

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANA LUIZA PELEGRINI

MICROPROPAGAÇÃO DE *Ocotea porosa* (NESS EX MARTIUS) LIBERATO  
BARROSO (IMBUIA)

CURITIBA  
2008

LUCIANA LUIZA PELEGRINI

MICROPROPAGAÇÃO DE *Ocotea porosa* (NESS EX MARTIUS) LIBERATO  
BARROSO (IMBUIA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, área de concentração Estrutura e fisiologia do desenvolvimento vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana L. F. Ribas

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Soares Koehler

CURITIBA  
2008

## TERMO DE APROVAÇÃO

Dedico esta dissertação aos meus pais Pedro e Sueli e meus irmãos Maurício e Ana Claudia, razão da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e proteção.

À Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas, pela orientação e dedicação a mim dispensada e principalmente por ter me aceitado como orientada. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos transmitidos, por todas as vezes que precisei de você e me ajudou. Obrigada por tudo.

Ao Professor Doutor Flávio Zanette pela colaboração na co-orientação deste trabalho.

Ao Professor Doutor Henrique Soares Koehler pela co-orientação e ajuda na estatística.

Ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos meus pais Pedro e Sueli, pelo exemplo de família, carinho, compreensão e amor. Tenho muito orgulho de tê-los como meus pais. Aos meus irmãos Maurício e Ana Cláudia, vocês são muito especiais para mim. Amo vocês.

Ao meu primo Ricardo, pelo incentivo, amizade e carinho. Continue sempre essa pessoa maravilhosa e também à minha prima Andréia pela colaboração.

À minha amiga Fernanda Pereira Fanti, obrigada pela sua amizade, pelas trocas de idéias, pelos momentos bons que compartilhou comigo e pelas angústias. Amiga você está do lado esquerdo do peito e que a distância não apague nossa amizade. Fer, eu torço muito por você amiga.

Aos amigos e colegas de mestrado Gracielle, Fábio, Katiane, Ciane e aos demais colegas pelo convívio, amizade e companheirismo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Micropropagação de Plantas do Setor de Ciências Biológicas da UFPR: Tatiana, Pámela, Felipe, Bárbara, Waleska e Ana Paula, pela amizade, auxílio e principalmente pelo ambiente de trabalho que proporcionaram. Vocês serão lembrados com muito carinho.

Aos meus amigos Suelen e Sandro pela amizade, companheirismo e pelos momentos alegres.

"A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência."

(Goethe)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>Xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>03</b>
2.1 A ESPÉCIE <i>Ocotea porosa</i> .....	03
2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE.	04
2.3 MICROPROPAÇÃO.....	05
2.3.1 Coleta e estabelecimento de culturas assépticas.....	05
2.3.2 Multiplicação de brotações axilares.....	07
2.3.3 Alongamento das brotações.....	08
2.3.4 Indução e desenvolvimento de raízes.....	09
2.3.5 Transplântio e aclimatização de mudas de imbuia regeneradas <i>in vitro</i> ....	11
<b>2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>13</b>
<b>3 CAPÍTULO I: Germinação <i>in vitro</i> de embriões de imbuia (<i>Ocotea porosa</i>) (Ness ex Martius) Liberato Barroso.....</b>	<b>21</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.2.1 Desinfestação das sementes de imbuia.....	25
3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação <i>in vitro</i> de embriões de imbuia.....	25
3.2.3 Efeito de diferentes formulações de sais na germinação <i>in vitro</i> de embriões de imbuia.....	26
3.2.4 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na germinação <i>in vitro</i> de embriões de imbuia.....	26
3.2.5 Avaliações.....	26
3.2.6 Condições de cultivo.....	26
3.2.7 Análise estatística.....	27
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
3.3.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação <i>in vitro</i> de embriões de imbuia.....	28
3.3.2 Efeito de diferentes formulações de sais na germinação <i>in vitro</i> de embriões de imbuia.....	29
3.3.3 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na germinação <i>in vitro</i> de embriões de imbuia.....	31

<b>3.4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>4 CAPITULO II: Micropropagação de imbuia (<i>Ocotea porosa</i>) (Ness ex Martius) Liberato Barroso.....</b>	<b>40</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>40</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.2.1 Efeito do NaOCl na desinfestação de brotações juvenis de imbuia.....	44
4.2.2 Efeito da BAP e da combinação de BAP e CIN na multiplicação de brotações axilares de imbuia.....	44
4.2.3 Efeito de concentrações reduzidas de BAP ou de CIN no alongamento de brotações de imbuia.....	45
4.2.4 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado no alongamento de brotações de imbuia.....	45
4.2.5 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura WPM/2.....	46
4.2.6 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura MS/2.....	46
4.2.7 Efeito do tratamento pulso na indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura WPM/2.....	47
4.2.8 Efeito do AIB na indução de raízes e do carvão ativado no desenvolvimento de raízes de imbuia.....	47
4.2.9 Transplântio e aclimatização de mudas de imbuia regeneradas <i>in vitro</i> .....	48
4.2.10 Condições de cultivo.....	48
4.2.11 Análise estatística.....	49
<b>4.3 RESULTADOS DE DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Efeito do NaOCl na desinfestação de brotações juvenis de imbuia.....	50
4.3.2 Efeito da BAP na multiplicação de brotações axilares de imbuia .....	51
4.3.3 Efeito da combinação de BAP e CIN na multiplicação de brotações axilares de imbuia.....	56
4.3.4 Efeito de concentrações reduzidas de BAP ou de CIN no alongamento de brotações de imbuia.....	60
4.3.5 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado no alongamento de brotações de imbuia.....	61
4.3.6 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura WPM/2.....	62
4.3.7 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura MS/2.....	64
4.3.8 Efeito do tratamento pulso com AIB na indução e desenvolvimento de raízes de imbuia.....	66
4.3.9 Efeito do AIB na indução de raízes e do carvão ativado no desenvolvimento de raízes de imbuia.....	67
4.3.10 Transplântio e aclimatização de mudas de imbuia regeneradas <i>in vitro</i> .....	69
<b>4.4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>



