

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE
LOURO-PARDO (*Cordia trichotoma* (Vell.)
Arrabida ex Steudel)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Michele Heberle

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE LOURO-PARDO
(*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)

por

Michele Heberle

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin, PhD.

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE LOURO-PARDO
(*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)**

elaborada por
Michele Heberle

como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Florestal

Comissão Examinadora

Prof. Dilson Antônio Bisognin, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Dr. Leonardo Ferreira Dutra (Embrapa - CPACT)

Prof. Dr. Nilton César Mantovani (UFSM - CESNORS)

Santa Maria, 01 de março de 2010

Aos meus pais Renata e Joaquim,
meus exemplos de vida.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e proteção constantes.

Aos meus pais Renata e Joaquim, meus maravilhosos exemplos de caráter e de trabalho, pelas palavras de carinho e pelos sacrifícios enfrentados para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã Melissa, pela cumplicidade e ajuda nas revisões do Português e do resumo em Inglês do presente trabalho. Ao meu irmão Moisés, pela amizade e dicas de informática.

Ao meu noivo Rodrigo, pela compreensão, companheirismo e por todo o amor.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela construção do meu conhecimento na Ciência da Engenharia Florestal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFSM.

À CAPES, pelo apoio financeiro ao meu estudo.

Ao meu orientador, professor Dilson Antônio Bisognin, pela oportunidade de realização deste trabalho, pelo incentivo, críticas e sugestões.

Ao professor Frederico Dimas Fleig, por estar sempre disposto a ensinar e a ajudar.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.

À funcionária Tita, pelo auxílio, amizade e boas conversas.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (LMPVP): Marlene, Kenia, Zilmar, Maurício, Carlos, Claudinei, Francisco, Marcelo, Victória, Darlene, Ritiéli, Glademir e Hardi, pela ajuda direta ou indireta, pela convivência, pela troca de idéias e pelos momentos de descontração.

Agradecimento especial às amigas e colegas do LMPVP, Ronilda, pela ajuda na realização de todos os experimentos; e Paula Kielse, por todo o auxílio e dedicação na conclusão deste trabalho.

À Luciane Chami, pela ajuda na localização das coordenadas geográficas das matrizes do louro-pardo.

Aos meus amigos Elisabete, Graziela, Vicente e Micheli (saudades), pelo incentivo.

Agradeço sinceramente a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na concretização deste trabalho.

“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
porque alta vive.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE LOURO-PARDO (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)

AUTORA: Michele Heberle

ORIENTADOR: Dilson Antônio Bisognin

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 01 de março de 2010.

Apesar de o louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.) ser uma espécie florestal nativa com elevado potencial madeireiro, ainda são escassos os estudos que abordam a produção de mudas dessa espécie pela propagação vegetativa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a propagação do louro-pardo pelas técnicas de estaquia e micropropagação. Para a estaquia foi testada a presença ou ausência de 8000 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e dois tipos de estacas (basais e apicais). Aos 40 dias, as estacas foram avaliadas quanto à sobrevivência, o enraizamento, a presença de calos e de brotos, o número e o comprimento de brotos e o número de folhas. Para o estabelecimento de plântulas assépticas, sementes de louro-pardo foram tratadas com 2% ou 5% de hipoclorito de sódio, por 0, 5, 10, 15 ou 20 min. As sementes foram inoculadas em meio de cultura base WPM. Aos 30 dias foram avaliadas as porcentagens de desinfestação, de contaminação por fungos e/ou bactérias e o tempo médio de germinação. Para a multiplicação, ápices caulinares foram inoculados em meio de cultura base, acrescido de 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Aos 45 dias avaliou-se o comprimento, o número de folhas e de entrenós dos brotos, as porcentagens de calo e de sobrevivência dos explantes. Na multiplicação, utilizando microcepas mantidas *in vitro*, testou-se a adição ou não de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura base na produção de brotos. Aos 30 e 60 dias, referentes ao primeiro e ao segundo corte das microcepas, foram avaliados o número e o comprimento dos brotos, o número de folhas e de entrenós dos brotos, e o número de microestacas. No enraizamento *in vitro*, microestacas foram mantidas em meio de cultura base, acrescido de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado e AIB (1,5 ou 2,0 mg L⁻¹). Aos 45 dias foram avaliadas a presença de raízes e calos, a porcentagem de sobrevivência e de brotação. Na estaquia, foi observada a formação de brotos nas estacas, contudo estas não enraizaram. O tipo de estaca e a dose de AIB utilizada não influenciaram no enraizamento ou na sobrevivência. Na micropropagação foi verificado que a assepsia das sementes com 5% de hipoclorito de sódio, por 5 min., possibilitou o estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas. A indução de brotos nos explantes não foi influenciada pelas diferentes doses de BAP. A presença de carvão ativado no meio de cultura base favoreceu a formação e o crescimento dos brotos nas microcepas. A utilização de 1,5 ou 2,0 mg L⁻¹ de AIB não promoveu o enraizamento adventício das microestacas de louro-pardo.

Palavras-chave: produção de mudas, propagação vegetativa, estaquia, multiplicação, microcepa, espécie nativa.

ABSTRACT

Master Thesis
Graduate Program of Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

IN VITRO AND EX VITRO PROPAGATION OF LOURO-PARDO (Cordia trichotoma (Vell.) Arrabida ex Steudel)

AUTHOR: Michele Heberle

ADVISOR: Dilson Antônio Bisognin

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 01th, 2010.

Although the louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.) is native forest specie with high timber potential, there are still scarce studies that approach the production of seedlings of this species by vegetative propagation. The objective of this work was to evaluate the vegetative propagation of the louro-pardo by the techniques of cuttings and micropropagation. It was tested the presence or absence of 8000 mg L⁻¹ of indolbutiric acid (IBA) and two types of cuttings (basal and apical). At 40 days, the cuttings were evaluated for survival, rooting, the presence of callus and shoots, the number and length of shoots and the number of leaves. For the establishment of aseptic seedlings, seeds of louro-pardo were treated with 2% or 5% of sodium hypochlorite, for 0, 5, 10, 15 or 20 min. The seeds were inoculated in WPM basic culture medium. At 30 days, the percentages of disinfection, fungal contamination and / or bacteria and the average time of germination were evaluated. For multiplication, apical segments were inoculated in basic medium, plus 0; 0,25; 0,50 or 0,75 mg L⁻¹ of 6-benzilaminopurin (BAP). At 45 days were evaluated the length, number of leaves and internodes of the shoots, the percentage of callus and the survival of the explants. In the multiplication, using microstumps kept *in vitro*, was tested whether or not the addition of 1,5 g L⁻¹ of activated charcoal to the basic medium on the production of shoots. At 30 and 60 days, concerning to the first and second cuts of microstumps, were evaluated the number and length of shoots, number of leaves and internodes of the shoots, and the number of microcutting. Rooting *in vitro* microcuttings were maintained in basic medium plus 1,5 g L⁻¹ of activated charcoal and IBA (1,5 or 2,0 mg L⁻¹). At 45 days were evaluated the presence of roots and callus, the percentage of survival and sprouting. In cutting, were observed the formation of shoots on the cuttings, but they are not rooted. The cutting type and dose of IBA did not influence the rooting and survival. In micropropagation was found that the sterilization of seeds with 5% of sodium hypochlorite for 5 min. allowed the *in vitro* establishment of aseptic seedlings. The induction of shoots in the explants was not influenced by different doses of BAP. The presence of activated charcoal in the culture medium favored the formation and growth of shoots in microstumps. The use of 1,5 or 2,0 mg L⁻¹ IBA did not promote the rooting of microshoots of louro-pardo.

Key words: plantlet production, vegetative propagation, cutting, multiplication, microstump, native species.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	<i>Cordia trichotoma</i> Vell.: (A) árvore; (B) filotaxia e floração; (C) aspecto do fruto maduro; (D) sementes; (E) aspecto da casca do fuste; (F) aspecto da madeira. Fonte: Lorenzi, 1992.....	23
FIGURA 2 –	Imagem de satélite da localização de três árvores matrizes de louro-pardo doadoras de propágulos (M01, M02, M03), situadas em propriedade rural na localidade de Faxinal da Palma, município de Santa Maria, RS. Santa Maria, RS, 2010	34
FIGURA 3 –	Aspecto das estacas de louro-pardo aos 40 dias de permanência em câmara úmida (A); Detalhe de broto em estaca basal de louro-pardo sem tratamento com AIB (B). Santa Maria, RS, 2010	35
FIGURA 4 –	Porcentagem de sementes de louro-pardo desinfestadas com diferentes doses de hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão, avaliada 30 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2010.....	45
FIGURA 5 –	Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de sementes de louro-pardo e o tempo médio de germinação (TMG) em função de tratamentos com diferentes doses de hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão, avaliados 30 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2010.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Respostas de brotação em estacas basais e apicais de louro-pardo, cultivadas em substrato composto por uma mistura de areia, substrato comercial à base de casca de pinus e vermiculita (1:1:1 v/v/v), tratadas ou não com 8000 mg L ⁻¹ de AIB, e mantidas por 40 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2010.....	36
TABELA 2 – Respostas de brotação em estacas de louro-pardo tratadas ou não com 8000 mg L ⁻¹ de AIB, cultivadas em substrato composto por uma mistura de areia, substrato comercial à base de casca de pinus e vermiculita (1:1:1 v/v/v), e mantidas por 40 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2010.....	37
TABELA 3 – Composição do meio de cultura WPM, utilizado no experimento de micropropagação do louro-pardo.....	42
TABELA 4 – Porcentagem de contaminação por bactérias em sementes de louro-pardo, aos 30 dias, tratadas com diferentes doses e tempos de imersão em hipoclorito de sódio. Santa Maria, RS, 2010.....	46
TABELA 5 – Porcentagem de contaminação por fungos em sementes de louro-pardo, aos 30 dias, tratadas com diferentes doses e tempos de imersão em hipoclorito de sódio. Santa Maria, RS, 2010.....	47
TABELA 6 – Porcentagem de sobrevivência e de calo, número de entrenós, de folhas e altura de brotos emitidos em ápices caulinares de louro-pardo cultivados em meio de cultura WPM acrescido de 30 g L ⁻¹ de sacarose, 7 g L ⁻¹ de ágar, e de diferentes doses de BAP; aos 45 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2010.....	50

TABELA 7 –	Parâmetros observados em microcepas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 30 g L ⁻¹ de sacarose, 7 g L ⁻¹ de ágar, e acrescido ou não de 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado; avaliadas aos 30 dias após o 1º e 2º corte. Santa Maria, RS, 2010.	52
TABELA 8 –	Enraizamento de microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura base WPM acrescido de 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, e 1,5 ou 2,0 mg L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB); avaliadas aos 45 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2010.....	53

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Localização geográfica das três árvores matrizes de louro-pardo (M01, M02, M03), situadas em propriedade rural na localidade de Faxinal da Palma, município de Santa Maria, RS. Santa Maria, RS, 2010.....	66
--	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A1 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de brotação em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.....	67
APÊNDICE A2 –	Resumo da análise de variância do número de brotos formados em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.....	67
APÊNDICE A3 –	Resumo da análise de variância do comprimento dos brotos formados em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.....	67
APÊNDICE A4 –	Resumo da análise de variância do número de folhas nos brotos formados em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.....	68
APÊNDICE A5 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de brotação em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L ⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.....	68
APÊNDICE A6 –	Resumo da análise de variância do número de brotos formados em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L ⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.....	68
APÊNDICE A7 –	Resumo da análise de variância do comprimento de brotos formados em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L ⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.....	69
APÊNDICE A8 –	Resumo da análise de variância do número de folhas nos brotos formados em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L ⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.....	69

APÊNDICE A9 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de desinfestação de sementes de louro-pardo tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.....	69
APÊNDICE A10 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de contaminação por fungos em sementes de louro-pardo tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.....	70
APÊNDICE A11–	Resumo da análise de variância da porcentagem de contaminação por bactérias em sementes de louro-pardo, tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.....	70
APÊNDICE A12–	Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de louro-pardo tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.....	70
APÊNDICE A13 –	Resumo da análise de variância do número de folhas em brotos de segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.....	71
APÊNDICE A14 –	Resumo da análise de variância do número de entrenós em brotos de segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.....	71
APÊNDICE A15 –	Resumo da análise de variância da altura dos brotos formados em segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.....	71

APÊNDICE A16 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de calo em segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.....	72
APÊNDICE A17 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência de segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.....	72
APÊNDICE A18 –	Resumo da análise de variância do número de brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.....	72
APÊNDICE A19 –	Resumo da análise de variância do comprimento dos brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.....	73
APÊNDICE A20 –	Resumo da análise de variância do número de folhas em brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.....	73
APÊNDICE A21 –	Resumo da análise de variância do número de entrenós de brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.....	73

APÊNDICE A22 –	Resumo da análise de variância do número de microestacas obtidas de brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.....	74
APÊNDICE A23 –	Resumo da análise de variância do número de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.....	74
APÊNDICE A24 –	Resumo da análise de variância do comprimento dos brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.....	74
APÊNDICE A25 –	Resumo da análise de variância do número de folhas de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.....	75
APÊNDICE A26 –	Resumo da análise de variância do número de entrenós de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.....	75
APÊNDICE A27 –	Resumo da análise de variância do número de microestacas obtidas de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.....	75

APÊNDICE A28 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de calo em microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, 1,5 ou 2,0 mg L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), avaliadas aos 45 dias após a inoculação.....	76
APÊNDICE A29 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de brotação em microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), avaliadas aos 45 dias após a inoculação.....	76
APÊNDICE A30 –	Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência de microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L ⁻¹ de ágar, 30 g L ⁻¹ de sacarose, 1,5 g L ⁻¹ de carvão ativado, 1,5 ou 2,0 mg L ⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), avaliadas aos 45 dias após a inoculação.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
1.1	Objetivos	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Descrição da espécie	22
2.2	Propagação vegetativa	24
2.2.1	Propagação por estaquia	25
2.2.2	Rejuvenescimento de espécies lenhosas	27
2.2.3	Micropropagação	28
2.2.3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de plântulas	29
2.2.3.2	Multiplicação <i>in vitro</i>	30
2.2.3.3	Enraizamento <i>in vitro</i>	31
3	CAPÍTULO 1 – ESTAQUIA DE LOURO-PARDO.....	33
3.1	Introdução	33
3.2	Materiais e métodos	34
3.3	Resultados e discussão	36
3.4	Conclusão	39
4	CAPÍTULO 2 – MICROPROPAGAÇÃO DE LOURO-PARDO.....	40
4.1	Introdução.....	40
4.2	Materiais e métodos.....	41
4.2.1	Condições de cultivo.....	41

4.2.2	Estabelecimento <i>in vitro</i> de plântulas.....	42
4.2.3	Multiplicação <i>in vitro</i>	43
4.2.3.1	Efeito da citocinina 6-benzilamopurina (BAP) na indução de brotos em ápices caulinares.....	43
4.2.3.2	Produção de brotos em microcepas mantidas <i>in vitro</i>	44
4.2.4	Enraizamento <i>in vitro</i>	44
4.2.5	Análise Estatística.....	44
4.3	Resultados e discussão.....	45
4.3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de plântulas.....	45
4.3.2	Multiplicação <i>in vitro</i>	49
4.3.2.1	Efeito da citocinina 6-benzilamopurina (BAP) na indução de brotos em ápices caulinares.....	49
4.3.2.2	Produção de brotos em microcepas mantidas <i>in vitro</i>	51
4.3.3	Enraizamento <i>in vitro</i>	52
4.4	Conclusões.....	54
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7	ANEXOS.....	66
8	APÊNDICES.....	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por madeira estabelece um cenário onde, de um lado encontram-se os plantios comerciais de espécies exóticas de rápido crescimento, para as quais já existe considerável conhecimento científico e tecnológico do processo produtivo, e, de outro, a necessidade de madeiras mais nobres, essencialmente de espécies florestais nativas, que apresentam informações técnicas e silviculturais escassas. Dentre as espécies nativas, destaca-se o louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.), uma árvore que apresenta madeira de lei muito apreciada nos mercados interno e externo, especialmente pelo emprego na fabricação de móveis de luxo e pela facilidade de produzir peças envergadas com excelentes atributos decorativos (CARVALHO, 2003).

