708-714, 2006.

PARK, Y. S.; LELU-WALTER, M. A.; HARVENGT, L.; TROTIN, J. F.; MacEACHERON, I.; KLIMASZEWSKA, K.; BONGA, J. M. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Berlin, v. 86, p. 87-101, 2006.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. v. 1, n. 1, p. 26-36, mai 1995.

PULLMANN, G. S.; JOHNSON, S. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. **Annals of Forest Science**. v. 59, p. 663-668, 2002.

REILLY, K.; WASHER, J. Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture: plantlet formation from embryonic tissue. **New Zealand Journal of Forestry Science**. Wellington, v. 7, p.199-206, 1977.

REISSMANN, C. B.; WISNIEWSKI, C. **Aspectos nutricionais de plantios de *Pinus***. Curitiba: UFPR, 2001. Disponível online em: <<http://agrarias.ufpr.br/~mrlima/pesquisas/R001.htm>>. Acesso em out/2010.

ROCHA, P.; NIELLA, F. **Research and development of vegetative propagation techniques for *Pinus* sp. in the Northeast region of Argentina**. Eldorado: Misiones National University, 2002. Disponível online em: <<http://www.rngr.net/publications/tree-improvement-proceedings/sftic/2001/research-and-development-of-vegetative-propagation-techniques-for-pinus-sp/?searchterm=niella>> Acesso abr/2009.

SALISBURY, F. B. **Plant Physiology**. Wadsworth: Belmont, 4 ed., 1992, 682 p.

SATHYANARAYANA, B. N.; VARGHESE, D. B. **Plant tissue and new experimental protocols**. I.K. International: New Delhi, 2007, 292 p.

SEN, S.; NEWTON, R. J.; FONG, F.; NEUMANN, P. Abscisic acid: a role in shoot enhancement from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) cotyledon explants. **Plant Cell Reports**. Berlin, v. 8, p. 191-194, 1989.

SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 50, p. 199-204, 1972.

SCHULTZ, R. **Loblolly Pine: The ecology and culture of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.)**. **Agriculture Handbook cap. 7 – Genetics and improvement**. New Orleans, U.S.D.A. (U.S. Department of Agriculture), n. 713, part 2, dez. 1997, 50 p.

SIQUEIRA, J. D. P. **Os conflitos institucionais da gestão florestal no Brasil: um benchmarking entre os principais produtores florestais internacionais**. Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná. 1176 p.

SHIMIZU, J. Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. **Revista da Madeira**. Curitiba, v. 16, n. 99, p. 4-14, set. 2006.

SMITH, R. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. Academic Press: San Diego, 2 ed., 2000, 231 p.

SOMMER, H.E.; BROWN, C. L., KORMANIK, P. P. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* (Mill.)) tissue cultured in vitro. **Botanical Gazette**. Chicago, v.136, p.196-200, 1975.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167 - 178, 2003.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 2, n. 1, p. 61-64, fev 1999.

TANG, W. Micropropagation of loblolly pine by somatic organogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. **Journal of Forestry Research**. Harbin, v. 11, p. 1-6, 2000.

TANG, W.; GUO, Z. *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. **Plant Growth Regulation**. Dordrecht, v. 33, p.25-31, 2001.

TANG, W.; NEWTON, R. J. Micropropagation via organogenesis in slash pine. In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (eds.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer-Verlag, Berlin, p. 15-22, 2007.

TANG, W.; OUYANG, F. Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Berlin, v. 58, n.3, p. 223-226, 1999.

TANG, W.; OUYANG, F.; GUO, Z. Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. **Plant Cell Reports**. Berlin, v. 17, p. 557-560, 1998.

TANG, W.; WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Genotypic control of high-frequency adventitious shoot regeneration via somatic organogenesis in loblolly pine. **Plant Science**. Columbus, v.161, n. 2, p. 167-272, 2001

TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 9, p. 1873-1899, 1991.

TEASDALE, R. D.; DAWSON, P. A.; WOOLHOUSE, H. W. Mineral nutrient requirements of a Loblolly Pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture – Evaluation of a medium formulated from seed composition data. **Plant Physiology**. v. 82, p. 942-945, 1986.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 182 p.

THOMAS, M.; DUHOUX, E.; VAZART, J. *In vitro* organ initiation in tissue culture of *Biota (Thuja) orientalis*. **Plant Science Letters**. Columbus, v. 8, p. 395-400, 1977.

THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.618-631, 2008.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K; THORPE, T.A. (Eds.) **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 17-36, 1994.

THORPE, T.A.; BIONDI, S. Conifers. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V. *et al.*, (Eds.). **Handbook of Plant Cell Culture - v. 2**. New York: MacMillan, 1984. p. 435-470.

THORPE, T.A.; KUMAR, P.P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M. R. (Ed.) **Micropropagation of Woody Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.11-29, 1993.

TINGEY, D.T.; JOHNSON, M.G.; PHILLIPS, D. L.; JOHNSON, D.W. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen on the synchrony and root growth in ponderosa pine. **Tree Physiology**, v. 16, n. 11-12, p. 905-914, 1996.

VASQUES, A. G.; NOGUEIRA, A. S.; KIRCHNER, F.F.; BERGER, R. Uma síntese da contribuição do gênero *Pinus* para o desenvolvimento sustentável no sul do Brasil. **Floresta**. Curitiba, v. 37, n.3, set/ dez 2007.

VON ARNOLD, S. Factors influencing formation, development and rooting of adventitious shoots from embryos of *Picea abies* (L.) Karst. . **Plant Science Letters**. Columbus, v. 27, p. 275-287, 1982.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies on adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 59, p. 870-874, 1981.

WAGLEY, L. M.; GLADFELTER, H. J.; PHILLIPS, G. C. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro*: Macro- and micro-photographic evidence of *de novo* regeneration. **Plant Cell Reports**. Berlin, v. 6, p. 167-171, 1987.

WEBB, D.T.; FLINN, B. S.; GEORGIS, W. Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). **Canadian Journal of Forest Research**. v. 18, p. 1570-1580, 1988.

WEIR, R. J.; GOLDFARB, B. Loblolly pine rooted cutting research at North Carolina State University. **Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Southern Forest Tree Improvement Conference**. Atlanta, p. 434-446, jun 1995.

WERBROUCK, O.; DEBERGH, P.C. Applied aspects of plant regeneration. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Eds.). **Plant Cell Culture: a practical approach**. New York: Oxford University Press, p.127-145, 1994.

WISE, F.; CALDWELL, T. Macropropagation of conifers by stem cuttings. In: Proceedings of the Southern regional information Exchang Group Biennial Symposium on Forest Genetics: Applications of Vegetative Propagation in Forestry. Huntsville, p. 51-73, 1992.

WYLLYARD, A.; SYRING, J.; GERANDT, D. S.; LISTON, A.; CRONN, R. Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n.1, p. 90-101, 2007.

ZEL, J.; GOGALA, N.; CAMLOH, M. Micropropagation of *Pinus sylvestris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Berlin, v. 14, p. 169-175, 1988.

ZEL, J. Micropropagation of *Pinus sylvestris*. In: AHUJA, M. R. (Ed.) **Micropropagation of Woody Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.347-365, 1993.

ZHANG, Y.; WEI, Z.; XI, M.; SHI, J. Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Berlin, v. 84, p. 119-123, 2006.

## **ANEXOS**



ANEXO 1 - Multiplicação de Segmentos Nodais - Experimento I - Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações e número médio de brotações por explante para segmentos nodais de *Pinus taeda*, da família F27, de 1,0 a 4,0 cm de comprimento, após quatro e oito semanas de subcultivo.

| Fonte de variação       | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |                                       |
|-------------------------|----|-------------------------------|---------------------------------------|
|                         |    | Explantes c/<br>brotações (%) | Número médio de<br>brotações/explante |
| Comprimento do explante | 2  | 67,2 ns                       | $4,5 \times 10^{-1}$ ns               |
| Período de subcultivo   | 1  | 1995,2 **                     | 2,4 *                                 |
| Comprimento X período   | 2  | 282,7 ns                      | $2,2 \times 10^{-1}$ ns               |
| Erro experimental       | 12 | 91,9                          | $3,2 \times 10^{-1}$                  |
| CV (%)                  |    | 11,5                          | 26,3                                  |
| Qui-quadrado            | 5  | 5,4                           | 7,7                                   |
| $\alpha$ – Bartlett (%) |    | 36,9                          | 17,3                                  |
| Transformação           |    | ----                          | ----                                  |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 2 - Multiplicação de Segmentos Nodais - Experimento II – Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações e número médio de brotações por explante para segmentos nodais de *Pinus taeda* de 1,0 cm, das família F27 e B05, e pomar comercial, sob concentrações de 0,25; 0,5; 2,5  $\mu$ M de BAP, após quatro semanas de subcultivo.