<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE IMBUIA EM MEIO DE CULTURA MS/2, APÓS 60 DIAS..	28
TABELA 2 -	EFEITO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SAIS NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE IMBUIA, EM MEIO DE CULTURA MS/2, APÓS 60 DIAS.....	29
TABELA 3 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO NO MEIO DE CULTURA MS/2 SOBRE A GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE IMBUIA, APÓS 60 DIAS.....	32
TABELA 4 -	EFEITO DE CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE BAP OU CIN EM MEIO DE CULTURA MS NO ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES DE IMBUIA, APÓS SEIS SEMANAS DE CULTIVO.....	61
TABELA 5 -	PORCENTAGEM DE SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE IMBUIA REGENERADAS <i>IN VITRO</i> E TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS, MANTIDAS EM CASA-DE-VEGETAÇÃO CLIMATIZADA, APÓS QUATRO SEMANAS.....	70

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP.....	51
FIGURA 2 -	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTAÇÕES AXILARES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP.....	55
FIGURA 3 -	PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP.....	56
FIGURA 4 -	NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP E CIN COMBINADAS .....	57
FIGURA 5 -	COMPRIMENTO MÉDIO DAS BROTAÇÕES AXILARES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP E CIN COMBINADAS.....	59
FIGURA 6 -	PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP E CIN COMBINADAS.....	60
FIGURA 7 -	PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MS, SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO.....	62
FIGURA 8 -	INDUÇÃO DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO E COMPRIMENTO MÉDIO DAS RAÍZES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) EM MEIO DE CULTURA WPM/2, SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB), DURANTE SETE DIAS, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA SEM AUXINA.....	63
FIGURA 9 -	INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO E COMPRIMENTO MÉDIO DAS RAÍZES DE IMBUIA ( <i>Ocotea porosa</i> ) EM MEIO DE CULTURA MS/2, SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB), POR SETE DIAS, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PRA MEIO DE CULTURA SEM AUXINA.....	65
FIGURA 10 -	INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO E COMPRIMENTO MÉDIO DAS RAÍZES DE IMBUIA ( <i>Ocotea</i>	

- porosa*) COM DIFERENTES TRATAMENTOS EM SOLUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB), DURANTE 10 MINUTOS..... 67
- FIGURA 11 - INDUÇÃO DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO E COMPRIMENTO MÉDIO DAS RAÍZES DE IMBUÍIA (*Ocotea porosa*) EM MEIO DE CULTURA MS/2, SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (AIB) POR 7 DIAS, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA COM 1 gL<sup>-1</sup> de CARVÃO ATIVADO.... 69
- FIGURA 12 - *Ocotea porosa*. A) ASPECTO GERAL DA ÁRVORE; B) FRUTOS DE IMBUÍIA COLETADOS EM COLOMBO; C) SEMENTES DE IMBUÍIA; D) PLANTAS MATRIZES DE IMBUÍIA; E) BROTAÇÕES JUVENIS (EXPLANTES)..... 80
- FIGURA 13 - A-D) GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE IMBUÍIA. A) MS/2; B) WPM/2; C) MS/2 SEM CARVÃO ATIVADO; D) MS/2, ACRESCIDO DE 3 gL<sup>-1</sup> DE CARVÃO ATIVADO. E-G) BROTAÇÕES DE IMBUÍIA: E) 10 µM DE BAP (3º SUBCULTIVO); F) 5 µM DE BAP (4º SUBCULTIVO); G) 10 µM DE BAP (4º SUBCULTIVO). H-J) BROTAÇÕES DE IMBUÍIA: H) 2,5 µM DE BAP + 2,5 µM DE CIN (2º SUBCULTIVO); I) 5 µM DE BAP + 5 µM DE CIN (2º SUBCULTIVO); J) 5 µM DE BAP + 5 µM DE CIN (3º SUBCULTIVO). K-L) ALONGAMENTO: K) 1 µM BAP; L) 2 gL<sup>-1</sup>..... 81
- FIGURA 14 - A-B) ENRAIZAMENTO: A) 1,25 µM AIB; B) 2,5 µM AIB; C) MUDA COM FOLHAS NOVAS APÓS QUATRO SEMANAS; D) PLANTA NECROSADA; E-F) PLANTAS ACLIMATIZADAS APÓS 12 SEMANAS..... 82
- FIGURA 15 - ESQUEMA DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Ocotea porosa*..... 83

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIA	- Ácido indol-3-acético
AIB	- Ácido indol-3-butírico
ANA	- Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
BAP	- 6-benzilaminopurina
CIN	- Cinetina
2-iP	- N <sup>6</sup> -(2-isopentenil)adenina
ZEA	- Zeatina
MS	- Murashige e Skoog (1962)
WPM	- Lloyd e McCown (1980)
PVP	- Polivinilpirolidona