A propagação do louro-pardo pode ser realizada por via sexuada, porém o uso dessa técnica limita a produção comercial de mudas, já que as sementes são recalcitrantes ao armazenamento, perdendo a viabilidade em curto período de tempo (CARVALHO, 2003), além de possuírem germinação lenta e irregular (MENDONÇA et al., 2001). Ainda, espécies florestais apresentam elevada taxa de fecundação cruzada, resultando em uma grande variabilidade genética entre e dentro da progênie. Diante disso, a propagação de louro-pardo por sementes resulta em mudas desuniformes (em relação à altura e ao diâmetro de colo) e sujeitas à baixa qualidade, o que pode ser prejudicial à uniformidade e produtividade dos povoamentos. Já a reprodução assexuada, ou propagação vegetativa, permite a fixação de genótipos selecionados, evitando a variabilidade genética característica dos povoamentos formados por mudas de origem seminal (HIGASHI et al., 2000).

A propagação vegetativa tem como ponto de partida a seleção de genótipos superiores e a subsequente clonagem massal. Contudo, o processo de seleção desses genótipos ocorre basicamente na fase adulta, o que torna a propagação vegetativa um desafio, pela dificuldade de enraizamento de propágulos vegetativos maduros. A maturação do material vegetal, decorrente da transição da fase juvenil para a adulta, tem recebido atenção especial em plantas lenhosas, por provocar alterações bioquímicas e fisiológicas, as quais determinam as respostas de enraizamento dos propágulos vegetativos (WENDLING, 2002). A micropropagação possibilita o

rejuvenescimento de espécies florestais, recuperando a competência do enraizamento de propágulos advindos de árvores adultas (ASSIS et al., 1992).

Para espécies nativas e exóticas, a produção de mudas pela micropropagação tem sido realizada em diversos países, possibilitando a obtenção de indivíduos de forma rápida, contínua, livres de doenças e em pequeno espaço físico (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Para o louro-pardo, essa tecnologia vem sendo estudada como forma alternativa de reprodução assexuada (MANTOVANI et al., 1996; MANTOVANI et al., 2001; FICK et al., 2007). No entanto, se fazem necessárias melhorias tecnológicas associadas ao processo produtivo, especialmente para o enraizamento *in vitro* dos propágulos produzidos e a aclimatização das plantas, tornando a micropropagação um processo economicamente viável.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar a propagação vegetativa do louro-pardo pelas técnicas de estaquia e micropropagação.

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar a estaquia como método de propagação vegetativa, utilizando estacas apicais e basais e a aplicação ou não do ácido indolbutírico (AIB);
- b) verificar a eficácia do hipoclorito de sódio e de diferentes tempos de imersão das sementes na desinfestação e germinação *in vitro*, para o estabelecimento de plântulas assépticas;
- c) avaliar a influência de diferentes doses da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotos em ápices caulinares excisados de plântulas assépticas;
- d) avaliar o efeito do carvão ativado na produção de brotos em microcepas mantidas *in vitro*;
- e) avaliar a eficácia de diferentes doses de AIB no enraizamento *in vitro* de microestacas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descrição da espécie

Pertencente à família Boraginaceae, *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel, comumente conhecida por louro-pardo, é uma espécie de ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o nordeste até o sul do Brasil, no nordeste da Argentina, leste do Paraguai e sul da Bolívia (REITZ et al., 1988; CARVALHO, 2003). No Rio Grande do Sul, essa espécie ocorre frequentemente nas florestas do Alto Uruguai e em matas abertas e capões dos campos da depressão central (LORENZI, 1992). Pertencente ao grupo sucessional secundário inicial a secundário tardio, com tendência à pioneira, o louro-pardo é exigente em relação ao tipo de solo, se adaptando melhor em solos com fertilidade média a alta, profundos, bem drenados e textura franca a argilosa (CARVALHO, 2003).

A árvore de louro-pardo (Figura 1A) é caducifólia, perdendo as folhas de julho a agosto (RIZZINI, 1971), com 8 a 20 m de altura e 40 a 60 cm de diâmetro a altura do peito (DAP), mas pode atingir cerca de 35 m de altura e 100 cm de DAP na idade adulta. A copa é estreita, comprida e com folhagem densa. As folhas são simples, alternas, ricas em pêlos, verde-escuras na face adaxial e grisáceas na abaxial (Figura 1B) (REITZ et al., 1988). As flores apresentam coloração de branca a pardas, perfumadas, com até 2 cm de comprimento, reunidas em grandes panículas terminais densamente ramificadas, com 10-25 cm de comprimento (CARVALHO, 2003). O fruto é subcilíndrico, totalmente encerrado pelo tubo da corola e pelo cálice persistentes (Figura 1C e 1D) (RIZZINI, 1971). O tronco é reto e cilíndrico, com um fuste bem definido que atinge 15 m de altura, apresentando casca cinzenta e sulcos longitudinais (Figura 1E) (CARVALHO, 2003).

O louro-pardo é uma planta polígama, com flores masculinas e hermafroditas, polinizadas especialmente por abelhas (CARVALHO, 2003). No Rio Grande do Sul, a floração ocorre nos meses de fevereiro a abril, e a maturação dos frutos de maio a julho (REITZ et al., 1988). Os frutos apresentam dispersão anemocórica, sendo que 1 kg contém aproximadamente 27.800 frutos (RIZZINI, 1971). A reprodução sexuada da espécie é dificultada pela rápida perda da viabilidade das sementes, quando mantidas em ambiente não controlado, por apresentarem

comportamento recalcitrante ao armazenamento (MARCHETTI, 1984). A germinação é do tipo epígea, geralmente irregular e com percentuais que variam de 14 a 80% (MARCHETTI, 1984; MENDONÇA et al., 2001; CARVALHO, 2003). Além disso, dependendo da região de origem, as sementes podem apresentar dormência tegumentar (AMARAL et al., 1988), ou ainda, ataque de pragas após a maturidade dos frutos (MENDONÇA et al., 2001).

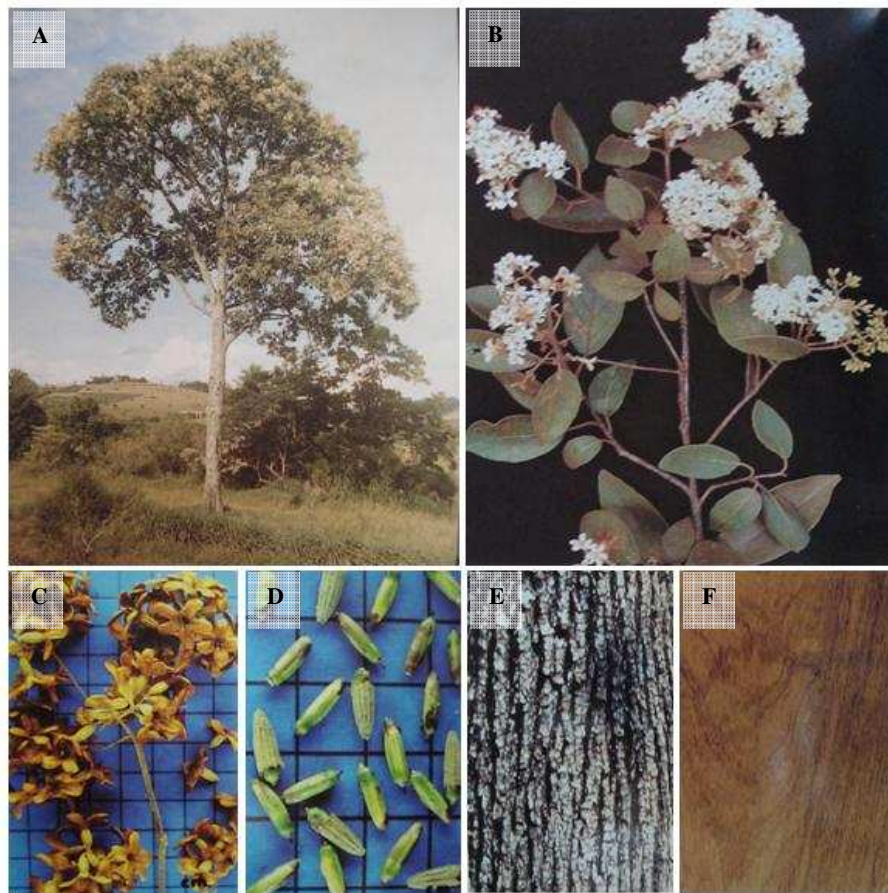


Figura 1 – *Cordia trichotoma* Vell.: (A) árvore; (B) filotaxia e floração; (C) aspecto do fruto maduro; (D) sementes; (E) aspecto da casca do fuste; (F) aspecto da madeira. Fonte: Lorenzi, 1992.

Estudos indicam que, em plantações bem manejadas, o louro-pardo pode atingir um incremento volumétrico superior a $20 \text{ m}^3 \text{ hectare}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (REITZ et al., 1988). São recomendados plantios mistos ou com baixa densidade de plantas, minimizando a incidência dos insetos da

família tingidae (ordem hemíptera), que atacam as folhas causando manchas amareladas, com posterior descoloração e queda. O conhecimento silvicultural do louro-pardo é ainda incipiente, existindo importantes aspectos a serem estudados, tais como a heterogeneidade do crescimento dos indivíduos plantados, a identificação de progênies mais produtivas, e o controle de tingídeos, que retardam o crescimento e desenvolvimento (CARVALHO, 2003).

O louro-pardo é uma das espécies nativas mais promissoras para plantio na região sul, centro-oeste e sudeste do Brasil, pois apresenta uma combinação de aspectos favoráveis, dentre os quais se destacam a regeneração natural vigorosa e o fuste com boa forma (CARVALHO, 2003). A espécie integra o grupo das madeiras de lei, sendo muito apreciada nos mercados interno e externo pela excelente qualidade. A madeira (Figura 1F) é fácil de trabalhar, polir, entalhar e vergar, podendo ser empregada na fabricação de molduras, cadeiras, revestimentos múltiplos e na decoração de interiores. A utilização em tornearia permite a obtenção de peças valiosas, além da vasta aplicação na construção de embarcações (RIZZINI, 1971; REITZ et al., 1988). As árvores apresentam valor ornamental, paisagístico, e na recuperação de áreas degradadas (CARVALHO, 2003).

2.2 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa é um processo baseado na teoria da totipotência, que apresenta o princípio de que todas as células vivas têm a capacidade de reproduzir um organismo inteiro, desde que possuam condições adequadas e informações genéticas necessárias para ocorrerem as transformações morfogênicas, originando órgãos ou tecidos vegetais. Esse processo ocorre por mecanismos de divisão e diferenciação celular, possibilitando a regeneração de raízes, ramos, folhas, calos e embriões (HARTMANN et al., 2002).

Sendo assim, a propagação vegetativa é uma ferramenta indispensável nos programas de melhoramento genético de espécies florestais, especialmente por permitir a produção de plantas geneticamente idênticas à árvore matriz doadora de propágulos (WENDLING et al., 2005), pela manutenção dos componentes aditivo e não aditivo da variância genética, a cada ciclo de seleção (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). No Brasil, o melhoramento genético tem propiciado o crescimento do setor florestal, sobretudo pela maximização da produção de madeira. Isso porque o melhoramento florestal possibilita o estabelecimento de plantios mais homogêneos (WENDLING

et al., 1999) e com maior resistência a pragas, doenças e estresses ambientais (FLORIANO, 2004).

Para os métodos de melhoramento utilizados em espécies que têm facilidade de reprodução assexuada, o grande esforço da pesquisa é centralizado na identificação de plantas que reúnam as características favoráveis, para fixá-las geneticamente. Já para as espécies em que ainda não estão estabelecidas as técnicas de propagação vegetativa em larga escala, os estudos são direcionados para a descoberta desses métodos. Tão logo estejam disponíveis, são incorporados aos programas de melhoramento como uma estratégia auxiliar na obtenção de materiais resistentes e produtivos (PAIVA, 1998).

A propagação vegetativa de espécies arbóreas pode ser realizada por diversas técnicas, sendo o método definido conforme o objetivo, a espécie, a característica genotípica da planta matriz, os tipos de propágulos, a época do ano, entre outras (WENDLING et al., 2005). Dentre as técnicas de propagação vegetativa, pode-se citar a estaquia, enxertia, miniestaquia e micropropagação, as quais são amplamente utilizadas na produção de mudas de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (ASSIS et al., 1992; WENDLING, 1999; HIGASHI et al., 2000; TITON et al., 2003; WENDLING & XAVIER, 2003; SANTOS et al., 2005) e na propagação de diversas outras espécies florestais (PICHET, 1997; KALIL FILHO et al., 2001; STUMPF et al., 2001; CHAVES et al., 2003; XAVIER et al., 2003; FERRIANI, 2006; FICK et al., 2007; NAZÁRIO et al., 2007).

A técnica da estaquia é a mais utilizada para a propagação vegetativa de plantas lenhosas, sobretudo pela facilidade no manuseio e pela obtenção imediata de genótipos superiores aptos ao estabelecimento em jardins clonais. A micropropagação destaca-se como técnica de clonagem comercial, porque possibilita a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (PAIVA & GOMES, 1993).