| Fonte de variação       | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |                                       |
|-------------------------|----|-------------------------------|---------------------------------------|
|                         |    | Explantes<br>c/ brotações (%) | Número médio de<br>brotações/explante |
| Família                 | 2  | 4815,7 **                     | 4,1 **                                |
| BAP                     | 2  | 28,7 ns                       | $4,9 \times 10^{-2}$ ns               |
| Família x BAP           | 4  | 109,3 ns                      | $2,2 \times 10^{-2}$ ns               |
| Erro experimental       | 27 | 138,9                         | $1,4 \times 10^{-1}$                  |
| CV (%)                  |    | 15,5                          | 17,5                                  |
| Qui-quadrado            | 8  | 12,7                          | 3,9                                   |
| $\alpha$ – Bartlett (%) |    | 12,3                          | 86,0                                  |
| Transformação           |    | ----                          | ----                                  |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 3 - Multiplicação de Segmentos Nodais - Experimento II – Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações, porcentagem de necrose e número médio de brotações por explante para segmentos nodais de *Pinus taeda* de 1,0 cm, das famílias F27 e B05, e pomar comercial, sob concentrações de 0,25; 0,5; 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, após oito semanas de subcultivo.

| Fonte de variação       | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |                                       |
|-------------------------|----|-------------------------------|---------------------------------------|
|                         |    | Explantes c/<br>brotações (%) | Número médio de<br>brotações/explante |
| Família                 | 2  | 193,0 *                       | 1,2 ns                                |
| BAP                     | 2  | 147,2 ns                      | 4,3 **                                |
| Família x BAP           | 4  | 131,9 ns                      | 0,8 ns                                |
| Erro experimental       | 18 | 46,3                          | $3,8 \times 10^{-1}$                  |
| CV (%)                  |    | 7,3                           | 19,7                                  |
| Qui-quadrado            | 8  | 14,8                          | 14,9                                  |
| $\alpha$ – Bartlett (%) |    | 6,3                           | 6,1                                   |
| Transformação           |    | ----                          | ----                                  |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 4 - Multiplicação de Segmentos Nodais - Experimento III – Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações, porcentagem de necrose e número médio de brotações por explante para segmentos nodais de *Pinus taeda*, das famílias F27, B05 e do pomar comercial, com 1,0 cm de comprimento, em meios de cultura WV<sub>5</sub> e GDM acrescidos de 1,0; 2,0; 4,0  $\mu\text{M}$  de BAP após quatro semanas de subcultivo.

| Fonte de variação       | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |                         |                                       |
|-------------------------|----|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
|                         |    | Explantes c/<br>brotações (%) | Necrose (%)             | Número médio de<br>brotações/explante |
| Meio de cultura         | 1  | $0,4 \times 10^{-2}$ *        | $0,1 \times 10^{-3}$ ns | $1,4 \times 10^{-1}$ **               |
| BAP                     | 2  | $0,6 \times 10^{-2}$ **       | $0,1 \times 10^{-3}$ ns | $7,1 \times 10^{-2}$ *                |
| Meio x BAP              | 2  | $0,1 \times 10^{-2}$ ns       | 39,5 ns                 | $2,1 \times 10^{-2}$ ns               |
| Erro experimental       | 12 | $7,1 \times 10^{-4}$          | 52,6                    | $1,4 \times 10^{-2}$                  |
| CV (%)                  |    | 1,4                           | 141,4                   | 19,7                                  |
| Qui-quadrado            | 5  | 6,9                           | 4,3                     | 5,3                                   |
| $\alpha$ – Bartlett (%) |    | 22,6                          | 50,2                    | 38,6                                  |
| Transformação           |    | $\log(x+10)$                  | ----                    | ----                                  |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 5 - Multiplicação de Segmentos Nodais - Experimento III – Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações, porcentagem de necrose e número médio de brotações por explante para segmentos nodais de *Pinus taeda*, das famílias F27, B05 e do pomar comercial, com 1,0 cm de comprimento, em meios de cultura WV<sub>5</sub> e GDM acrescidos de 1,0; 2,0; 4,0 µM de BAP após oito semanas de subcultivo.