## RESUMO

*Ocotea porosa* conhecida como imbuia, é uma espécie florestal de importância econômica em risco de extinção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos e estabelecer um protocolo de micropropagação da imbuia. A germinação *in vitro* foi testada em meio de cultura MS/2, suplementado com sacarose (15; 30; 60 ou 90 gL<sup>-1</sup>), diferentes formulações de sais (MS, WPM, MS/2 e WPM/2) ou diferentes concentrações de carvão ativado (0; 1; 2 e 3 gL<sup>-1</sup>). Para micropropagação, brotações apicais de mudas de um ano de idade foram desinfestadas, estabelecidas *in vitro* e utilizadas nos experimentos de multiplicação. Nessa etapa o meio de cultura MS foi acrescido de BAP (0; 2,5; 5 ou 10 µM) ou de combinações de BAP + CIN (0+0; 1,25+1,25; 2,5+2,5 e 5+5 µM). O alongamento das brotações foi avaliado em meio de cultura MS, com concentrações reduzidas de BAP (0; 0,5; 1 ou 1,5 µM), com CIN (0,5 ou 1 µM) ou carvão ativado (0,5; 1; 2 ou 3 gL<sup>-1</sup>). A indução de raízes foi avaliada em meio de cultura WPM/2 ou MS/2, acrescido de AIB (0; 1,25; 2,5; 5 ou 10 µM) durante 7 dias ou com tratamento pulso por 10 minutos em soluções de AIB (0; 2,5; 5 ou 10 mM), seguido de transferência para meio sem regulador vegetal. As mudas foram plantadas em diferentes substratos: Plantmax<sup>®</sup>; Plantmax<sup>®</sup>+carvão vegetal; Plantmax<sup>®</sup>+casca de arroz carbonizada; Plantmax<sup>®</sup>+casca de arroz carbonizada+terra peneirada e mantidas em casa-de-vegetação. A germinação *in vitro* da imbuia mostrou ser viável porque acelerou a obtenção de mudas. Os meios de cultura MS/2, suplementados com 60 e 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose, proporcionaram as maiores porcentagens de germinação, com 56,3 e 59,4% respectivamente. Das formulações de meio de cultura testadas, a do MS/2 apresentou a maior porcentagem de germinação (74,2%). A adição de carvão ativado no meio de cultura MS/2 foi eficaz na germinação de imbuia. Foi estabelecido um protocolo de micropropagação de imbuia a partir de brotações juvenis. A multiplicação foi mais eficiente em meio de cultura MS, suplementado com 5 µM de BAP (5,3 brotações por explante, após quatro subcultivos). As combinações de 2,5 µM de BAP + 2,5 µM de CIN proporcionaram 3,6 brotações por explante, após quatro subcultivos. Para o alongamento, a adição de 1 µM de BAP proporcionou brotações mais longas (79,3%). A indução das raízes em meio de cultura WPM/2, com 2,5 µM de AIB proporcionou 57,5% de enraizamento e no meio de cultura MS/2 com 10 µM de AIB, obteve-se 68,7% de enraizamento. O tratamento pulso por 10 minutos em solução de 5 e 10 mM de AIB, proporcionou 61,1 e 62,5% de brotações enraizadas respectivamente. O meio de cultura suplementado com carvão ativado para o desenvolvimento de raízes não favoreceu o enraizamento. A maior porcentagem de plantas sobreviventes foi obtida com o substrato Plantmax<sup>®</sup> + casca de arroz carbonizada (56,7%) após quatro semanas. A micropropagação da imbuia foi viável, porém necessita de mais estudos para aumentar a porcentagem de sobrevivência das plantas durante a aclimatização.

Palavras-chave: espécie florestal, Lauraceae, regulador vegetal, brotações apicais.

## ABSTRACT

*Ocotea porosa* is known as “imbuia”. It is a forest species of economical importance and in risk of extinction. The purpose of this work was to evaluate the germination *in vitro* of zygotic embryos and to establish a micropropagation protocol for this species. The germination *in vitro* was close on MS/2 culture medium supplemented with sucrose (15; 30; 60 or 90 gL<sup>-1</sup>), different salts formulations (MS; WPM; MS/2 or WPM/2) or different concentrations of activated charcoal (0; 1; 2 or 3 gL<sup>-1</sup>). For micropropagation, one-year-old apical shoots were disinfected, established *in vitro* and used in experiments of multiplication. In this stage, the MS culture medium was supplemented with BAP (0; 2,5; 5 or 10 µM) or combinations of BAP+KIN (0+0; 1,25+1,25; 2,5+2,5 and 5+5 µM). The shoots elongation was evaluated in culture medium MS, with low concentrations of BAP (0; 0,5; 1 or 1,5 µM), of KIN (0,5 or 1 µM) or activated charcoal (0,5; 1; 2 or 3 gL<sup>-1</sup>). For the induction of roots, WPM/2 or MS/2 culture medium was supplemented with IBA (1; 1,25; 2,5; 5 or 10 µM) were tested during 7 days. Pulse treatments for 10 min in solutions of IBA (0; 2,5; 5 or 10 mM), followed by transfer to a culture medium without growth regulator were also applied. The shoots were planted in greenhouse with substrates Plantmax®; Plantmax®+charcoal (3:1); Plantmax®+rind rice carbonized; Plantmax®+rind rice carbonized+land, kept in greenhouse. The *in vitro* germination of imbuia was viable and accelerated the development of plantlets. The MS/2 culture medium, supplemented with 60 or 90 gL<sup>-1</sup> sucrose, provided a higher percentage of germination 56.3 and 59.4% respectively. The MS/2 medium provided the largest percentage of germination (74.2%). The addition of activated charcoal to the MS/2 culture medium was efficient for embryos germination. A micropropagation protocol of imbuia from young sprouts was established. The multiplication rate was higher in MS culture medium, supplemented with 5 µM of BAP (5.3 shoots) after four subcultures. The combinations of 2.5 µM BAP + 2.5 µM KIN provided 3.6 shoots, after four subcultures. For shoot elongation 1 µM of BAP gave larger shoots (79.3%). In WPM/2 culture medium with 2.5 µM of IBA 57.5% of shoots were rooted and with MS/2 culture medium and 10 µM IBA rooting rate was 68.7%. Pulse treatment for 10 min in solutions of 5 or 10 mM IBA provided 61.1 and 62.5% rooted shoots. The culture medium supplemented with activated charcoal didn't favor the rooting. The largest percentage of surviving plants occurred with substrate Plantmax® + rind rice carbonized (56.7%) after four weeks. The micropropagation of imbuia was viable, however it needs more studies to increase the percentage of survival during acclimatization.

Key words: forest species, Lauraceae, growth regulator, apical shoots.