2.2.1 Propagação por estaquia

A estaquia é um dos processos mais importantes de propagação vegetativa, que se destaca como um método economicamente viável para a produção de novos indivíduos, principalmente por ser uma técnica cujos custos são menores quando comparados com os dos métodos de cultivo *in vitro*, por exemplo (XAVIER e COMÉRIO, 1996). A metodologia consiste na indução de partes aéreas e raízes adventícias em estacas obtidas de folhas, raízes ou porções de caules da

planta matriz selecionada, pelo cultivo em substrato (PERRANDO, 2003). A estaca caulinar é a mais utilizada e divide-se em quatro grupos de acordo com a natureza do lenho: estacas lenhosas (apresentam tecidos endurecidos), estacas herbáceas (apresentam tecidos tenros), semilenhosas e semi-herbáceas (apresentam um estágio intermediário entre os dois extremos) (HARTMANN et al., 2002). A utilização de fitorreguladores, a exemplo do ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) e ácido indolacético (AIA), tem sido uma prática comumente empregada para auxiliar a rizogênese, sendo essencial em alguns casos, sobretudo em espécies de difícil enraizamento (FACHINELLO et al., 1994).

O uso de fitorreguladores em estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) estimulou a rizogênese, possibilitando o aumento do número de estacas enraizadas e de raízes por estaca, além da redução do período requerido para o enraizamento (IRITANI & SOARES, 1981). Em estacas obtidas de brotos do ano de árvores adultas de erva-mate, a dose de 5000 mg L⁻¹ de AIB possibilitou até 62% de enraizamento (GRAÇA et al., 1988). Na estaquia de pau-de-leite (*Sapium glandulatum* (Vell.) Pax.), o melhor desempenho de enraizamento foi observado em estacas tratadas com 6000 mg L⁻¹ de AIB, com média de 52% (CUNHA et al., 2004). Por outro lado, no enraizamento de estacas de pau-sangue (*Croton celtidifolius* Baillon), foi verificado um baixo potencial rizogênico mesmo nos tratamentos contendo AIB, com melhores respostas (30%) quando utilizado 3000 mg L⁻¹ do fitorregulador (KNAPIK et al., 2002). Estes resultados indicam que as auxinas podem auxiliar no enraizamento das estacas de diversas espécies, contudo, é necessário que haja um adequado balanço hormonal nos tecidos das estacas, sendo este específico para cada genótipo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Se, por um lado, a estaquia é largamente utilizada pela simplicidade operacional, por outro pode ser vista como uma técnica de grande complexidade, pois sofre a influência da interação de fatores intrínsecos à planta, tais como juvenilidade ou maturidade dos propágulos, condição fisiológica (presença de carboidratos, substâncias nitrogenadas, aminoácidos, auxinas, compostos fenólicos e outras substâncias não identificadas), presença de folhas e gemas, e estado nutricional da planta matriz; e de fatores extrínsecos, dentre os quais se destacam, a composição e o pH do substrato, o uso de fitorreguladores, a luminosidade, a temperatura e a umidade (HARTMANN et al., 2002).

A posição de coleta do propágulo para a estaquia também tem influência no enraizamento. A escolha do melhor tipo de estaca para a clonagem é essencial para que não ocorram perdas

devido à incapacidade de regeneração do material, e nem a formação de mudas com baixo vigor (WENDLING & XAVIER, 2001).

Em espécies de fácil enraizamento, as estacas podem ser coletadas em qualquer época do ano, enquanto que para aquelas de difícil rizogênese, o período de maior enraizamento coincide com a estação de repouso ou com a estação de crescimento (PAIVA & GOMES, 1993). As estacas coletadas em um período de crescimento vegetativo intenso (primavera/verão) apresentam-se mais herbáceas, e as colhidas em um período de repouso vegetativo ou de dormência (outono/inverno) apresentam-se mais lignificadas e de um modo geral tendem a enraizar menos (HARTMANN et al., 2002). Porém, a coleta no outono pode permitir a obtenção de estacas num período em que a planta apresenta uma concentração elevada de reservas, o que pode favorecer o enraizamento (ANTUNES et al., 1996).

O fator juvenilidade dos propágulos exerce grande influência no enraizamento de estacas, uma vez que a formação de raízes adventícias diminui à medida que avança a idade da planta matriz fornecedora dos propágulos (HARTMANN et al., 2002). Há um gradiente de juvenilidade em direção à base da planta, sendo este variável entre espécies, o que promove um aumento da maturidade em função da maior proximidade com o meristema apical (HIGASHI et al., 2000). A maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato de que os meristemas mais próximos da base se formaram em épocas mais próximas à germinação, do que aqueles das regiões terminais ((HARTMANN et al., 2002). Esse fato tem limitado a propagação de diversas espécies florestais por estaquia, fazendo-se muitas vezes necessário o uso de métodos capazes de reverter as plantas do estado maduro ao juvenil, tais como o revigoramento e rejuvenescimento, tornando possível o processo de enraizamento adventício (BONGA & VON ADERKAS, 1983). O revigoramento consiste na aplicação de práticas, como adubação, irrigação, sombreamento, podas e controle de pragas e doenças, que visem retornar a planta a um estado de alto vigor fisiológico. Já o rejuvenescimento pode ser considerado como a forma de reversão do tecido das plantas do estado maduro para o juvenil (WENDLING, 2002).

2.2.2 Rejuvenescimento de espécies lenhosas

A maturidade frequentemente é confundida com a idade cronológica da planta, embora a maturidade seja reversível e a idade provavelmente não. Com o avanço da idade, a planta ou

órgão tende à senescência e morte, porém o meristema apical maduro de plantas pode ter a juvenilidade restaurada (HUANG et al., 1990). Para tal é necessário utilizar métodos capazes de reverter ou manter a juvenilidade das plantas, dentre os quais se destaca a propagação vegetativa seriada (WENDLING & XAVIER, 2001).

A miniestaquia seriada é um processo que proporciona rapidez no enraizamento, tornando-se um método alternativo e promissor no rejuvenescimento de clones de eucalipto. No entanto, ainda há carência de informações sobre o método da miniestaquia seriada no rejuvenescimento de espécies arbóreas (WENDLING & XAVIER, 2003). Já a enxertia de ramos adultos em porta-enxertos é um método de maior complexidade, sendo necessária a realização de enxertia em cascata, ou seja, sucessivas enxertias utilizando os brotos formados no enxerto. Outras desvantagens dessa técnica seriam o alto custo, a maior demanda de tempo, os problemas de incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto (ELDRIDGE et al., 1994) e a promoção de rejuvenescimento apenas parcial dos brotos do enxerto (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A micropropagação tem sido utilizada tanto no resgate quanto no rejuvenescimento de árvores adultas, sendo realizada por subcultivos sucessivos (ALFENAS et al., 2004) em meio de cultura contendo citocinina, proporcionando a recuperação da competência do enraizamento de propágulos advindos de espécies lenhosas (ASSIS et al., 1992). Para o rejuvenescimento de espécies florestais, a micropropagação tem sido eficiente, mas o uso ainda é limitado pela falta de tecnologias específicas, pelos elevados custos envolvidos no processo (WENDLING & XAVIER, 2001) e pela dificuldade de estabelecimento *in vitro* de plantas matrizes adultas.

2.2.3 Micropropagação

A micropropagação se baseia no cultivo de plantas ou partes, denominados explantes, em meio de cultura apropriado e asséptico, sob condições de temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância controlados em sala de crescimento (TEIXEIRA & TORRES, 1998). O meio de cultura possui substâncias essenciais que suprem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células, sendo constituído basicamente de macro e micronutrientes, sacarose, vitaminas e fitorreguladores (CALDAS et al., 1998). Os fitorreguladores são utilizados para induzir respostas específicas nos explantes, sendo as auxinas e citocininas substâncias de maior

destaque na promoção da competência e da determinação celular dos tecidos à formação de parte aérea e raízes (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A micropropagação apresenta as seguintes fases: 0) condicionamento da planta matriz, relacionado com o estagio fisiológico, com o ambiente onde se encontra e com as condições de sanidade (DEBERGH & READ, 1991); i) seleção dos explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo, sob condições assépticas; ii) multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos, objetivando a produção do maior número de plantas possível, em menor espaço de tempo; iii) transferência da parte aérea para o meio de enraizamento *in vitro*; iv) transplântio das plantas para substrato e manutenção em casa de vegetação, sob condições de alta umidade (MURASHIGE, 1974).

Durante os últimos anos houve um expressivo aumento no uso da micropropagação. Isso porque essa tecnologia proporciona o aumento dos índices de enraizamento dos propágulos e uma rápida multiplicação de indivíduos com características de interesse econômico ou ambiental (TITON et al., 2003), além de possibilitar o controle sobre a sanidade do material propagado (MELO et al., 1999). No caso do louro-pardo, a micropropagação foi apontada como uma alternativa para a propagação vegetativa (MANTOVANI et al., 1996; MANTOVANI et al., 2001; FICK et al., 2007).

2.2.3.1 Estabelecimento *in vitro* de plântulas

Explantes provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro* são excelentes propágulos para a micropropagação, especialmente por apresentarem tecidos juvenis com pronta capacidade de crescimento e resposta morfogênica à aplicação de fitorreguladores (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Contudo, a obtenção de plântulas assépticas pela desinfestação de sementes é uma etapa problemática, pois o agente desinfestante utilizado na assepsia do material vegetal deve eliminar os microorganismos de superfície, sem, contudo, danificar os tecidos (BONGA & DURZAN, 1985). Diversas substâncias com ação germicida são utilizadas para a assepsia de explantes, sendo o etanol e o hipoclorito de sódio e de cálcio, as substâncias mais eficazes. Além disso, o uso do detergente Tween 20, em concentrações que variam de 0,01 a 0,05% (v/v), pode aumentar as taxas de desinfestação, pelo fato de propiciar um maior contato das soluções desinfestantes à base de cloro com o tecido das sementes (GRATTAPAGLIA & MACHADO,

1998). Sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) desinfestadas por 30 s. em álcool 70%, seguido da imersão em 1% de hipoclorito de sódio por 10 min., não apresentaram contaminação (ANDRADE et al., 2000). Em sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) foi necessária a aplicação de 2 % de hipoclorito de sódio por 75 min. para uma desinfestação eficaz (NUNES et al., 2002). Em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) foi observado 89 % de contaminação nos tratamentos sem substâncias desinfestantes, mostrando a importância desse agente na assepsia de sementes (COUTO et al., 2004).

Para o louro-pardo, a retirada do tegumento e a imersão das sementes em solução de álcool 70% por 30 s foram suficientes para a obtenção de 95% de desinfestação, permitindo a produção de plântulas assépticas (FICK et al., 2007). Porém, o lote de sementes pode influenciar nos resultados de assepsia, pois os biomas brasileiros apresentam diferentes composições microbiológicas associada às plantas (FERMINO JUNIOR et al., 2009), sendo a incidência de microorganismos, a exemplo de bactérias e fungos, variável conforme a origem das sementes. Desse modo, faz-se necessária a realização de estudos adicionais que abordem a desinfestação de sementes de louro-pardo, para favorecer o estabelecimento *in vitro* de um grande número de plântulas assépticas.

2.2.3.2 Multiplicação *in vitro*

A multiplicação envolve o isolamento e a inoculação *in vitro* de explantes contendo gemas axilares pré-existent, que serão induzidas à formação dos brotos (DEBERGH & READ, 1991). Para indução dos brotos, comumente são adicionados fitorreguladores ao meio de cultura, que direcionarão as respostas morfogênicas dos explantes para a formação e o crescimento de estruturas vegetativas. As citocininas são os fitorreguladores mais indicados para a quebra da dominância apical e indução de gemas axilares (HARTMANN et al., 2002), com destaque para o 6-benzilaminopurina (BAP), que tem promovido boas respostas de brotação em explantes de diversas espécies, além do baixo custo de aquisição, quando comparado às demais citocininas.

Na multiplicação *in vitro* de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), explantes de segmento nodal e apical tratados com 4,5 μM de BAP e inoculados em meio MS modificado, apresentaram brotos mais alongados, quando comparados aos tratamentos com 0; 2,3 ou 6,7 μM da citocinina (ANDRADE et al., 2000). A adição da dose de 1 mg L^{-1} de BAP ao meio de cultura

WPM (LLOYD & McCOWN, 1981) estimulou o crescimento de gemas axilares em segmentos nodais de caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.)), proporcionando maiores taxas de multiplicação (MANTOVANI et al., 1999). Para o louro-pardo, o meio de cultura WPM, suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de BAP e ácido giberélico (GA₃), promoveu a maior taxa de multiplicação e o maior comprimento dos brotos (MANTOVANI et al., 2001). Por outro lado, a adição de fitorreguladores ao meio de cultura WPM não influenciou no número e comprimento dos brotos formados em segmentos nodais e apicais de louro-pardo, embora tenha possibilitado a manutenção de microcepas para novas coletas de brotos, aumentando assim a taxa de multiplicação (FICK, 2007).

2.2.3.3 Enraizamento *in vitro*

A fase de enraizamento se caracteriza pela formação de raízes adventícias nos brotos provenientes da etapa de multiplicação. A qualidade dos brotos é determinante nesse processo, pois se estes apresentarem entrenós muito curtos não se constituem explantes adequados ao enraizamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Além disso, a utilização de auxinas tem otimizado a rizogênese *in vitro*, sendo aplicadas sozinhas ou em combinação com citocininas, em doses que variam de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹, conforme a espécie ou genótipo que está sendo propagado. Dentre as auxinas comumente empregadas, destacam-se o ácido indolbutírico (AIB), o ácido naftalenacético (ANA) e o ácido indolacético (AIA) (FACHINELLO et al., 1994). Em brotos de caixeta inoculados em meio de cultura suplementado com 0,50 mg L⁻¹ de AIB e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, foi observado um maior enraizamento dos explantes (MANTOVANI et al., 1999). Segmentos cotiledonares de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* Benth. Bren.) tratados com 1,0 mg L⁻¹ de AIB apresentaram maior potencial de enraizamento *in vitro* e forneceram mudas com maior porcentagem de sobrevivência durante a aclimatização (KIELSE et al., 2009).

A utilização de carvão ativado no meio de cultura, em doses que variam de 0,1 a 2% (p/v), pode ser benéfica ao enraizamento. Essa substância tem a função física de estimular a condição de escuro necessária à formação de raízes em explantes de algumas espécies, além da função química de fixar citocininas residuais dos tecidos das plantas e adsorver compostos tóxicos que inibem o enraizamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Para o louro-pardo, os

tratamentos utilizando $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado promoveram 73% de enraizamento *in vitro* (MANTOVANI et al., 2001). Porém, estudos que abordem o efeito das auxinas no enraizamento adventício de *Cordia trichotoma* (Vell.) ainda são escassos.