| Fonte de variação | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |             |                                       |
|-------------------|----|-------------------------------|-------------|---------------------------------------|
|                   |    | Explantes c/<br>brotações (%) | Necrose (%) | Número médio de<br>brotações/explante |
| Meio de cultura   | 1  | 266,3 *                       | 29,6 ns     | $0,1 \times 10^{-2}$ **               |
| BAP               | 2  | 200,6 *                       | 82,2 ns     | $0,7 \times 10^{-4}$ ns               |
| Meio x BAP        | 2  | 88,8 ns                       | 9,9 ns      | $0,3 \times 10^{-3}$ **               |
| Erro experimental | 12 | 49,3                          | 55,9        | $4,9 \times 10^{-5}$                  |
| CV (%)            |    | 102,9                         | 7,9         | 0,5                                   |
| Qui-quadrado      | 5  | 4,5                           | 3,6         | 9,3                                   |
| α – Bartlett (%)  |    | 48,4                          | 60,4        | 9,7                                   |
| Transformação     |    | ----                          | ----        | $[\log(x+10)]^{1/2}$                  |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 6 - Multiplicação de Brotações Apicais - Experimento I – Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações, porcentagem de necrose e porcentagem de alongamento para brotações apicais de *Pinus taeda*, da família F27, com comprimento de 0,5; 1,0 e 2,0 cm, em meios de cultura WV<sub>5</sub> e GDM, após oito semanas de subcultivo.

| Fonte de variação  | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |                         |                         |
|--------------------|----|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                    |    | Explantes c/<br>brotações (%) | Necrose (%)             | Alongamento (%)         |
| Comprimento        | 2  | $1,1 \times 10^{-2}$ ns       | $7,6 \times 10^{-2}$    | $1,9 \times 10^{-1}$ ** |
| Meio de cultura    | 1  | $0,3 \times 10^{-2}$ ns       | $0,1 \times 10^{-3}$    | 4,6 **                  |
| Comprimento x meio | 2  | $0,9 \times 10^{-2}$ ns       | $1,2 \times 10^{-3}$ ns | $1,4 \times 10^{-2}$ ns |
| Erro experimental  | 18 | 0,1                           | $0,8 \times 10^{-2}$    | $0,1 \times 10^{-1}$    |
| CV (%)             |    | 32,8                          | 8,3                     | 5,1                     |
| Qui-quadrado       | 5  | 9,9                           | 9,2                     | 7,2                     |
| α – Bartlett (%)   |    | 7,8                           | 10,1                    | 20,9                    |
| Transformação      |    | $\log(x+10)$                  | $[\log(x+10)]^{1/2}$    | $\log(x+10)$            |

\*\* interação dos fatores ao nível de 1% de probabilidade; ns = interação entre os fatores não significativa; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 7 - Multiplicação de Brotações Apicais- Experimento II – Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante, porcentagem de alongamento e porcentagem de necrose para brotações apicais de *Pinus taeda*, da família F27, com comprimentos de 0,5 e 1,0 cm, em meio WV<sub>5</sub> acrescido de 0,5; 1,0 ou 2,0 µM de BAP, após oito semanas de subcultivo.

| Fonte de variação | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |   |                    |                         |
|-------------------|----|-------------------------------|---|--------------------|-------------------------|
|                   |    | Explantes c/<br>brotações (%) | Número médio de<br>brotações/<br>explante | Alongamento<br>(%) | Necrose (%)             |
| Comprimento       | 1  | 11531,7 **                    | $2,3 \times 10^{-1}$ ns                   | 11484,4 **         | $1,2 \times 10^{-1}$ ** |
| BAP               | 2  | 540,3 ns                      | 1,2 *                                     | 243,8 ns           | $0,5 \times 10^{-2}$ ns |
| Comprimento x BAP | 2  | 189,1 ns                      | $7,7 \times 10^{-1}$ ns                   | 373,6 ns           | $2,5 \times 10^{-2}$ ns |
| Erro experimental | 18 | 245,4                         | $2,8 \times 10^{-1}$                      | 610,5              | $0,1 \times 10^{-1}$    |
| CV (%)            |    | 50,1                          | 24,9                                      | 26,2               | 9,0                     |
| Qui-quadrado      | 5  | 7,9                           | 7,1                                       | 3,7                | 1,4                     |
| α – Bartlett (%)  |    | 16,2                          | 21,4                                      | 58,6               | 92,0                    |
| Transformação     |    | ----                          | ----                                      | ----               | $[\log(x+10)]^{1/2}$    |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 8 - Multiplicação de Brotações Apicais- Experimento III – Quadrados médios das variáveis porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de alongamento para brotações apicais de *Pinus taeda*, da família F27, após quatro e oito semanas em meio de cultura WV<sub>5</sub> acrescido de 1,0; 2,0 e 4,0 µM de BAP.