## 1 INTRODUÇÃO

As florestas brasileiras têm sofrido uma intensa exploração, comprometendo muitas espécies (CARVALHO, 1978). No Paraná, os estudos realizados pelo PROBIO Araucária (FUPEF, 2001) indicaram a ocorrência de apenas 0,8% de Floresta Ombrófila Mista em estágio avançado, sendo que a distribuição desses remanescentes apresenta-se dispersa em fragmentos pequenos e médios, com até 5.000 ha. Segundo dados do MMA (2002), os remanescentes de Floresta Ombrófila Mista, não perfazem mais de 0,7% da área original, o que a coloca entre as tipologias mais ameaçadas do bioma Mata Atlântica. Dentre as atividades de maior relevância que contribuíram para a redução da área dessa formação florestal têm-se a intensiva exploração madeireira do pinheiro (*Araucaria angustifolia*) e imbuia (*Ocotea porosa*) e os desmatamentos para a expansão da agricultura (CALDATO et al., 1999; NETO et al., 2002). REITZ et al. (1978) afirmaram também que a imbuia foi uma das árvores mais abundantes do Sul do Brasil, mas, devido a sua valiosa madeira, constitui a segunda espécie nativa em volume de madeira explorada, em função da grande quantidade existente e dos grandes diâmetros de seus troncos.

A imbuia apresentou papel fundamental no desenvolvimento econômico e cultural nas regiões de abrangência da Floresta Ombrófila Mista por sua madeira apresentar ampla utilização (CALDATO et al., 1999). A qualidade estética da madeira é mundialmente apreciada, sendo exportada em grande quantidade para a fabricação de mobiliários de luxo (CARVALHO, 2003). É também usada na construção civil, em vigas, forros, tábuas e tacos para assoalhos, em portas, janelas e molduras, além da carpintaria e marcenaria. É empregada como planta ornamental e na arborização urbana, além de reflorestamento para a recuperação ambiental (REITZ et al., 1978; CARVALHO, 2003). De acordo com CARVALHO (2003) a espécie é também utilizada em perfumaria, pois através da destilação extrai-se um fixador, considerado de qualidade superior ao do extrato de sândalo.

Esta espécie vem sofrendo grave erosão genética, principalmente devido ao desmatamento (CARVALHO, 2003), além da exploração para fins econômicos. A imbuia encontra-se na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (IBAMA, 1992) e na Lista Vermelha do Paraná está



na categoria rara (SEMA, 1995) sendo assim, requer atenção especial quanto à conservação genética (CARVALHO, 2003).

A imbuia é uma espécie lenhosa florestal que apresenta semente com dormência tegumentar e comportamento recalcitrante o que dificulta sua propagação natural. Além disso, a propagação de imbuia por meio da estaquia apresenta baixa capacidade de enraizamento. Dessa forma, a importância de utilizar a micropropagação para produção de mudas dessa espécie deve-se ao fato de que esta técnica permite a propagação de massal de espécies elites ou economicamente importantes sendo uma alternativa para a produção de mudas de imbuia.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos e estabelecer um protocolo de micropropagação da imbuia.

Desta forma, para alcançar o objetivo do trabalho, foram definidos alguns objetivos específicos:

- a) testar diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e diferentes formulações de sais na germinação *in vitro* de embriões de imbuia;
- b) testar diferentes concentrações e combinações de reguladores vegetais para indução de brotações múltiplas;
- c) testar concentrações reduzidas de citocininas e diferentes concentrações de carvão ativado para induzir o alongamento das brotações;
- d) testar concentrações de auxina para indução do enraizamento *in vitro*;
- e) determinar uma metodologia de transplântio e aclimatização de mudas em casa-de-vegetação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1A ESPÉCIE *Ocotea porosa*

*Ocotea porosa* pertence à família Lauraceae. Esta espécie é também conhecida como imbuia, embuia, canela-imbuia, canela-preta, canela-broto. É característica da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), de ocorrência natural nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (CARVALHO, 2003). Também ocorre no Paraguai (WANDERLEY et al., 2003). Essa espécie pode formar populações densas, chamadas de “imbuiais” (CARVALHO, 2003).

As árvores perenifólias apresentam altura variando de 10 a 20 metros, com caule entre 50 e 150 cm de DAP (diâmetro altura do peito). Quando chega a fase adulta, pode atingir até 30 m de altura e 320 cm ou mais de DAP (Figura 12A) (CARVALHO, 2003). O tronco é tortuoso, irregular, com fuste comumente curto, com copa pouco densa e ampla, de folhas simples, oblongo lanceoladas com disposição alterna. Fornece madeira moderadamente pesada, resistente a fungos (WANDERLEY et al., 2003), com boa durabilidade natural e maleabilidade (CARVALHO, 2003). Possui cerne pouco diferenciado do alburno. Superfície irregular lustrosa e lisa, geralmente apresentando estrias paralelas e veios que variam nas cores preto, castanho ou avermelhado, ora aparecem paralelos ora ondulados, às vezes formando figuras atraentes (CARVALHO, 2003).

Sua inflorescência é formada por pequenas flores hermafroditas de coloração branca amareladas, com cálice revestido de pêlos dourados, dispostas em racemos simples axilares (CARVALHO, 2003). Segundo CARVALHO (2003), a floração ocorre no período de outubro a dezembro e a frutificação de fevereiro a abril. No entanto, LORENZI (1992) indicou que o florescimento e a frutificação ocorrem nos períodos de outubro a novembro e de janeiro a março, respectivamente. O fruto é drupáceo, de superfície lisa lustrosa, de cor roxa-escura (HERTEL, 1974) unilocular, sendo a semente uma castanha com superfície lisa, com várias estrias (CARVALHO, 2003).

As sementes da imbuia apresentam forte dormência tegumentar e têm comportamento recalcitrante apresentando elevado teor de água no ponto de maturação fisiológica, dificultando assim o seu armazenamento (BILIA et al., 1998;

CARVALHO, 2003). A sua germinação é irregular iniciando entre 15 e 105 dias após a sementeira, podendo prolongar-se por até 18 meses. As sementes apresentam 65% de germinação quando recém coletadas e após 12 meses de armazenamento em sacos de papel kraft, em laboratório ou em câmara fria, apresentaram germinação de 7,2% e 1% (CARVALHO, 2003).