3 CAPÍTULO 1 – ESTAQUIA DE LOURO-PARDO

3.1 Introdução

Pertencente a família boraginaceae, o louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.) é uma das espécies nativas mais promissoras para plantio na região sul, centro-oeste e sudeste do Brasil, apresentando rápido crescimento, boa forma, madeira de excelente qualidade e regeneração natural vigorosa (CARVALHO, 2003). A propagação do louro-pardo ocorre naturalmente por via sexuada, porém, o fato de apresentar sementes recalcitrantes ao armazenamento e germinação irregular (CARVALHO, 2003), torna necessária a realização de estudos sobre técnicas alternativas que possam viabilizar o processo de produção de mudas dessa espécie.

O emprego de tecnologias em plantios florestais, desde a seleção de plantas matrizes até métodos eficientes de produção de mudas, tem contribuído de maneira significativa ao desenvolvimento do setor florestal brasileiro. A escolha de indivíduos superiores, associada ao uso de processos capazes de propagá-los vegetativamente, viabilizou técnica e economicamente a produção de mudas de diversas espécies. A estaquia é um dos métodos utilizados para a clonagem de plantas perenes, pois possibilita a multiplicação de árvores adultas com características superiores (THORPE et al., 1991) e a produção de mudas com menor variabilidade genética, favorecendo a formação de povoamentos mais uniformes e de alta produtividade (XAVIER & SANTOS, 2002).

Apesar de a estaquia ser uma possível alternativa para a produção de mudas de *Cordia trichotoma* Vell., não há referências que abordem o enraizamento de estacas da espécie. Em *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken foi observado que a formação de raízes em estacas foi beneficiada com o uso do AIB, embora tenha sido relatado que as condições do ambiente de enraizamento devem ser cuidadosamente reguladas, por exercerem grande influência nos processos rizogênicos dessa espécie (MESÉN et al., 1997). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito do AIB no enraizamento de estacas basais e apicais de árvores matrizes de louro-pardo.

3.2 Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (LMPVP), na casa de sombra e em câmara úmida, pertencentes ao Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. O material vegetal foi constituído de ramos coletados de três árvores adultas de louro-pardo, situadas em propriedade rural na localidade de Faxinal da Palma, sob as coordenadas geográficas: latitude $29^{\circ}45'13$ Sul e longitude $53^{\circ}34'45,73$ Oeste, município de Santa Maria, RS. A coleta foi realizada no mês de agosto de 2009. As plantas matrizes doadoras de propágulos M01, M02 e M03 foram georeferenciadas (Figura 2), com o auxílio de um aparelho de Sistema de Posicionamento Global (GPS Garmin Etrex Legend).



Figura 2 – Imagem de satélite da localização de três árvores matrizes de louro-pardo doadoras de propágulos (M01, M02, M03), situadas em propriedade rural na localidade de Faxinal da Palma, município de Santa Maria, RS. Santa Maria, RS, 2010.

Os ramos coletados e mantidos em baldes com água foram transportados para o LMPVP, onde foram lavados em água corrente, durante 5 min., para a limpeza. Para realização do experimento, o material vegetal foi confeccionado em estacas basais (0,7 cm de diâmetro) e apicais (0,4 cm de diâmetro), desprovidas de folhas, com 12 cm de comprimento e um corte em bisel na base. A base das estacas foi imersa por 10 s. em 0 ou 8000 mg L⁻¹ de AIB, diluído em solução alcoólica na proporção de 50% e então foram plantadas em bandejas plásticas (Figura 3A) contendo substrato composto por uma mistura de areia, substrato comercial à base de casca de pinus e vermiculita (1:1:1 v/v/v).

O material foi acondicionado em câmara úmida com irrigação por aspersão, durante 1 min. a cada 30 min. no período mais quente do dia, e por 1 min. a cada hora no período de temperaturas mais baixas, com tempo controlado por programador horário. Aos 40 dias, foram avaliadas as porcentagens de sobrevivência, de enraizamento, de presença de calos e de brotação (Figura 3B); o número e o comprimento de brotos e o número de folhas. A avaliação da porcentagem de sobrevivência foi realizada aos 80 dias.

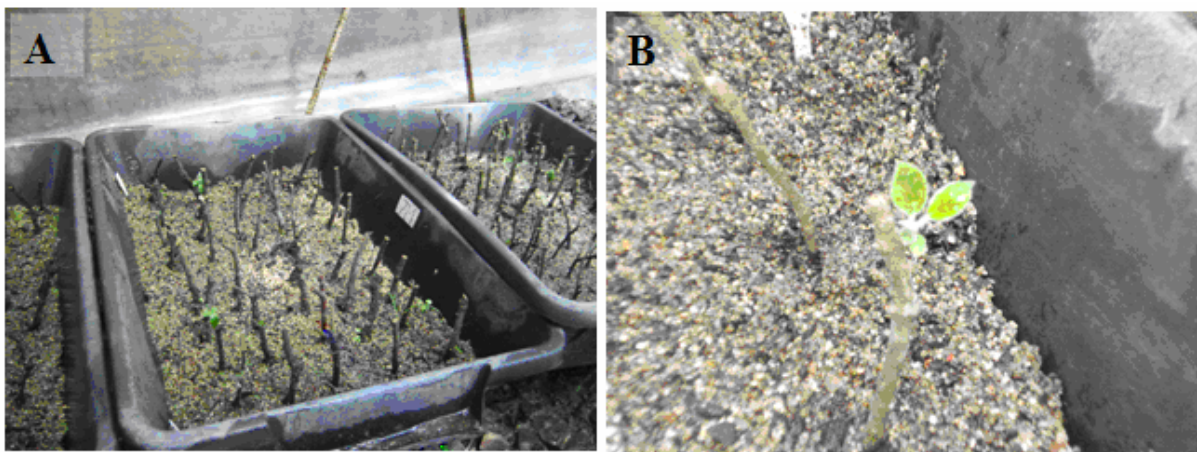


Figura 3 – Aspecto das estacas de louro-pardo aos 40 dias de permanência em câmara úmida (A); Detalhe de broto em estaca basal de louro-pardo sem tratamento com AIB (B). Santa Maria, RS, 2010.

O experimento foi conduzido em um fatorial 2 x 2 (doses de AIB e tipo de estaca), no delineamento em blocos ao acaso, sendo cada bloco correspondente a uma árvore matriz, totalizando 3 repetições de 30 estacas cada uma. Os dados foram submetidos à análise de

variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. Para a realização das análises utilizou-se o programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os dados de porcentagem foram transformados para $\arcseno\sqrt{x/100}$.

3.3 Resultados e discussão

Não houve interação entre o tipo de estaca e a dose de AIB aos 40 dias de avaliação, indicando que estes fatores são independentes. Para todos os parâmetros de brotação, não houve diferença significativa entre as estacas basais e apicais de louro-pardo (Tabela 1). Essa resposta não era esperada, pois ao longo do ramo pode existir diferença no conteúdo de carboidratos, aminoácidos e de outras substâncias, como auxinas, que servirão como reserva energética necessárias para que ocorram respostas morfogênicas nos propágulos (HARTMANN et al., 2002). Além disso, não foi observado o enraizamento das estacas. Dessa forma, é provável que o fator de maior influência nas respostas obtidas, foi o alto grau de lignificação das estacas lenhosas, dificultando a regeneração do material. Estacas mais lignificadas apresentam maior dificuldade para enraizar, seja pela presença de um anel de esclerênquima contínuo, que pode constituir uma barreira física à emergência das raízes, ou pela menor habilidade fisiológica em formar primórdios radiculares (TOFANELLI, 1999).

Tabela 1 – Respostas de brotação em estacas basais e apicais de louro-pardo, cultivadas em substrato composto por uma mistura de areia, substrato comercial à base de casca de pinus e vermiculita (1:1:1 v/v/v), tratadas ou não com 8000 mg L⁻¹ de AIB, e mantidas por 40 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2010.

Tipo de estaca	Brotação (%)	Número de brotos	Comprimento de brotos (cm)	Número de folhas
Basal	53 a*	1,85 a	0,62 a	6,81 a
Apical	45 a	1,30 a	0,61 a	5,05 a

* Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Foi observado que a aplicação ou não de AIB na base das estacas não influenciou significativamente as respostas de brotação, independente do tipo de estaca utilizado (Tabela 2).

Tabela 2 – Respostas de brotação em estacas de louro-pardo tratadas ou não com 8000 mg L⁻¹ de AIB, cultivadas em substrato composto por uma mistura de areia, substrato comercial à base de casca de pinus e vermiculita (1:1:1 v/v/v), e mantidas por 40 dias em câmara úmida. Santa Maria, RS, 2010.

AIB (mg L⁻¹)	Brotação (%)	Número de brotos	Comprimento de brotos (cm)	Número de folhas
0	46 a*	1,52 a	0,65 a	6,17 a
8000	53 a	1,63 a	0,58 a	5,7 a

* Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Um aspecto importante a ser considerado na propagação por estaquia é a idade fisiológica do ramo coletado. No presente estudo, as estacas foram coletadas no mês de agosto de 2009, período em que as árvores se encontravam em repouso vegetativo. Foi observada a porcentagem de 100% de sobrevivência aos 40 dias em câmara úmida, tanto no tratamento sem presença de AIB quanto no tratamento utilizando 8000 mg L⁻¹ de AIB, porém não ocorreu formação de calos ou raízes. Em testes preliminares de estaquia de louro-pardo realizados no mês de abril de 2009, período vegetativo de crescimento intenso, não foi observado o surgimento de calos, brotos ou raízes em estacas apicais tratadas com 0, 6000 ou 8000 mg L⁻¹, e antes dos 30 dias de permanência em câmara úmida, observou-se o índice de 100% de mortalidade (dados não apresentados). Além disso, neste estudo as estacas brotaram e não enraizaram, o que pode ser explicado pelo fato de que em algumas espécies, o consumo de reservas para a formação de brotos prejudica o enraizamento (HARTMANN et al., 2002). Contudo, para o louro-pardo não existem relatos sobre o enraizamento de material adulto, sendo necessária a realização de estudos complementares, testando fatores como tipos de substratos, épocas de coleta e doses de AIB, possibilitando a comprovação da existência da relação inversa entre a capacidade de brotação e o enraizamento das estacas dessa espécie. Resultado semelhante foi observado em estacas adultas

de vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia* Dusén), onde os propágulos coletados no outono apresentaram brotos, mas não enraizaram, e posteriormente morreram (FERRIANI, 2006).

O fato de as estacas, aos 40 dias em câmara úmida, apresentarem 100% de sobrevivência, sugere que a aplicação de AIB e a posição de coleta de estaca no ramo não influenciaram a sobrevivência das mesmas, e que, durante esse período, houve uma adequação do ambiente à manutenção da sobrevivência dos propágulos vegetativos de louro-pardo, o que não ocorreu para a rizogênese. A utilização de um ambiente adequado e com nebulização aumentam as chances de sobrevivência das estacas (GRAÇA et al., 1988), uma vez que as condições ideais de umidade e de temperatura garantem o seu turgor hídrico, embora a sobrevivência na casa de vegetação não seja uma garantia para o posterior enraizamento (IRITANI & SOARES, 1983).

Aos 80 dias de permanência em câmara úmida foi possível realizar apenas a avaliação de sobrevivência das estacas, na qual se observou 100% de mortalidade, precedida pela morte e queda dos brotos, indicando que o surgimento dos mesmos em estacas provenientes de plantas adultas de louro-pardo não garante a sobrevivência ou o enraizamento. Além disso, estacas de espécies de difícil enraizamento, mantidas por prolongado período em câmara de nebulização, podem ser prejudicadas pelo excesso de umidade (NACHTIGAL et al., 1994). Também se observou que a morte das estacas teve início com a necrose na base, indicando que as condições do substrato podem estar envolvidas na elevada porcentagem de mortalidade.

Espécies florestais nativas apresentam grandes variações na capacidade de enraizamento de estacas obtidas de propágulos adultos. Em canela (*Ocotea puberula* Benth Hook e *Ocotea pretiosa* Nees) não foram verificadas respostas rizogênicas nas estacas tratadas com 0, 2000 ou 4000 mg L⁻¹ de AIB (SILVA, 1984). Estacas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart.) apresentaram 26,5% de enraizamento no tratamento com 2000 mg L⁻¹ de AIB (NAZÁRIO et al., 2007). Em estudo com o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze.) também foi verificada baixa porcentagem de enraizamento das estacas, com 10,42% de enraizamento para a testemunha e apenas 2,08% quando utilizadas as doses de 5000 mg L⁻¹ de AIA e 1000 mg L⁻¹ de AIB (IRITANI & SOARES, 1983). Já em corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli* L.) ocorreram altos índices de enraizamento das estacas, variando de 60 a 100%, de acordo com o tipo de propágulo utilizado (CHAVES et al., 2003).

Os resultados de enraizamento das estacas de louro-pardo também podem ter sido afetados pela baixa capacidade genética das árvores matrizes para a formação de raízes

adventícias, uso de propágulos com idade fisiológica desfavorável ao enraizamento, e com tamanho inadequado, embora o fator preponderante na dificuldade de enraizamento de propágulos maduros seja o grau de juvenilidade (HARTMANN et al., 2002). O fator juvenilidade exerce grande influência na propagação vegetativa, pois a velocidade e facilidade de enraizamento dos propágulos decresce com a idade da planta matriz que os originou (HARTMANN et al., 2002). Para muitas espécies lenhosas, a estaquia a partir de mudas de origem seminal oferece maiores chances de sucesso no enraizamento do que com material adulto, por se tratar de material juvenil (GRAÇA et al., 1988). Em erva-mate, estacas de matrizes adultas atingiram uma porcentagem média de 26,7% de enraizamento (HORBACH, 2008). Estacas provenientes de mudas a porcentagem de enraizamento chegou a 60% (HIGA, 1985). Em estudo desenvolvido com cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) houve 100% de enraizamento de miniestacas caulinares de plântulas (XAVIER et al., 2003). Em miniestaquia de louro-pardo, apesar da alta sobrevivência, apenas quatro miniestacas, submetidas ou não à aplicação de AIB, enraizaram, embora este resultado tenha sido atribuído em parte às más condições ambientais de enraizamento (FICK, 2007).