| Fonte de variação     | GL | QUADRADOS MÉDIOS              |                                    |                    |
|-----------------------|----|-------------------------------|------------------------------------|--------------------|
|                       |    | Explantes c/<br>brotações (%) | Número médio<br>brots/<br>explante | Alongamento<br>(%) |
| Período de subcultivo | 1  | 328,9 ns                      | $1,8 \times 10^{-4}$ **            | 9,4 ns             |
| Concentrações de BAP  | 2  | 1577,1 **                     | $4,1 \times 10^{-4}$ **            | 99,6 ns            |
| BAP X período         | 2  | 68,4 ns                       | $1,3 \times 10^{-4}$ **            | 22,9 ns            |
| Erro experimental     | 12 | 187,5                         | $1,6 \times 10^{-5}$               | 165,1              |
| CV%                   |    | 29,9                          | 0,4                                | 19,5               |
| Qui-quadrado          | 5  | 2,1                           | 8,9                                | 0,9                |
| α – Bartlett (%)      |    | 82,9                          | 11,4                               | 96,9               |
| Transformação         |    | ---                           | $[\log(x + 10)]^{1/2}$             | ---                |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 9 – Enraizamento – Experimento I – Quadrados médios das variáveis porcentagem de enraizamento, número médio de raízes por explante e comprimento médio de raízes, após seis semanas de cultivo em meios WV<sub>5</sub>/2, WV<sub>3</sub>/2 e GDm/2 sem reguladores.

| QUADRADOS MÉDIOS        |    |                      |                                   |                             |
|-------------------------|----|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Fonte de variação       | GL | Enraizamento (%)     | Número médio de raízes/ explantes | Comprimento médio de raízes |
| Meio de cultura         | 3  | 0,3 ns               | $0,6 \times 10^{-2}$ ns           | 0,3 ns                      |
| Erro experimental       | 12 | $0,4 \times 10^{-1}$ | $0,1 \times 10^{-2}$              | 0,8                         |
| CV (%)                  |    | 16,2                 | 3,4                               | 70,3                        |
| Qui-quadrado            |    | 0,7                  | 0,2                               | 1,6                         |
| $\alpha$ – Bartlett (%) |    | 88,0                 | 88,2                              | 43,8                        |
| Transformação           |    | log (x + 10)         | log (x + 10)                      | ----                        |
| *Observação             |    |                      | GL 2 e 9<br>3 médias              | GL 2 e 9<br>3 médias        |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 10 – Enraizamento – Experimento II – Quadrados médios das variáveis porcentagem de enraizamento, número médio de raízes por explante e comprimento médio de raízes, após seis semanas de cultivo em meio GDm/2 sem reguladores.

| QUADRADOS MÉDIOS         |    |                  |                                   |                             |
|--------------------------|----|------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Fatores                  | GL | Enraizamento (%) | Número médio de raízes/ explantes | Comprimento médio de raízes |
| Meio de cultura          | 1  | 805,2 ns         | 3,5 **                            | $5,3 \times 10^{-2}$ ns     |
| Concentração de sacarose | 1  | 5,1 ns           | $1,5 \times 10^{-1}$ ns           | $1,1 \times 10^{-1}$ ns     |
| Meio x sacarose          | 1  | 500,0 ns         | $8,9 \times 10^{-1}$ ns           | $1,3 \times 10^{-1}$ ns     |
| Erro experimental        | 8  | 753,7            | $2,3 \times 10^{-1}$              | $1,9 \times 10^{-1}$        |
| CV%                      |    | 66,1             | 22,9                              | 28,5                        |
| Qui-quadrado             | 3  | 1,9              | 7,1                               | 3,1                         |
| $\alpha$ % (Bartlett)    |    | 58,8             | 6,9                               | 38,3                        |
| Transformação            |    | ----             | ----                              | ----                        |

ns = probabilidade F não significativa; \* = probabilidade F significativa a 5%; \*\* = probabilidade F significativa a 1%; CV = coeficiente de variação.