## 2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE

Muitas espécies lenhosas como a imbuia e a canela-sassafrás, apresentam dificuldades de propagação natural. Desta forma, a propagação vegetativa por meio da estaquia poderia ser uma alternativa promissora, além do baixo custo da técnica em comparação com a micropropagação. Porém, a capacidade de propagação vegetativa por estaquia de algumas espécies, principalmente lenhosas, varia muito. INOUE e PUTTON (2007) obtiveram baixa porcentagem de enraizamento de estacas de imbuia com apenas 4% das estacas enraizadas aplicando 3.000 mg Kg<sup>-1</sup> de AIB em talco na base das estacas. Com outras espécies de Lauraceae, como a canela-guaíca e canela-sassafrás, SILVA (1984) testou o enraizamento utilizando estacas oriundas de plantas matrizes adultas; porém, não obteve sucesso no enraizamento dessas espécies. Outro trabalho testando o enraizamento de estacas de canela-sassafrás foi realizado por RODRIGUES (1990) e também não foram obtidas estacas enraizadas, porém, as mesmas formaram brotações superando a dormência das gemas. Com outra espécie de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), também não foi possível o enraizamento de estacas dessa espécie (DIAS, 2006).

A micropropagação de imbuia via proliferação de gemas axilares foi relatada por VICENTINI (1995). A taxa média de multiplicação obtida foi de 2,4 brotações por explante em meio de cultura MS acrescido de 3,23 µM de BAP e 64% de enraizamento em MS/2, suplementado com 2,46 µM de AIB, após 40 dias de cultivo. Para outra espécie da família Lauraceae, a canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*), os resultados obtidos por VICENTINI (1995) não foram suficientes para a propagação massal de mudas, havendo necessidade de mais estudos para obtenção de maiores taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência desta espécie.

MOURA-COSTA et al. (1993) testaram a embriogênese somática de *Ocotea catharinensis* como alternativa de produção de mudas, no entanto, foi obtida uma

baixa porcentagem de formação de raízes (10%) e a parte aérea apresentou cerca de um centímetro de comprimento.

## 2.3 MICROPROPAGAÇÃO

A técnica de micropropagação permite a propagação clonal em grande escala de plantas comercialmente importantes (GOVIL e GUPTA, 1997). Além de possibilitar a propagação massal de genótipos selecionados, a micropropagação serve de estratégia para o melhoramento de árvores e captura de ganhos genéticos (GUPTA et al., 1991).

As maiores vantagens do cultivo *in vitro* são a multiplicação rápida e a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente (GOVIL e GUPTA, 1997). Nos últimos anos esta técnica tornou-se de grande interesse, uma vez que diversas espécies encontram-se em risco de extinção (COSTA, 1995), como é o caso da imbuia. Desta forma, a micropropagação se destaca como uma importante ferramenta de estudos dessa espécie.

MURASHIGE (1974) determinou três etapas para a micropropagação: 1 - estabelecimento de culturas assépticas; 2 - multiplicação dos propágulos e 3 - preparo para estabelecimento das plantas no solo. Alguns anos mais tarde, DEBERGH e MAENE (1981) propuseram cinco etapas: 0 - preparo de plantas matrizes; 1 - estabelecimento de culturas assépticas; 2 - multiplicação; 3 - indução, alongamento e desenvolvimento de raízes e 4 - aclimatização em condições de casa-de-vegetação.

### 2.3.1 Coleta e estabelecimento de culturas assépticas

A micropropagação inicia-se com a escolha das plantas matrizes, as quais devem ser vigorosas (CASSELS, 2005) e não devem apresentar sintomas de doenças (GEORGE, 1993). A retirada dos explantes deve ser feita preferencialmente a partir de brotações novas formadas durante a fase ativa de crescimento da planta (BONGA, 1987). Explantes oriundos de tecidos juvenis como brotações apicais, embriões zigóticos ou partes de plântulas são considerados os melhores explantes para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas (AHUJA, 1993). Explantes oriundos de tecidos meristemáticos apresentam grupos de células

indiferenciadas totipotentes localizadas nos ápices de caules, raízes e nas axilas das folhas que possuem capacidade de se regenerar e se diferenciar em órgãos e tecidos (KYTE e KLEYN, 1996). Esses tecidos meristemáticos possuem maior estabilidade na regeneração de plantas, não havendo necessidade de formação de calo (LAMEIRA et al., 2000).

As plantas que crescem em ambiente externo são contaminadas com microorganismos que se encontram principalmente nas superfícies externas das plantas. No cultivo *in vitro*, as bactérias e os fungos competem com o crescimento dos explantes pelos nutrientes do meio de cultura (GEORGE, 1993). As contaminações podem causar grandes prejuízos, deixando o explante inviável para o subcultivo ou levando à morte do material *in vitro*. Esses problemas são maiores quando a contaminação só é detectada durante os subcultivos, causando diminuição da produtividade (CASSELS, 1991).

A contaminação superficial das plantas matrizes crescendo em casa-de-vegetação, sob condições controladas, é geralmente menor do que em plantas crescendo no campo; dessa forma, a contaminação *in vitro* pode ser minimizada com as plantas matrizes mantidas em locais apropriados como em casa-de-vegetação (GEORGE, 1993).

Antes de iniciar uma cultura *in vitro* é realizada a desinfestação do material vegetal utilizando desinfestantes químicos para remover os microorganismos dos tecidos sem danificá-los. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é bastante utilizado para desinfestações e a concentração pode variar de 0,25 a 2% v/v, dependendo do material vegetal e do período pelo qual o tecido é exposto, sendo que diferentes partes de uma planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade das soluções desinfestantes (GEORGE, 1993). Geralmente um surfactante como Tween® ou um detergente é adicionado à solução de desinfestação para facilitar a ação, aumentando o contato da solução com os tecidos (TORRES et al., 1998).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) foi utilizado na desinfestação de brotações de algumas espécies da família Lauraceae. Com *Ocotea porosa*, VICENTINI (1995) obteve 73,3% de brotações isentas de contaminação utilizando 0,5 % de NaOCl por 10 minutos e para desinfestação de *O. odorífera*, o tratamento de desinfestação foi mais eficaz com 0,75% de solução de NaOCl por 10 minutos. KOWALSKI e VAN-STADEN (2001) também obtiveram baixos níveis de contaminação de explantes de

*O. bullata*, utilizando etanol 80%, seguido de imersão dos explantes em solução de 1% de NaOCl por 10 minutos.