Os resultados negativos de sobrevivência e enraizamento das estacas, aos 80 dias de avaliação, demonstram que os procedimentos adotados no presente estudo não se mostraram eficientes tecnicamente para a propagação vegetativa do louro-pardo por estaquia e são ainda inconclusivos. Recomenda-se a realização de estudos com maior número de indivíduos e também com material juvenil, a exemplo de brotos coletados em minicepas (miniestacas) e a adoção de técnicas que promovam o rejuvenescimento dos tecidos das estacas, permitindo a elucidação dos processos envolvidos no enraizamento destas. Além disso, admite-se a grande importância da realização de análises anatômicas e bioquímicas das estacas, para verificar possíveis barreiras físico-químicas que possam estar impedindo a iniciação do enraizamento adventício em estacas de louro-pardo.

3.4 Conclusão

A imersão da base das estacas apicais ou basais em 8000 mg L⁻¹ de AIB não promove o enraizamento.

4 CAPÍTULO 2 – MICROPROPAGAÇÃO DE LOURO-PARDO

4.1 Introdução

O uso de tecnologias que aperfeiçoem o processo de produção de mudas do louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.) pode contribuir às atividades de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, considerando seu importante papel na colonização de áreas alteradas, pois pertence ao grupo sucessional secundário inicial a secundário tardio, com tendência à pioneira (BOTELHO et al., 2006). A reprodução sexuada da espécie é dificultada pela perda da viabilidade das sementes, quando armazenadas em ambiente não controlado, e pela germinação lenta e irregular (MENDONÇA et al., 2001). Isso resulta na produção de mudas de baixa qualidade genética e em povoamentos de alta variabilidade, o que inviabilizaria economicamente o plantio comparado com espécies exóticas, para as quais já existe considerável conhecimento científico e tecnológico do processo produtivo das mudas, incluindo a propagação vegetativa.

A propagação vegetativa pode ser uma alternativa para a produção de mudas uniformes e de alta qualidade genética de espécies nativas. Dentre as técnicas existentes, a micropropagação, que possibilita a regeneração e propagação de novas plantas e permite acelerar o processo de propagação clonal (HARTMANN et al., 2002), pode ser conduzida pela indução de gemas adventícias (via organogênese direta ou indireta), pela embriogênese somática, ou ainda, pela proliferação de gemas axilares pré-formadas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), sendo a última a técnica mais utilizada na regeneração de plantas lenhosas (BONGA & DURZAN, 1985). A maioria das espécies são micropropagadas pela cultura de ápices vegetativos e segmentos caulinares, tanto para a produção massal de indivíduos com interesse comercial quanto para a preservação de genótipos superiores ou que estão em via de extinção (TERMIGNONI, 2005).

O meio nutritivo utilizado no cultivo *in vitro* deve fornecer os nutrientes essenciais para o crescimento dos tecidos e controlar o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Baseia-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Diversos estudos testaram uma variedade de meios de cultura para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas (MANTOVANI et al., 1999; ZANIOLO & ZANETTE, 2001; MELO et al., 1999; NUNES et al., 2002; AMARAL,

2006; ROCHA et al., 2007). Plântulas de louro-pardo estabelecidas em meio de cultivo WPM (LLOYD & McCOWN, 1981) apresentaram maior crescimento se comparadas às mantidas em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais (FICK et al., 2007). Na multiplicação com segmentos nodais de louro-pardo, o meio de cultura WPM proporcionou um maior estímulo ao desenvolvimento das gemas axilares, tanto no número quanto no comprimento dos brotos formados (MANTOVANI et al., 2001).

Plântulas obtidas pela germinação de sementes em condições assépticas, embriões ou tecido das sementes são utilizados como fontes iniciais de explantes para a regeneração de espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Por isso, faz-se necessária a utilização de métodos capazes de promover a desinfestação das sementes, para que plântulas sirvam como fonte segura de explantes (COUTO et al., 2004). A relevância do hipoclorito de sódio (NaOCl) na assepsia de sementes foi relatada para diversas espécies. Sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King), sem o tegumento, apresentaram apenas 89% de contaminação quando não tratadas com NaOCl (COUTO et al., 2004). Já em sementes de canjarana (*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.) foi verificado 75% de estabelecimento quando utilizado esse agente desinfestante (ROCHA, 2005). Diversas substâncias com ação germicida são utilizadas na assepsia de sementes, sendo que o tipo, a concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição a estes compostos pode variar conforme a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (MONTARROYOS, 2000).

O objetivo deste trabalho foi o de estabelecer um protocolo de desinfestação e germinação *in vitro* de sementes e de micropropagação de louro-pardo.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas, pertencente ao Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. As inoculações foram realizadas em meio de cultura base WPM (LLOYD & McCOWN, 1981) (Tabela 3), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após a inoculação em câmara de fluxo

laminar, os frascos foram fechados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC) e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de $14,3 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas fluorescentes.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura WPM (LLOYD & McCOWN, 1981) utilizado no experimento de micropropagação do louro-pardo.

Componentes	WPM (mg L⁻¹)
Macronutrientes	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556,00
NH ₄ NO ₃	400,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	96,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
K ₂ SO ₄	990,00
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
H ₃ BO ₃	6,20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
Ferro-EDTA	
Na ₂ EDTA	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Vitaminas	
Tiamina-HCl	1,00
Piridoxina-HCl	0,50
Ac. Nicotínico	0,50
Glicina	2,00
Mio-inositol	100,00

4.2.2 Estabelecimento *in vitro* de plântulas

Foram utilizadas sementes de louro-pardo coletadas na cidade de Porto Alegre - RS. Inicialmente, as sementes foram embebidas por 18 h em água destilada e autoclavada, para facilitar a retirada do tegumento. Após, as sementes foram submetidas a uma pré-asepsia em solução de 5% de hipoclorito de sódio (NaOCl) e três gotas de Tween 20 por 100 mL de solução, por 30 min. Após, procederam-se a retirada do tegumento e a imersão em etanol na concentração

de 70%, durante 30 s. (FICK et al., 2007). Para a desinfestação, foram testadas as doses de 2% e 5% de NaOCl, acrescido de três gotas de Tween 20, durante 5, 10, 15 ou 20 min., mais o tratamento controle, que correspondeu apenas à pré-asepsia das sementes. Entre cada procedimento, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. As inoculações foram realizadas em frascos de 10 mL contendo 5 mL de meio de cultura base; e os cultivos mantidos em sala de crescimento por 30 dias, permanecendo nos primeiros sete dias em fotoperíodo negativo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um fatorial 2 x 5 (doses de NaOCl x tempo de imersão), com cinco repetições de oito sementes cada uma. Aos 30 dias foram avaliadas as porcentagens de desinfestação e de contaminação por fungos e/ou bactérias. As taxas de germinação foram obtidas em intervalos de três dias, até 30 dias após a inoculação, possibilitando o cálculo do tempo médio de germinação, expresso pela equação $TMG = (N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_nT_n) / (N_1 + N_2 + \dots + N_n)$, sendo N o número de sementes germinadas e T o tempo em dias (HARRINGTON, 1972). O critério considerado para contabilizar a germinação foi a protusão da radícula das sementes.

4.2.3 Multiplicação *in vitro*

4.2.3.1 Efeito da citocinina 6-benzilammonopurina (BAP) na indução de brotos em ápices caulinares

Os explantes foram retirados de plântulas de louro-pardo com 30 dias após a germinação *in vitro*. Ápices caulinares, com 0,8 a 1,0 cm de comprimento, um nó e 2 a 3 folhas, foram inoculados em meio de cultura base, acrescidos de diferentes doses de BAP (0; 0,25; 0,5 ou 0,75 mg L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes foram inoculados verticalmente em frascos de 150 mL contendo 30 mL do meio de cultura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de quatro frascos, e um explante por frasco. Aos 45 dias em sala de cultivo avaliaram-se o comprimento, o número de folhas e de entrenós dos brotos, a porcentagem de calos e a sobrevivência dos explantes.

4.2.3.2 Produção de brotos em microcepas mantidas *in vitro*

Para multiplicação *in vitro* utilizando microcepas como fonte de explantes. Plântulas assépticas foram estabelecidas *in vitro*, conforme descrito no item 4.2.2, tiveram a parte aérea podada acima da primeira folha, constituindo-se as microcepas que foram mantidas em frascos de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura base (FICK, 2007), acrescido ou não de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. Foram efetuados dois cortes para coleta dos brotos, aos 30 e aos 60 dias, sendo que, na ocasião das podas, as microcepas foram reidratadas manualmente, com cerca de 1 mL de meio WPM. Cada microcepa foi identificada, possibilitando o controle do material genético e do desempenho *in vitro* de cada matriz.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de três microcepas cada uma, e uma microcepa por frasco. Aos 30 e 60 dias, primeiro corte e primeira rebrota das microcepas, foram avaliados o número e comprimento dos brotos, o número de folhas e de entrenós dos brotos, e o número de microestacas. Considerou-se microestacas os segmentos de brotos que apresentaram tamanho entre 0,8 e 1,0 cm e um par de folhas.

4.2.4 Enraizamento *in vitro*

Brotos obtidos 30 dias após o primeiro corte das microcepas estabelecidas *in vitro* foram utilizados para preparar microestacas, com 0,8-1,0 cm de comprimento, e um par de folhas cortadas ao meio. Para o enraizamento, as microestacas foram cultivadas em frascos de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura base, acrescido de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, e acrescido de AIB ($1,0$ ou $1,5 \text{ mg L}^{-1}$).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de oito microestacas cada uma e dois explantes por frasco. Aos 45 dias foram avaliadas a presença de raízes e calos, e as porcentagens de sobrevivência e de brotação.

4.2.5 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro, ou pela análise de regressão. As análises foram

realizadas com o auxílio do programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os dados de porcentagem transformados para $\arcseno\sqrt{x/100}$.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Estabelecimento *in vitro* de plântulas

Houve interação entre as doses de hipoclorito de sódio e o tempo de imersão para a porcentagem de sementes desinfestadas de louro-pardo (Figura 4). A maior porcentagem de desinfestação (100%) ocorreu nos tratamentos em que as sementes foram imersas em 2 ou 5% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 15 min. Resultados similares foram obtidos nos tratamentos com 5% de NaOCl, durante 5 min. (97,5%), seguido do tratamento com 2% de NaOCl, durante 10 min. (90%).

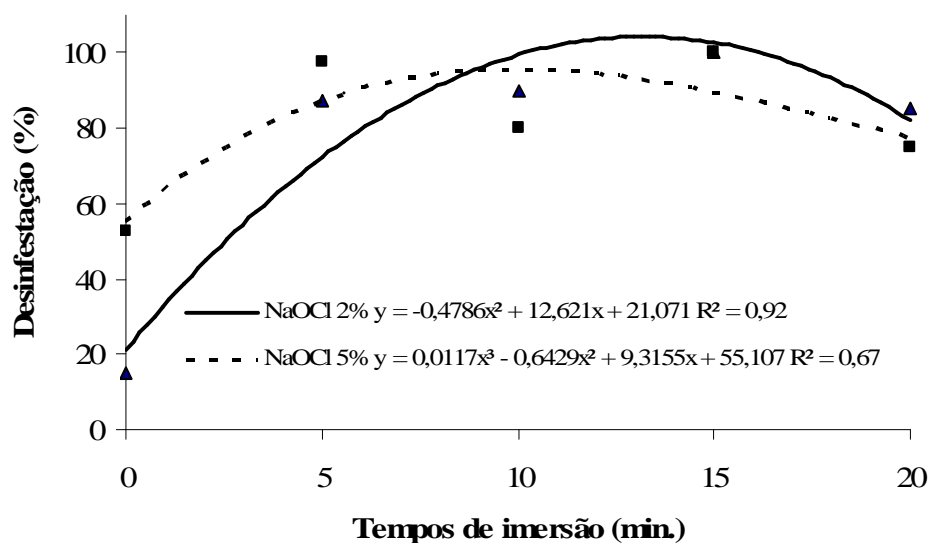


Figura 4 - Porcentagem de sementes de louro-pardo desinfestadas com diferentes doses de hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão, avaliada 30 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2010.

No tratamento controle (5% de NaOCl por 30 min., com o tegumento, e etanol 70% durante 30 seg., sem o tegumento) foram verificadas as menores porcentagens de desinfestação

(34%), indicando a necessidade de se utilizar NaOCl mesmo após a retirada do tegumento das sementes de louro-pardo. Fick (2007) verificou que apenas esse tratamento, considerado como controle neste trabalho, foi suficiente para uma efetiva assepsia das sementes de louro-pardo, chegando a 95% de desinfestação. A discordância dos resultados pode estar associada aos lotes de sementes utilizados, provenientes de época e origem diferentes. Em sementes de *Pinus* spp. foi observada uma grande variação nas respostas dos tratamentos de desinfestação, demonstrando a importância da determinação do estado sanitário de cada lote de sementes, já que estes apresentam diferenças dentro de uma mesma espécie (GOLLE, 2007). O fato de as sementes transportarem uma série de microorganismos, patogênicos ou não, que podem apresentar microfauna variável em diferentes regiões, torna necessária a realização de testes de sanidade de sementes para determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes e, conseqüentemente, do lote que representam (BRASIL, 1992).

Neste trabalho foi verificada a contaminação das sementes de louro-pardo por bactérias (Tabela 4) ou fungos (Tabela 5), sendo as bactérias os patógenos com maior ocorrência. Além disso, foi observado durante o período de germinação que, mesmo na presença de patógenos, muitas sementes foram capazes de germinar, indicando que a presença desses microorganismos não foi limitante. Resultado semelhante foi encontrado com angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* Benth. Bren.), em que a presença de patógenos não impediu a germinação das sementes (KIELSE, 2008). Contudo, a presença de patógenos endofíticos em sementes é uma das mais importantes causas de perda de material vegetal, tornando estudos de desinfestação de sementes de fundamental importância quando se deseja utilizar plantas assépticas como fonte de explante.

Tabela 4 - Porcentagem de contaminação por bactérias em sementes de louro-pardo, aos 30 dias, tratadas com diferentes doses e tempos de imersão em hipoclorito de sódio. Santa Maria, RS, 2010.

		Tempo de embebição (min.)				
		0	5	10	15	20
		Bactérias				
NaOCl (%)	2	72 aA*	25 aB	18 aB	0 aC	12 aB
	5	31 bA	0 bC	21 aB	0 aC	37 aAB
Média	21,6					
CV (%)	25,68					

*Médias seguidas de letras diferentes (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os tratamentos de desinfestação com 2 ou 5% de NaOCl, durante 5, 10 ou 15 min. foram eficientes para a obtenção plantas assépticas de louro-pardo. Contudo, a maior porcentagem de germinação (60%) ocorreu quando as sementes foram tratadas com 5% de NaOCl por 5 min. (Figura 5), seguido do tratamento controle. As taxas de germinação apresentaram grande variação em função dos tratamentos, sendo observadas porcentagens entre 15 e 32,5%, quando utilizado 2% de NaOCl, e entre 5 e 60%, quanto utilizado 5% de NaOCl.