ANEXO 11 – FORMULAÇÃO SALINA E VITAMINAS DO MEIO GDM (GD MODIFICADO SEGUNDO MEHRA-PALTA *et al.*, 1978)

| <b>Micronutrientes</b>                              | <b>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|---|--------------------------|
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,25                     |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,25                     |
| FeNaEDTA  | 36,7                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 3,0                      |
| KI  | 0,75                     |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 10,0                     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                     |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 3,0                      |
| <b>Macronutrientes</b>                              |                          |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 150,0                    |
| KCl   | 300,0                    |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1000,0                   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 250,0                    |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O  | 90,0                     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 30,0                     |
| (NH <sub>4</sub> ).2SO <sub>4</sub>                 | 200,0                    |
| <b>Vitaminas</b>                                    |                          |
| mio-inositol  | 10,0                     |
| ácido nicotínico                                    | 0,1                      |
| piridoxina  | 0,1                      |
| tiamina   | 1,0                      |

ANEXO 12 – FORMULAÇÃO SALINA E VITAMINAS DO MEIO MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

| <b>Micronutrientes</b>                              | <b>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|---|--------------------------|
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025                    |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,025                    |
| FeNaEDTA  | 36,7                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,2                      |
| KI  | 0,83                     |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 16,9                     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                     |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,6                      |
| <b>Macronutrientes</b>                              |                          |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 332,0                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170,0                    |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900,0                   |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | 180,5                    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650,0                   |
| <b>Vitaminas</b>                                    |                          |
| mio-inositol  | 100,0                    |
| ácido nicotínico                                    | 0,5                      |
| glicina   | 2,0                      |
| piridoxina  | 0,5                      |
| tiamina   | 0,1                      |

ANEXO 13 – FORMULAÇÃO SALINA E VITAMINAS DO MEIO WPM (LLOYD; McCOWN, 1980)

| <b>Micronutrientes</b>                              | <b>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|---|--------------------------|
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,25                     |
| FeNaEDTA  | 36,7                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,2                      |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 22,3                     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                     |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,6                      |
| <b>Macronutrientes</b>                              |                          |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 72,5                     |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                   | 386,8                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170,0                    |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                      | 990,0                    |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | 180,5                    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 400,0                    |
| <b>Vitaminas</b>                                    |                          |
| mio-inositol  | 100,0                    |
| ácido nicotínico                                    | 0,5                      |
| glicina   | 2,0                      |
| piridoxina  | 0,5                      |
| tiamina   | 1,0                      |

ANEXO 14 – FORMULAÇÃO SALINA E VITAMINAS DO MEIO WV<sub>3</sub> (COKE, 1996b)

| <b>Micronutrientes</b>                              | <b>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|---|--------------------------|
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025                    |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,25                     |
| FeNaEDTA  | 36,7                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 31,0                     |
| KI  | 0,83                     |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 15,16                    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                     |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,6                      |
| <b>Macronutrientes</b>                              |                          |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 452,9                    |
| KCl   | 656,9                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 270,0                    |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 910,1                    |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | 903,8                    |
| <b>Vitaminas e outros compostos</b>                 |                          |
| mio-inositol  | 1000,0                   |
| L-glutamina   | 2290,0                   |
| tiamina   | 0,4                      |

ANEXO 15 – FORMULAÇÃO SALINA E VITAMINAS DO MEIO WV<sub>5</sub> (COKE, 1996a)

| <b>Micronutrientes</b>                              | <b>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|---|--------------------------|
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025                    |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,25                     |
| FeNaEDTA  | 36,7                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 31,0                     |
| KI  | 0,83                     |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 15,16                    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                     |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,6                      |
| <b>Macronutrientes</b>                              |                          |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 452,9                    |
| KCl   | 718,7                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 270,0                    |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1084,1                   |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | 903,8                    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 700,0                    |
| <b>Vitaminas</b>                                    |                          |
| mio-inositol  | 1000,0                   |
| tiamina   | 0,4                      |