### 2.3.2 Multiplicação de brotações axilares

A proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada na propagação massal de plantas em larga escala (BONGA, 1985). Com o objetivo de produzir o maior número de brotações adequadas para o enraizamento e aclimatização, o aprimoramento da micropropagação é de fundamental importância para a produção de mudas (ZANOL et al., 1998). No entanto, é necessário que essa técnica seja adaptada de acordo com as necessidades de cada espécie e cultivar, pois estas diferem geneticamente entre si (PEREIRA et al., 2001) e dessa maneira, respondem de forma diferente na micropropagação (SCHUCH e PETERS, 1993).

A micropropagação, além de proporcionar uma elevada taxa de multiplicação, permite a produção de mudas durante todos os meses do ano (PEREIRA et al., 2001). A regeneração de plantas a partir de gemas pré-existentes, geralmente é fiel na reprodução do genótipo da planta matriz (HARTMANN et al., 2002). MILLÁN-MENDOZA (1998) destacou que as plantas lenhosas apresentam uma maior dificuldade da multiplicação *in vitro* e que o desenvolvimento de métodos eficientes para estas plantas a partir da cultura de tecidos traria muitos benefícios.

Os meios de cultura utilizados possuem em suas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, geralmente a sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Essas substâncias são essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Existem formulações de meios de cultura com altas concentrações de sais, principalmente os íons nitrato e amônio, como a do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (GEORGE, 1996). O meio MS é ainda a formulação mais usada para Angiospermas (HARRY e THORPE, 1994). O meio de cultura WPM “woody plant medium” (LLOYD e McCOWN, 1980) apresenta menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio) quando comparado ao meio MS (SAADAT e HENNERTY, 2002). Desta forma, o meio WPM é utilizado para espécies lenhosas quando o meio MS não for eficiente (HARRY e THORPE, 1994).

A composição e concentração dos reguladores vegetais no meio de cultivo são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas da cultura de tecidos (CALDAS et al., 1998; CASTRO et al., 2002). As citocininas fazem parte de uma classe de reguladores vegetais que estão diretamente relacionadas com a divisão celular e são utilizadas principalmente para a proliferação de gemas axilares, pela capacidade de modificação da dominância apical (GEORGE, 1993; BHOJWANI e RAZDAN, 1996).

Dentre as citocininas, a cinetina (CIN) e a 6-benzilaminopurina (BAP) são as mais utilizadas, sendo que a BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies, em concentrações que podem variar entre 0,4 a 22,19  $\mu\text{M}$  (GEORGE, 1993). Outras citocininas como o N<sup>6</sup>-(2-isopentenil)adenina (2-iP) e a zeatina (ZEA) são utilizadas com menor frequência devido ao custo elevado (THORPE e PATEL, 1984). Em geral, concentrações mais elevadas de citocininas induzem um maior número de brotos, porém, estes podem apresentar tamanho pequeno, incapacidade de alongamento, dificultando a individualização das brotações para serem enraizadas (HARTMANN et al., 2002).

A multiplicação de imbuia foi obtida com a adição de 3,23  $\mu\text{M}$  de BAP no meio de cultura, obtendo-se cerca de 2,4 brotações por explante (VICENTINI, 1995). Para outra espécie florestal, peroba-rosa, a regeneração de brotações axilares (4 a 5) ocorreu em meio de cultura suplementado com ZEA ou BAP (4,4 - 8,8  $\mu\text{M}$ ) (RIBAS et al., 2005). A adição de BAP no meio de cultura também foi eficaz na multiplicação de aroeira (ANDRADE et al., 2000) e erva-mate (PAULA, 1992; ZANIOLO e ZANETTE, 2004).

### 2.3.3 Alongamento das brotações

Algumas espécies apresentam alongamento natural de suas brotações durante a fase de multiplicação, podendo ser enraizadas diretamente, sem passar por essa fase adicional. O alongamento é utilizado quando as partes aéreas produzidas são muito pequenas, em geral, isso ocorre quando as brotações são cultivadas em meio de cultura com concentrações relativamente altas de citocininas durante a regeneração ou proliferação das brotações (GEORGE, 1996).

O uso em excesso de BAP pode ser tóxico e caracteriza-se principalmente, por apresentar falta de alongamento das brotações, redução do tamanho das folhas,

encurtamento dos entrenós, engrossamento do caule e hiperhidricidade, dificultando o enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Concentrações reduzidas de BAP (1,62  $\mu\text{M}$ ) induziram o alongamento de brotações de imbuia (VICENTINI, 1995). O carvão ativado também pode ser utilizado no meio de cultura, pois tem sido um coadjuvante útil no alongamento das brotações e seu efeito está atribuído à capacidade de reter concentrações excessivas de reguladores e certas substâncias indesejáveis ou inibidoras na cultura *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PAN e VAN-STADEN, 1998).

#### 2.3.4 Indução e desenvolvimento de raízes

Na indução de raízes *in vitro*, geralmente, os meios de cultura são acrescidos de diferentes tipos e concentrações de auxinas, sendo que esses reguladores são os que mais influenciam o sucesso dessa etapa (DE KLERK et al., 1995; ROCHA, 2006). A rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento das raízes. As duas primeiras fases dependem da adição de auxina no meio de cultura, enquanto a auxina geralmente inibe o alongamento das raízes (GEORGE, 1996).