Tabela 5 - Porcentagem de contaminação por fungos em sementes de louro-pardo, aos 30 dias, tratadas com diferentes doses e tempos de imersão em hipoclorito de sódio. Santa Maria, RS, 2010.

		Tempo de embebição (min.)				
		0	5	10	15	20
		Fungos				
NaOCl (%)	2	0 bA*	13 aA	0 bA	0 bA	13 aA
	5	17 aB	0 bB	0 bA	0 bA	0 bB
Média	4,30					
CV (%)	39,84					

*Médias seguidas de letras diferentes (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nos tratamentos com 5% de NaOCl foi possível observar uma menor porcentagem de germinação à medida que se aumentou o tempo de exposição das sementes ao agente desinfestante. Além disso, essa mesma dose de NaOCl, nos maiores tempos de imersão, provocou a necrose de algumas radículas. Esses resultados podem ser explicados pelo efeito fitotóxico do NaOCl, pois a utilização de elevadas concentrações do produto podem ser vantajosas na desinfestação das sementes, porém muitas vezes se tornam prejudiciais à germinação. Sementes de capiçova (*Erechtites valerianaefolia* DC.) tratadas com NaOCl tiveram potencial germinativo reduzido em 24%, além do retardo de aproximadamente 2,95 dias no tempo de germinação (ZAYAT & RANAL, 1997).

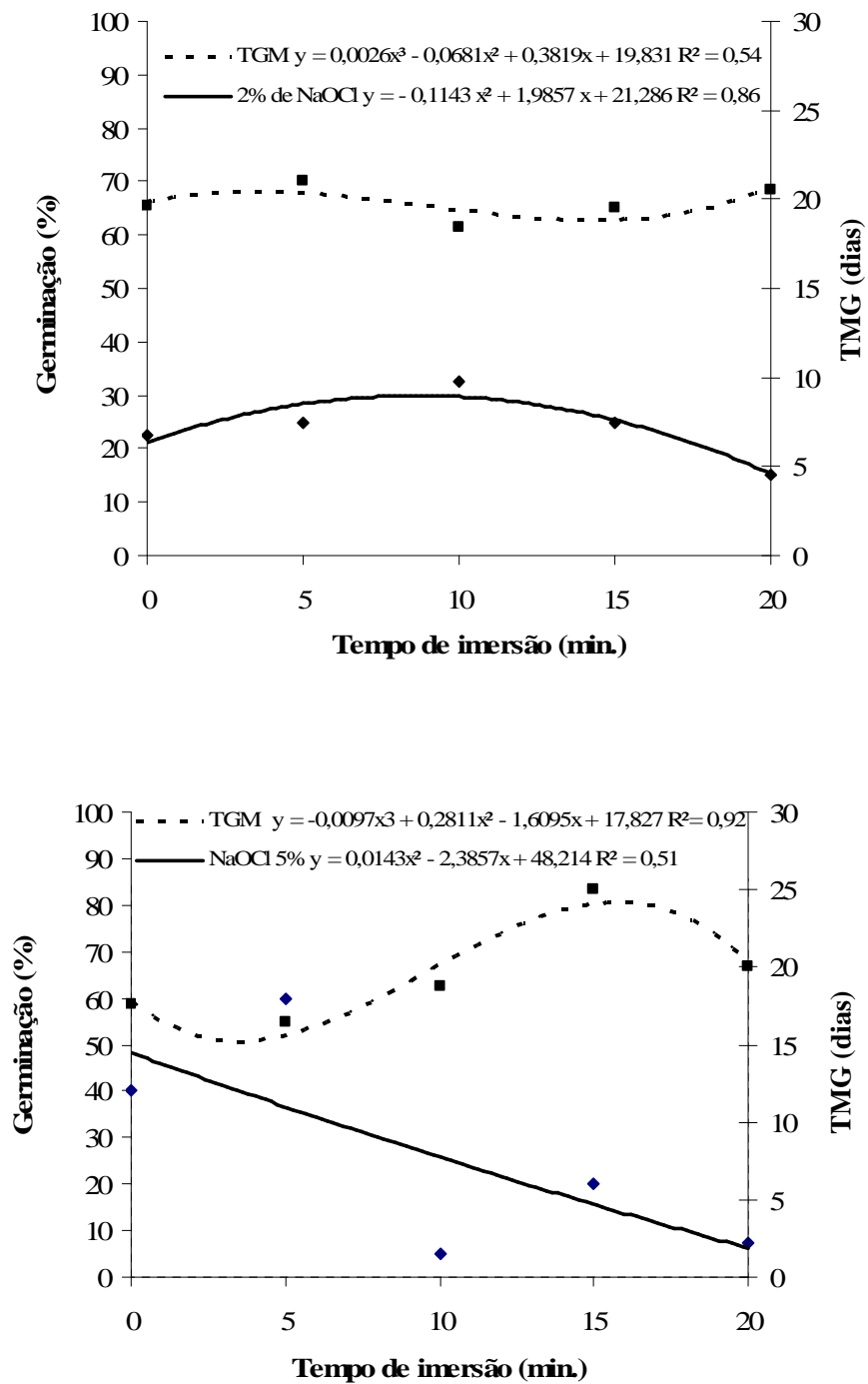


Figura 5 - Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de louro-pardo e o tempo médio de germinação (TMG) em função de tratamentos com diferentes doses de hipoclorito de sódio e tempos de imersão, avaliados 30 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2010.

No tratamento com 2% de NaOCl foi verificada baixa variação no TMG, permanecendo no período compreendido entre 18 e 21 dias. Porém, no tratamento com 5% de NaOCl, as sementes apresentaram germinação lenta, além de uma maior variação entre os diferentes tempos de imersão. Aos 15 e 20 min. o TMG atingiu os valores máximos, 25 e 20 dias respectivamente. Tais resultados novamente refletem o efeito prejudicial de doses elevadas do NaOCl, reduzindo a germinação ou aumentando o tempo médio da mesma, ou seja, afetou a germinação e o vigor das sementes.

4.3.2 Multiplicação *in vitro*

4.3.2.1 Efeito da citocinina 6-benzilamonopurina (BAP) na indução de brotos em ápices caulinares

Para todos os parâmetros avaliados, não houve diferença significativa entre as diferentes doses de BAP utilizadas (Tabela 6). A sobrevivência dos explantes atingiu níveis satisfatórios em todos os tratamentos, o que pode ser explicado pela origem do material vegetal, que eram plântulas assépticas, possibilitando, assim, o sucesso no estabelecimento dos explantes *in vitro*. Além disso, geralmente a sobrevivência dos explantes de espécies lenhosas é afetada pela liberação de compostos fenólicos no meio de cultura, causando danos à base dos explantes e, conseqüentemente, reduzindo a absorção de nutrientes e fitorreguladores (THOMAS & RAVINDRA, 1997). Nos explantes de louro-pardo foi observada baixa oxidação basal em todos os tratamentos (dados não apresentados), o que também pode explicar os bons resultados de sobrevivência. Houve a formação de broto único em 100% dos explantes, independente das doses de BAP utilizadas (dados não apresentados). A formação de brotos mesmo nos explantes inoculados em meio livre de fitorregulador indica que não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a brotação.

Em diversos estudos de multiplicação de espécies lenhosas, o comprimento dos brotos aumentou na medida em que se elevaram os níveis de BAP (PINTO et al., 1994; MANTOVANI et al., 1999; ANDRADE et al., 2000; SOUZA et al., 2003; KIELSE et al., 2009). As citocininas estimulam a formação e o crescimento de partes aéreas até uma determinada concentração, a qual varia de acordo com a espécie, sendo, a partir desta dose, prejudicial na promoção de respostas

morfogênicas nos explantes (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1998). Nos tratamentos utilizados no presente estudo não foi verificado esse efeito, provavelmente porque as doses testadas não atingiram níveis ótimos para o alongamento dos brotos, ou que provocassem toxicidade nos explantes de louro-pardo.

Tabela 6 – Porcentagem de sobrevivência e de calo, número de entrenós, de folhas e altura de brotos emitidos em ápices caulinares de louro-pardo cultivados em meio de cultura WPM acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, e de diferentes doses de BAP; aos 45 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2010.

BAP (mg L⁻¹)	Sobrevivência (%)	Número de folhas	Número de entrenós	Altura (cm)	Formação de calos (%)
0	94 A*	3.02 A	0.87 A	0.34 A	42 A
0,25	66 A	2.41 A	0.68 A	0.25 A	47 A
0,50	94 A	2.83 A	0.56 A	0.31 A	45 A
0,75	94 A	3.57 A	0.88 A	0.37 A	33 A

* Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

As respostas de brotação nos explantes tratados com BAP não foram consideradas satisfatórias, pois não possibilitaram o incremento na altura e no número de entrenós, suficientes para a individualização dos propágulos, podendo, esse fato, se refletirem na taxa de multiplicação do louro-pardo. Esses resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente, quando a adição de fitorreguladores ao meio de cultivo WPM, isolados ou em combinação, também não promoveu maior crescimento da parte aérea (FICK, 2007). Por outro lado, em outro trabalho, em segmentos nodais inoculados em meio basal WPM suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de BAP e de GA₃, foram observados brotos com maior altura da parte aérea, favorecendo a individualização, a contagem e o aproveitamento dos explantes de louro-pardo (MANTOVANI et al., 2001).

Foi observada a ocorrência de calo na base dos explantes em todos os tratamentos, sendo a porcentagem de formação calogênica uniforme considerando as diferentes doses de BAP utilizadas. Similarmente, em estudo de multiplicação de louro-pardo utilizando BAP, ANA ou GA₃, isoladamente, nas doses de 0,05; 0,10; 0,15 ou 0,20 mg L⁻¹; ou a combinação de 0; 0,1 ou 0,2 mg L⁻¹ de GA₃ com 0 ou 0,05 mg L⁻¹ de ANA, foi verificado que a formação de calos em ápices caulinares e segmentos nodais de louro-pardo não diferiram entre os tratamentos (FICK,

2007). Quantidades excessivas de citocininas estimulam a formação de calo, o que não é o objetivo na fase de multiplicação, pois a formação de calos na base do explante pode comprometer a proliferação de gemas axilares (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). No presente estudo, ocorreram altas porcentagens de calo nos explantes, em ambos os tratamentos, indicando que outras doses de citocininas devem ser testadas, isoladas ou em combinação com outros tipos de fitorreguladores, podendo-se concluir se as quantidades de BAP testadas comprometeram ou não a indução e o crescimento de brotos nos ápices caulinares.

Em algumas espécies, elevadas doses de citocinina adicionadas ao meio de cultura aumentam a toxicidade, o que não ocorreu neste trabalho. Em geral, os brotos apresentaram folhas verdes, vigorosas e brilhantes em ambos tratamentos aplicados. Isso pode reforçar a necessidade de se testar doses maiores e menores de BAP, para que seja possível concluir sobre a dose ótima e a dose tóxica para ápices caulinares de louro-pardo.

Em face dos resultados obtidos, nota-se que a multiplicação *in vitro* de louro-pardo é viável, porém recomenda-se a realização de novos estudos testando-se outras doses de BAP em explantes, isoladas e em combinação com diferentes doses de giberelinas e auxinas, já que essas atuam conjuntamente na morfogênese *in vitro* dos explantes, e também porque os dados apresentados não permitiram a determinação de um protocolo consistente para a multiplicação da espécie por meio de segmentos apicais.

4.3.2.2 Produção de brotos em microcepas mantidas *in vitro*

No primeiro e segundo cortes das microcepas estabelecidas *in vitro*, não houve diferença significativa entre os tratamentos para o número de brotos, folhas, entrenós e microestacas produzidos (Tabela 7). Para a altura dos brotos, o número de folhas, o número de entrenós e o número de microestacas, em ambos os cortes, foi possível observar a superioridade do meio de cultivo base acrescido de carvão ativado. Aos 30 dias do primeiro corte, a adição de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultivo incrementou a altura dos brotos de 1,63 cm (sem carvão ativado) para 2,62 cm.

Tabela 7 – Parâmetros observados em microcepas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, e acrescido ou não de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado; avaliadas aos 30 dias após o 1º e 2º corte. Santa Maria, RS, 2010.

Tratamentos	1º Corte					2º Corte				
	NB	HB	NF	NE	NM	NB	HB	NF	NE	NM
Com carvão ativado	1,91 a	2,62 a	3,74 a	2,26 a	1,18 a	1,33 a	1,19 a	3,48 a	1,71 a	0,94 a
Sem Carvão Ativado	1,50 a	1,63b	4,08 a	1,96 a	0,94 a	1,83 a	0,99 a	3,11 a	1,47 a	0,73 a
CV (%)	15,57	14,19	17,01	15,13	16,46	37,40	59,44	18,29	34,67	51,87

* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P< 0,05). NB: número de brotos, HB: altura dos brotos, NF: número de folhas, NE: número de entrenós, NM: número de microestacas.

Aos 30 dias do segundo corte (primeira rebrota), tanto as microcepas mantidas em meio de cultura base com carvão ativado, quanto as microcepas em meio livre de carvão ativado, forneceram um menor número de microestacas se comparadas às obtidas no primeiro corte. Tal fato pode indicar a necessidade de um ajuste no protocolo para a manutenção das microcepas *in vitro*, especialmente no que se refere à hidratação das mesmas, recomendando-se o aumento do número de reidratações pela adição de solução de WPM, ou ainda, a transferência periódica das microcepas para novo meio de cultura, e à adição de citocininas e gibereleninas ao meio de cultivo, para melhorar o crescimento dos brotos.