As auxinas mais utilizadas em meios de cultivo para formação de raízes são o ácido indol-3-butírico (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA) (BERTAZZA et al., 1995; GEORGE, 1996). O AIB tem sido bastante utilizado por não causar fitotoxicidade aos explantes e ser eficiente no enraizamento de muitas espécies (HARTMANN et al., 2002). As concentrações mais freqüentes estão entre 0,5 a 5,0  $\mu\text{M}$  (GEORGE, 1996).

As auxinas promovem o enraizamento, mas nem sempre a porcentagem de enraizamento e o número de raízes formadas podem ser maximizados com o aumento da concentração de auxina. A utilização de elevadas concentrações no meio de cultura pode induzir a formação de calo na base dos explantes (ROGALSKI et al., 2003) que é indesejável, pois a qualidade do sistema radicial pode ser afetada principalmente no que se refere à conexão vascular com o explante, de modo a comprometer o sucesso da aclimatização das brotações (FACHINELLO et al., 1995).

Por esta razão às vezes, recomenda-se a utilização de dois meios de cultura para o enraizamento. Primeiramente as partes aéreas permanecem em meio com auxina, favorecendo a indução e posteriormente são passadas para um meio sem



auxina, estimulando assim a rizogênese e o crescimento das raízes. Esse processo tem sido adotado com freqüência em espécies lenhosas, coníferas e frutíferas (FETT-NETO et al., 1992).

Para muitas espécies, a formulação do meio de cultura MS tem sido eficaz no enraizamento (PASQUAL e LOPES, 1991). Diluições a  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$  e  $\frac{1}{4}$  da composição original dos sais do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) são frequentemente utilizadas. A concentração de sacarose no enraizamento, geralmente, é mantida nos mesmos níveis do meio de multiplicação (20 e 30 gL<sup>-1</sup>); porém, pode ser reduzida para até 10 gL<sup>-1</sup> (THORPE et al., 1991; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O meio de cultura WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) também é utilizado para indução de raízes e por apresentar concentrações reduzidas de sais tem sido eficaz no enraizamento de várias espécies lenhosas (CHALUPA, 1987).

O carvão ativado também pode ser utilizado no meio de cultura de enraizamento. Porém, quando o carvão é adicionado no meio de cultura é necessário um aumento na concentração de auxina. O carvão ativado adsorve substâncias liberadas pelo próprio explante ou impurezas de outros componentes e também compostos do meio de cultura. Além disso, o carvão reduz a quantidade de luz que chega à base das brotações (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PAN e VAN-STADEN, 1998; CHAGAS et al., 2005).

Outro fator que pode interferir é a luminosidade, que nem sempre é benéfica para a indução e desenvolvimento de raízes. Em alguns tecidos, os períodos de escuro promovem o enraizamento, enquanto que em outros, a luz aumenta a formação de raízes. A exposição das brotações a um período escuro pode melhorar a formação de raízes na fase inicial (ECONOMOU e READ, 1987).

A adição de 2,46 µM de AIB em meio de cultura MS/2, por 40 dias promoveu a formação de raízes adventícias em 64% das brotações de imbuia, com 2,3 raízes por brotação (VICENTINI, 1995).

Para outra espécie lenhosa, a peroba-rosa, constatou-se que o tratamento de imersão das bases das brotações em solução de AIB de 10 mM durante 15 minutos, foi satisfatório para indução e desenvolvimento de raízes (70%) (RIBAS et al., 2005).

### 2.3.5 Transplântio e aclimatização de mudas regeneradas *in vitro*

A aclimatização é o processo de transição das plantas cultivadas *in vitro* para ambientes em condições naturais. Esse processo deve ocorrer progressivamente, de forma que as plantas não sofram estresse ocasionando danos ou até mesmo   morte (SILVA et al., 1995; COSTA, 1998). Para maior sucesso da aclimatização recomenda-se que seja feita uma pr -aclimatização das plantas regeneradas. Por exemplo, plantas de amoreira foram pré-aclimatizadas por um período de 48 horas, dentro de tubos destampados, ainda com meio de cultura, em sala arejada e sombreada com temperatura ambiente de 20 a 22 C (SILVA et al., 1995).

As plantas micropropagadas crescem em condições de alta umidade relativa do ar, baixa luminosidade e trocas gasosas restritas, resultando em baixas taxas de transpiração e fotossíntese (SHACKEL et al., 1990; PREECE e SUTTER, 1991; POSP SILOV  et al., 1999; SCIUTTI e MORINI, 1993). Durante a aclimatização, as plantas sofrem mudanças morfológicas, anat micas e fisiológicas, que as tornam capazes de crescer em um novo ambiente (SUTTER et al., 1992). Essas alterações anat micas nas plantas cultivadas *in vitro* podem inviabilizar a aclimatização das mesmas (ALBARELLO et al., 2001).

BRAINERD e FUCHIGAMI (1981) relataram a necessidade da aclimatização das plantas provenientes da cultura *in vitro* porque elas são sensíveis e tenras, a cutícula é pouco desenvolvida, resultando em alta transpiração e a parede celular não apresenta rigidez suficiente para a sustentação.

Os estômatos podem apresentar-se levemente projetados e abertos, com diferentes tamanhos e formatos, distribuídos de forma desuniforme (DONNELLY e VIDAVER, 1984; JOHANSSON et al., 1992). Assim sendo, como os estômatos são pouco funcionais, as plantas respondem muito lentamente ao estresse hídrico (PREECE e SUTTER, 1991). Como a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes ainda   precária para permitir o fluxo transpirat rio adequado e o número de elementos condutores é reduzido, estes também podem ser considerados fatores de risco na aclimatização (PREECE e SUTTER, 1991; JOHANSSON et al., 1992).

Outros fatores como o tipo e a qualidade do sistema radicial também são importantes para se obter sucesso na sobrevivência (PEREIRA e FORTES, 2001). Raízes curtas, em geral, são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu

manuseio no momento do transplântio, normalmente estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento da planta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Além disso, o efeito do tempo de permanência das brotações no meio de enraizamento é importante, sugerindo-se que o aumento do tempo no meio de cultura pode proporcionar um envelhecimento das mesmas, tornando-as menos funcionais e prejudicando a sobrevivência das plantas em casa-de-vegetação (PEREIRA e FORTES, 2001). Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) após os primeiros sinais de emergência das raízes *in vitro*, as plantas devem ser imediatamente transplantadas.