4.3.3 Enraizamento *in vitro*

Para todos os parâmetros avaliados de enraizamento *in vitro*, não houve diferença significativa entre as doses de AIB (Tabela 8). Os tratamentos utilizados não foram eficientes na indução de raízes adventícias em microestacas de louro-pardo, sendo observadas apenas altas porcentagens de sobrevivência e brotação, além da formação de calo na base das microestacas. Quando a concentração de auxina no meio é excessiva, ocorre a formação de calo na base dos explantes, comprometendo a rizogênese (GRATAPPAGLIA & MACHADO, 1998). Em estudo anterior com louro-pardo, foi observado 73% de brotos com 2 cm de comprimento enraizados,

porém adicionou-se uma dose inferior de AIB à aplicada no presente estudo ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) ao meio WPM (MANTOVANI et al., 2001). Sabe-se que as auxinas geralmente estimulam a formação de raízes, observando-se um alto grau de enraizamento em explantes juvenis, seja pela maior concentração endógena desse hormônio, ou pela grande sensibilidade desses tecidos à aplicação exógena (ARTECA, 1995). No presente estudo, ocorreram altas porcentagens de formação de calos na base dos explantes, porém, não se pode afirmar que a ausência de enraizamento dos propágulos esteja relacionada somente ao efeito fitotóxico que a auxina, em doses excessivas, pode provocar. Outros fatores podem estar envolvidos no fenômeno, como o tamanho dos explantes, o tempo de permanência dos propágulos na sala de cultivo, e o tempo em que permaneceram em meio de cultivo suplementado com a auxina. Portanto, novos estudos devem ser realizados para ajustar o protocolo de enraizamento, como por exemplo, a adição de menores doses de AIB ao meio de cultivo, no intuito de alcançar resultados conclusivos sobre a rizogênese *in vitro* de ápices caulinares e segmentos nodais de louro-pardo.

Tabela 8 – Enraizamento de microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura base WPM acrescido de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, e $1,5$ ou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB); avaliadas aos 45 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2010.

AIB (mg L^{-1})	Calo (%)	Brotação (%)	Sobrevivência (%)
1,5	57 a	63 a	88 a
2,0	35 a	74 a	90 a
CV (%)	75,51	37,07	21,33

* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

São inúmeras as dificuldades que podem ser encontradas ao longo das diferentes etapas da micropropagação. Uma das limitações dessa técnica é o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* dos explantes de determinadas espécies lenhosas (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). No primeiro caso, os brotos são colocados em um meio de enraizamento em condições assépticas e, posteriormente, a planta é transplantada para o substrato para ser aclimatizada. No segundo caso, brotos são manipulados como microestacas e o enraizamento e a aclimatização ocorrem em substrato, com ou sem a utilização de auxinas para promover a rizogênese (GRATTAPAGLIA & MACHADO,

1998; HARTMANN et al., 2002). Em enraizamento de porta-enxerto de pereira “Old home” x “Farmingdale” 9, as porcentagens de enraizamento variaram de 0 a 50% adicionando-se doses de ANA ou AIB ao meio de cultivo (MELLO-FARIAS et al., 1996). Em brotos de pereira cv. Bartlett inoculados em meio contendo AIB, não foram obtidas respostas satisfatórias de enraizamento (LEITE et al., 1994).

4.4 Conclusões

Para o lote utilizado, a imersão das sementes, sem o tegumento em 5% de NaOCl por 5 min. possibilitou o estabelecimento *in vitro* de uma alta porcentagem de plântulas assépticas de louro-pardo.

A adição de diferentes doses de BAP ao meio de cultura WPM não aumenta a multiplicação *in vitro* de ápices caulinares.

A adição de carvão ativado ao meio de cultura WPM favorece a produção de microestacas em microcepas estabelecidas *in vitro* de louro-pardo.

A adição de 1,5 ou 2,0 mg L⁻¹ de AIB ao meio de cultura não promove o enraizamento *in vitro* de microestacas apicais de louro-pardo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A propagação vegetativa de árvores adultas de louro-pardo ainda é um desafio, e até o presente momento não existem tecnologias que possibilitem a produção massal de mudas, mesmo que de origem seminal. A espécie apresenta dificuldades na clonagem pela técnica da estaquia, pois, além dos ramos serem muito lenhosos, mostram-se muito exigentes quanto à umidade e luminosidade para o enraizamento. O período ideal de coleta, que se relaciona com a idade fisiológica dos ramos, e o melhor tipo e tamanho das estacas ainda não foram definidos, podendo ser estes fatores limitantes para o sucesso da propagação vegetativa do louro-pardo. Em testes preliminares, propágulos coletados de árvores em período de intenso crescimento vegetativo (mês de abril) não enraizaram, embora diversos outros fatores possam estar envolvidos nesse processo. Estacas basais e apicais coletadas de árvores em período de repouso vegetativo (agosto) brotaram, porém não enraizaram e posteriormente morreram. A relação entre a capacidade de brotação e de enraizamento precisa ser investigada, assim como as doses de auxinas que podem estimular ou inibir o enraizamento de propágulos de louro-pardo. A utilização de propágulos juvenis, como miniestacas, bem como a realização de análise anatômica e bioquímica das estacas, são ferramentas que poderão auxiliar na elucidação do processo de enraizamento adventício de louro-pardo. Além disso, o desenvolvimento da técnica de enxertia e da mergulhia aérea (alporquia), comumente utilizada em espécies lenhosas de difícil enraizamento, podem se constituir em uma alternativa viável para a propagação vegetativa de matrizes selecionadas de louro-pardo.

A época e origem das sementes de louro-pardo podem influenciar nas respostas de assepsia e germinação *in vitro*. Foi possível estabelecer um novo protocolo de desinfestação e germinação *in vitro* de um lote de sementes, por meio do uso de 5% de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 5 min., cujo tratamento não foi requerido para outro lote de sementes (FICK et al., 2007). As plântulas produzidas forneceram ápices caulinares que serviram de explantes para a micropropagação, os quais foram tratados com BAP para a indução dos brotos. Entretanto, faz-se necessário testar diferentes doses de BAP, associadas a giberelinas e auxinas, para otimizar a formação de brotos em segmentos apicais, bem como a realização de testes com outros tipos de explantes (segmentos nodal e cotiledonar). Microcepas *in vitro*, obtidas com a manutenção do sistema radicular e a parte aérea das plântulas podadas até a primeira folha verdadeira, mantidas

em meio de cultura base WPM, acrescido ou não de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, forneceram explantes para a multiplicação *in vitro*, podendo a manutenção das microcepas ser um método interessante para aumentar as taxas de multiplicação do louro-pardo. A reidratação periódica das microcepas com solução de WPM e a adição de diferentes doses e combinações de citocininas e gibereleninas ao meio de cultivo podem incrementar a produção sustentável de propágulos, favorecendo o processo de multiplicação da espécie. No enraizamento, a adição de $1,5$ ou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB favoreceu altas porcentagens de sobrevivência e brotação nos explantes, porém foi verificada a formação de calo na base dos explantes e a ausência de raízes. Dessa forma, novos testes com outras doses menores de diferentes auxinas, com tamanhos maiores de explantes e em meio líquido, em diferentes fases de enraizamento e em maior tempo de permanência em meio de cultivo devem ser conduzidos. Além disso, experimentos para verificar a possibilidade de enraizamento *ex vitro* devem ser conduzidos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

AMARAL, V. F. M. **Multiplificação *in vitro* de *Cedrella fissilis* Vell.** 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

AMARAL, D. M. I.; ALCALAY, N.; ANTONIO, M. G. Armazenamento de sementes de quatro espécies florestais do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 1988, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: [s.n.], 1988. p. 373-397.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. Pennsylvania: Chapman & Hall, 1995. 332 p.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de Plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI: Embrapa – CNPH, 1998. vol. 1, p. 183-260.

ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1992. p. 824-837.

BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985, v. 3, 416 p.

BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. ***In vitro* culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.

BOTELHO, S. A.; ALVARENGA, A. P.; PEREIRA, I. M. Avaliação da regeneração natural na recomposição de matas ciliares em nascentes da região sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 360-372, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI: Embrapa – CNPH, 1998. v.1, p. 87-132.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. v. 1, 1039 p.

CHAVES, C. R. M. et al. Enraizamento de cinco tipos de estacas caulinares de corticeira-do-banhado. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 15. p. 135, 2003. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 9., 2003, Atibaia. **Anais...** Atibaia: [s. n.], 2003.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

CUNHA, A. C. M.; WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Influência da concentração do regulador de crescimento para enraizamento AIB na formação de mudas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax por estaquia. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 49, p. 17-29, 2004.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: _____; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 1-14.

ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 1994. 179 p.

FERMINO JUNIOR, P.C.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

FERRIANI, A. P. **Estaquia de vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia* dusén) com uso de ácido indolbutírico**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FICK, T. A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (LOURO-PARDO)**. 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

_____ et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

FLORIANO, E. P. Produção de mudas florestais por via assexuada. Santa Rosa: [s.n.], 2004. 37 p. (**Caderno Didático**, n. 3).

GOLLE, D. P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

GRAÇA, M. E. C. et al. Estaquia de erva-mate. Curitiba: Embrapa-CNPf, 1988. 6 p. (**Circular Técnica**, n. 18).

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

HARRINGTON, J. F. Seed storage longevity. In: KOZLOSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic, 1972. v. 3, p. 145-245.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2002. 847 p.

HIGA, R. C. V. Propagação vegetativa da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 10., Curitiba, 1983. **Anais...** Curitiba, EMBRAPA-CNPf, 1985. p. 121-123.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. [S.l.:s.n.], 2000. (**Circular Técnica-IPEF**, n. 192).

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

HUANG, L. C. et al. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 252 - 264.

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Ação de reguladores de crescimento em estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Floresta**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 59-67, 1981.

_____; _____. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* através da aplicação de reguladores de crescimento. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., São Paulo, 1983. **Anais...** São Paulo: [s. n.], 1983. v. 8, n. 28, p. 313-317.

KALIL FILHO, A. N.; HOFFMANN, H. A.; TAVARES, F. R. **Mini-garfagem**: um novo método para a enxertia do mogno sul-americano (*Swietenia macrophylla* King.). Colombo: Embrapa Florestas-CNPF, 2001. 4 p. (Comunicado técnico, n. 62).

KIELSE, P. **Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rígida* (Bentham) Brenan)**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

_____ et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rígida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1098-1104, 2009.

KNAPIK, J. G. et al. Propagação vegetativa do pau-sangue (*Croton celtidifolius* Baillon) como alternativa à regeneração de ecossistemas degradados. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5., 2002, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SOBRADE, 2002. p. 285-287.

LEITE, D. L. et al. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* das cvs. De pereira “Bartlett”, “Hosui” e “Okusankichi” e do clone “OHxF97”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 236-241, 1994.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1981.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

MANTOVANI, N. C. et al. Resultados preliminares da micropropagação de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo: [s. n.], 1996. p. 445.

_____ et al. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.

_____; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MARCHETTI, E. R. Época de coleta, sementeira, tratamento pré-germinativo e métodos de sementeira de espécies florestais cultivadas no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 1984, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: [s. n.], 1984. p. 524-532.

MELLO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de Pereira, "Old Home" X "Farmingdale" 9. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.2, n. 2, p. 71-78, 1996.

MELO, N. F. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.

MENDONÇA, E. A. F.; RAMOS, N. P.; PAULA, R. C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro pardo) pelo teste de tretrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2001.

MESÉN, A. C.; NEWTON, A. C.; LEAKEY, R. R. B. Vegetative propagation of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken: the effects of IBA concentration, propagation medium and cutting origin. **Forest Ecology and Management**, v. 92, p. 45-54, 1997.

MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36-37, p. 5-10, 2000.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Columbus, v. 25, p. 135-166, 1974.

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

NACHTIGAL, J. C. et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*Pisidium cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 1, p. 229-235, 1994.

NAZÁRIO, P.; WENDLING, I.; SOUSA, L. P. Enraizamento de estacas de *Luehea divaricata* sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Pesquisa Florestal brasileira**, Colombo, n. 54, p. 139-143, 2007.

NUNES, E. C. et al. *In vitro* culture of *Cedrela fssilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, p. 259-268, 2002.

PAIVA, J. R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia**: estratégias e novas abordagens. Brasília: Embrapa-SPI; Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1998. 135 p.

_____; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 40 p.

PERRANDO, E. R. **Propagação vegetativa de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild)**. 2003. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

PICHET, J. A. T. F. **Efeito de soluções alcoólicas do ácido indol-3-butírico no enraizamento de estacas de árvores adultas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

PINTO, J. E. B. P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 867-873, 1994.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIZ, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Governo do Estado do RS, 1988. 525 p.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Blücher, 1971. 294 p.

ROCHA, S. C. **Estabelecimento *in vitro* e micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

_____ et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SANTOS, A. P. et al. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, São Paulo, n. 68, p. 29-38, 2005.

SILVA, I. C. **Propagação vegetativa de *Ocotea puberula* Benth Hook e *Ocotea pretiosa* Nees pelo método de estaquia**. 1984. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1984.

SOUZA, A. V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1532-1538, 2003. Edição especial.

STUMPF, E. R. T. et al. Efeito do ácido indolbutírico, substrato e tipo de estaca no enraizamento de *Chamaecyparis lawsoniana* Parl. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 101-105, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 565 p.

TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI: Embrapa – CNPH, 1998. v. 1. p. 183-260.

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

THOMAS, P.; RAVINDRA, M. B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. **Journal of Horticultural Science**, Bangalore, v. 72, n. 5, p. 713- 722, 1997.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 311-336.

TITON, M. et al. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

TOFANELLI, M. B. D. **Enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares de pessegueiro em diferentes concentrações de ácido indolbutírico**. 1999. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus spp.* por miniestaquia**. 1999. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

_____. **Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação**. 2002. 105 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

_____; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2005, v. 3. 223 p.

_____; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Viçosa, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

_____; _____. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v. 38, n.4, p. 475-480, 2003.

_____; _____. TITON, M. Miniestaquia na silvicultura clonal de *Eucalyptus*. **Folha Florestal**, Viçosa, n. 94, p. 16-17, 1999.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16. 1996.

_____; SANTOS, G. A. Clonagem de espécies florestais nativas. In: ROCHA, M. G. B. (Org.). **Melhoramento de espécies arbóreas nativas**. Belo Horizonte: Série Técnica, 2002. p. 125-159.

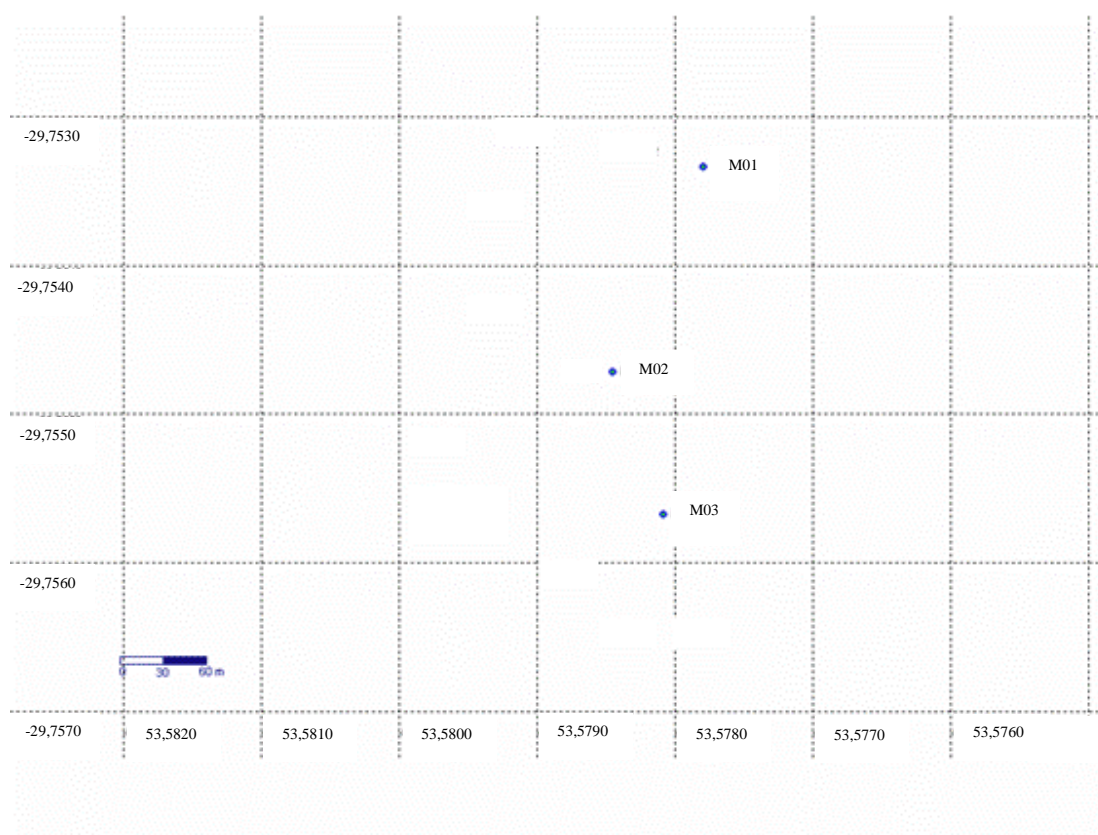
_____; _____; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrella fissilis* Vell.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2003.

ZANIOLO, S. R.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 2, n. 1-2, p. 39-44, 2001.

ZAYAT, A.G.; RANAL, M.A. Germinação de sementes de capiçova. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 11, 1997. 80 p.

7 ANEXOS

ANEXO A – Localização geográfica das três árvores matrizes de louro-pardo (M01, M02, M03), situadas em propriedade rural na localidade de Faxinal da Palma, município de Santa Maria, RS. Santa Maria, RS, 2010.



8 APÊNDICES

APÊNDICE A1 – Resumo da análise de variância da porcentagem de brotação em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2	479.9691	239.9846	6.62 NS
TRATAMENTOS	1	33.2356	33.2356	0.92 NS
RESIDUO	2	72.4936	36.2468	
TOTAL	5	585.6984		

DESVIO PADRÃO	6.0205	MÉDIA GERAL	45.0401
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	3.4760	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	13.37

APÊNDICE A2 – Resumo da análise de variância do número de brotos formados em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2	0.0320	0.0160	0.29 NS
TRATAMENTOS	1	0.4593	0.4593	8.18 NS
RESIDUO	2	0.1122	0.0561	
TOTAL	5	6035		

DESVIO PADRÃO	0.2369	MÉDIA GERAL	1.5767
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.1368	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	15.02

APÊNDICE A3 – Resumo da análise de variância do comprimento dos brotos formados em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2	0.0252	0126	0.62 NS
TRATAMENTOS	1	0.0003	0003	0.01 NS
RESIDUO	2	0.0405	0203	
TOTAL	5	0660		

DESVIO PADRÃO	0.1424	MÉDIA GERAL	0.6200
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.0822	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	22.96

APÊNDICE A4 – Resumo da análise de variância do número de folhas nos brotos formados em estacas basais e apicais de louro-pardo, independente da dose de AIB, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2	0.2940	0.1470	0.12 NS
TRATAMENTOS	1	4.6464	4.6464	3.92 NS
RESIDUO	2	2.3707	1.1853	
TOTAL	5	7.3111		
DESVIO PADRÃO		1.0887		
ERRO PADRÃO DA MÉDIA		0.6286		
MÉDIA GERAL		5.9333		
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO		18.35		

APÊNDICE A5 – Resumo da análise de variância da porcentagem de brotação em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2	462.0894	231.0447	33.73 *
TRATAMENTOS	1	26.7550	26.7550	3.91 NS
RESIDUO	2	13.7001	6.8500	
TOTAL	5	502.5445		
DESVIO PADRÃO		2.6173		
ERRO PADRÃO DA MÉDIA		1.5111		
MÉDIA GERAL		44.8955		
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO		5.83		

APÊNDICE A6 – Resumo da análise de variância do número de brotos formados em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2	0.0305	0.0153	17.62 NS
TRATAMENTOS	1	0.0160	0.0160	18.48 NS
RESIDUO	2	0.0017	0.0009	
TOTAL	5	0.0483		
DESVIO PADRÃO		0.0294	MÉDIA GERAL	1.5783
ERRO PADRÃO DA MÉDIA		0.0170	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	1.87

APÊNDICE A7 – Resumo da análise de variância do comprimento de brotos formados em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2	0.0252	0.0126	0.36 NS
TRATAMENTOS	1	0.0067	0.0067	0.19 NS
RESIDUO	2	0.0709	0.0355	
TOTAL	5	0.1028		

DESVIO PADRÃO	0.1883
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.1087
MÉDIA GERAL	0.6200
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	30.38

APÊNDICE A8 – Resumo da análise de variância do número de folhas nos brotos formados em estacas de louro-pardo tratadas com 0 ou 8000 mg L⁻¹ de AIB, independente do tipo de estaca, avaliadas aos 40 dias.

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.0	0.2925	0.1462	0.16 NS
TRATAMENTOS	1.0	0.3313	0.3313	0.35 NS
RESIDUO	2.0	1.8721	0.9361	
TOTAL	5.0	2.4960		

DESVIO PADRÃO	0.9675
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.5586
MÉDIA GERAL	5.9350
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	16.30

APÊNDICE A9 – Resumo da análise de variância da porcentagem de desinfestação de sementes de louro-pardo tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	170.1085	170.1085	0.8567 NS
FATOR B	4	17875.6555	4468.9139	22.5052 **
FATOR AXB	4	2903.5677	725.8919	3.6555 *
TRATAMENTOS	9	20949.3317	2327.7035	
RESÍDUO	40	7942.9071	198.5727	
MÉDIA GERAL DO ENSAIO	68.6915	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	20.5143	
DESVIO PADRÃO	14.0916			

APÊNDICE A10 – Resumo da análise de variância da porcentagem de contaminação por fungos em sementes de louro-pardo tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	33.9913	33.9913	2.8320 NS
FATOR B	4	766.8718	191.7180	15.9731 **
FATOR AXB	4	1809.7895	452.4474	37.6959 **
TRATAMENTOS	9	2610.6526	290.0725	
RESÍDUO	40	480.1022	12.0026	
MÉDIA GERAL DO ENSAIO	4.3			
DESVIO PADRÃO	3.4645			
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	39.8410			

APÊNDICE A11 – Resumo da análise de variância da porcentagem de contaminação por bactérias em sementes de louro-pardo, tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	895.6171	895.6171	26.2357 **
FATOR B	4	8853.5722	2213.3931	64.8378 **
FATOR AXB	4	2023.0531	505.7633	14.8155 **
TRATAMENTOS	9	11772.2424	1308.0269	
RESÍDUO	40	1365.4948	34.1374	
MÉDIA GERAL DO ENSAIO	21.6			
DESVIO PADRÃO	5.8427			
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	25.6810			

APÊNDICE A12 – Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de louro-pardo tratadas com 2,0 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), durante 0, 5, 10, 15 e 20 min., avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	5.0156	5.0156	0.0345 NS
FATOR B	4	3315.9400	828.9850	5.7097 **
FATOR AXB	4	3058.3795	764.5949	5.2662 **
TRATAMENTOS	9	6379.3351	708.8150	
RESÍDUO	40	5807.5536	145.1888	
MÉDIA GERAL DO ENSAIO	27.9613			
DESVIO PADRÃO	12.0494			
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	43.0932			

APÊNDICE A13 – Resumo da análise de variância do número de folhas em brotos de segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	2.7927	0.9309	1.70 NS
RESÍDUO	12	6.5545	0.5462	
TOTAL	15	9.3472		

DESVIO PADRÃO 0.7391
 ERRO PADRÃO DA MÉDIA 0.3695
 MÉDIA GERAL 2.9613
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO 24.96

APÊNDICE A14 – Resumo da análise de variância do número de entrenós em brotos de segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	0.2955	0.0985	0.78 NS
RESÍDUO	12	1.5164	0.1264	
TOTAL	15	1.8119		

DESVIO PADRÃO 0.3555 MÉDIA GERAL 0.7525
 ERRO PADRÃO DA MÉDIA 0.1777 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO 47.24

APÊNDICE A15 – Resumo da análise de variância da altura dos brotos formados em segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	0.0283	0.0094	0.86 NS
RESÍDUO	12	0.1319	0.0110	
TOTAL	15	0.1602		

DESVIO PADRÃO 0.1048
 ERRO PADRÃO DA MÉDIA 0.0524
 MÉDIA GERAL 0.3213
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO 32.63

APÊNDICE A16 – Resumo da análise de variância da porcentagem de calo em segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	457.1577	152.3859	0.59 NS
RESÍDUO	12	3122.8818	260.2401	
TOTAL	15	3580.0395		

DESVIO PADRÃO	16.1320
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	8.0660
MÉDIA GERAL	42.3357
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	38.10

APÊNDICE A17 – Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência de segmentos apicais, mantidos em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, e 0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), avaliados 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	3	1988.2403	662.7468	3.78 NS
RESÍDUO	12	2102.6966	175.2247	
TOTAL	15	4090.9369		

DESVIO PADRÃO	13.2372	MÉDIA GERAL	75.8785
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	6.6186	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	17.45

APÊNDICE A18 – Resumo da análise de variância do número de brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.3486	0.3486	4.94 NS
RESÍDUO	6	0.4234	0.0706	
TOTAL	7	0.7720		

DESVIO PADRÃO	0.2656	MÉDIA GERAL	1.7063
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.1328	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	15.57

APÊNDICE A19 – Resumo da análise de variância do comprimento dos brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	1.9306	1.9306	21.20 **
RESÍDUO	6	0.5464	0.0911	
TOTAL	7	2.4770		

DESVIO PADRÃO	0.3018
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.1509
MÉDIA GERAL	2.1263
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	14.19

APÊNDICE A20 – Resumo da análise de variância do número de folhas em brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.2346	0.2346	0.53 NS
RESÍDUO	6	2.6569	0.4428	
TOTAL	7	2.8915		

DESVIO PADRÃO	0.6654
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.3327
MÉDIA GERAL	3.9113
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	17.01

APÊNDICE A21 – Resumo da análise de variância do número de entrenós de brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.1860	0.1860	1.83 NS
RESÍDUO	6	0.6111	0.1019	
TOTAL	7	0.7972		

DESVIO PADRÃO	0.3192	MÉDIA GERAL	2.1100
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.1596	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	15.13

APÊNDICE A22 – Resumo da análise de variância do número de microestacas obtidas de brotos coletados no 1º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 30 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.1200	0.1200	3.95 NS
RESIDUO	6	0.1825	0.0304	
TOTAL	7	0.3026		

DESVIO PADRÃO	0.1744
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.0872
MÉDIA GERAL	1.0600
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	16.46

APÊNDICE A23 – Resumo da análise de variância do número de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.5000	0.5000	1.43 NS
RESÍDUO	6	2.0956	0.3493	
TOTAL	7	2.5956		

DESVIO PADRÃO	0.5910	MÉDIA GERAL	1.5800
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	0.2955.....	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	37.40

APÊNDICE A24 – Resumo da análise de variância do comprimento dos brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.0841	0.0841	0.20 NS
RESÍDUO	6	2.5190	0.4198	
TOTAL	7	2.6030		

DESVIO PADRÃO	0.6479
ERRO PADRAO DA MÉDIA	0.3240
MÉDIA GERAL	1.0900
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	59.44

APÊNDICE A25 – Resumo da análise de variância do número de folhas de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.2628	0.2628	0.72 NS
RESÍDUO	6	2.1798	0.3633	
TOTAL	7	2.4426		

DESVIO PADRÃO 0.6027
 ERRO PADRÃO DA MÉDIA 0.3014
 MÉDIA GERAL 3.2963
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO 18.29

APÊNDICE A26 – Resumo da análise de variância do número de entrenós de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.1152	0.1152	0.38 NS
RESÍDUO	6	1.8171	0.3029	
TOTAL	7	1.9323		

DESVIO PADRÃO 0.5503
 ERRO PADRÃO DA MÉDIA 0.2752
 MÉDIA GERAL 1.5875
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO 34.67

APÊNDICE A27 – Resumo da análise de variância do número de microestacas obtidas de brotos coletados no 2º corte das microcepas de louro-pardo, mantidas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0 ou 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, avaliadas 60 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	0.0840	0.0840	0.45 NS
RESÍDUO	6	1.1321	0.1887	
TOTAL	7	1.2161		

DESVIO PADRÃO 0.4344
 ERRO PADRÃO DA MÉDIA 0.2172
 MÉDIA GERAL 0.8375
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO 51.87

APÊNDICE A28 – Resumo da análise de variância da porcentagem de calo em microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 1,5 ou 2,0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), avaliadas aos 45 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	546.5691	546.5691	0.53 NS
RESÍDUO	6	6141.5856	1023.5976	
TOTAL	7	6688.1548		
DESVIO PADRÃO	31.9937	COEFICIENTE DE VARIACÃO	75.51	
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	15.9969			
MÉDIA GERAL	42.3705			

APÊNDICE A29 – Resumo da análise de variância da porcentagem de brotação em microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), avaliadas aos 45 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	210.2948	210.2948	0.44 NS
RESÍDUO	6	2887.3803	481.2300	
TOTAL	7	3097.6751		
DESVIO PADRÃO	21.9370	MÉDIA GERAL	59.1836	
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	10.9685	COEFICIENTE DE VARIACÃO	37.07	

APÊNDICE A30 – Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência de microestacas de louro-pardo inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 1,5 ou 2,0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), avaliadas aos 45 dias após a inoculação.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	2.0198	2.0198	0.01 NS
RESÍDUO	6	1597.2934	266.2156	
TOTAL	7	1599.3133		
DESVIO PADRÃO	16.3161	MÉDIA GERAL	76.4849	
ERRO PADRÃO DA MÉDIA	8.1581	COEFICIENTE DE VARIACÃO	21.33	