## 2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, M. R. Micropropagation á la carte. In: AHUJA, M. R. **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer, p. 1-8, 1993.

ALBARELLO, N.; FIGEUIREDO, S. F. L.; VIANA, W. R. C.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinea mucosa* Jacq. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 34-36, 2001.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p.174-180, 2000.

BERTAZZA, G.; BARALDI, R.; PREDIERI, S. Light effects on *in vitro* rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, p. 139-143, 1995.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant Tissue Culture: theory and practice**, a revised edition. Usevier, 1996, 767 p.

BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; MALUF, A. M. Germinação de diásporos de canela (*Ocotea corymbosa* (Meissn.) Mez – Lauraceae) em função da temperatura, do substrato e da dormência. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 189-194, 1998.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **J. Amer. Soc. Hortic. Sci**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.

BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985, p. 4-35.

BONGA, J. M. & DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, v. 1, v. 2, v. 3, 1987.

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

CALDATO, S. L.; LONGHI, S. J.; FLOSS, P. A. Estrutura populacional de *Ocotea porosa* (Lauraceae) em uma floresta ombrófila mista, em Caçador (SC). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 89-101, 1999.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo, PR.: EMBRAPA FLORESTAS, v. 1, 2003, 1039 p.

CARVALHO, P. E. R. **Algumas características ecológicas e silviculturais de quatro espécies florestais do Estado do Paraná**. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1978.

CASSELS, A. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 31-44.

CASSELS, A. C. Principles of micropropagation. IN: MURCH, S. J.; SAXENA, P. C. **Journey of a single cell to a plant**. USA: Science Publishers, p. 287-308, 2005.

CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002, 255 p.

CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; DUTRA, L. F.; CAZETTA, J. O. Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n.6, p. 1125-1131, 2005.

CHALUPA, V. European hardwoods. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, p. 224-246.

COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A. E. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, 1998, p. 63-67.

COSTA, M. P. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação**. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1995.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.

DE KLERK, G. J.; KEPPEL, M.; BRUGGE, J. T.; MEEKES, H. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcutting. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 289, p. 965-972, 1995.

DIAS, L. A. **Uso do ácido indolbutírico para induzir a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de canela (*C. zeylanicum*)**. 49 p. Monografia (Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, p. 172-176, 1984.

ECONOMOU, A.; READ, P. E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 751-754, 1987.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPEL, 1995. 178 p.

FETT-NETO, A. G.; TEIXEIRA, S. L.; SILVA, E. A. M. SANTANNA, R. Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p. 720-728, 1992.

FUPEF – Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná. 2001. Conservação do Bioma Floresta com Araucária: relatório final. Diagnóstico dos remanescentes florestais/PROBIO Araucária. 2 v. FUPEF, Curitiba, Brasil, 236 pp.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.2, 1996.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The Technology, Great Britain: Exegetics Limited, 574 p, 1993.

GOVIL, S.; GUPTA, S. C. Comercialization of plant tissue culture in India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 65-73, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A . Micropropagação. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, p. 183-260, 1998.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; PULLMAN, G.; YANCEY, M.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.; CARPENTER, C. Development of an embryogenic system for automated propagation of forest trees. In: VASIL, I. K. **Scale-up and automation in plant propagation**. Academic Press, Califórnia, 1991, p. 75-93.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 539-560, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HERTEL, R. J. G. Estudos sobre *Phoebe porosa* (Nees) Mez II. A inflorescência, a flor e o fruto da imbuia. **Acta Biológica Paranaense**, v. 3, p. 25-53, 1974.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Portaria Nº 37-N, de 3 de abril de 1992. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**.

INOUE, M. T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**, Curitiba, v.37, n.1, p. 55-61, 2007.

JOHANSSON, M.; KRONESTEDT-ROBARDS, E. C.; ROBARDS, A. W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v. 6, p. 165-176, 1992.

KOWALSKI, B.; VAN-STADEN, J. *In vitro* culture of two threatened South African medicinal trees – *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 223-228, 2001.

KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes, an introduction to micropropagation**. 3ª ed. Portland: Timber Press, 1996. 240 p.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Intern. Pl. Propag. Soc. Proceed.**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas no Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

MILLÁN-MENDOZA, B. Regeneration of *Rubus in vitro* using forchlorfenuron (CPPU). **Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia**, v. 15, n. 3, p. 242-248, 1998.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2002. **Proposta do grupo de trabalho preservação e recuperação da Floresta Ombrófila Mista no Estado de Santa Catarina**. Portaria Ministerial 49 de 06 de fevereiro de 2002, Brasília, Brasil, p. 77.

MOURA-COSTA, P. H.; VIANA, A. M.; MANTELL, S. H. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35 p. 279-286, 1993.

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

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

NETO, R. M. R.; WATZLAWICK, L. F.; CALDEIRA, M. V. W.; SCHOENENGER, E. R. Análise florística e estrutural de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, situado em Crúva, RS – Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 29-37, 2002.

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

PASQUAL, M.; LOPES, P. A. Influência de diversos fatores sobre o enraizamento de porta-enxerto de pereira (*Pyrus calleryana*) *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 331-334, 1991.



PAULA, S. R. de. **Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e comparação das folhas de plantas *in vitro* com as originadas em casa de vegetação.** 74 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 417-420, 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 89-95, 2001.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERNAN, R.H. **Micropropagation: technology and application.** Dordrecht: Kluwer, 1991, p.71-93.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, n. 2, p. 481-497, 1999.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul.** Sudesul/HBr/ Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 1978.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 29, n. 49, p. 517-524, 2005.

ROCHA, P. S. R. **Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus ssp.*** 101p. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

RODRIGUES, V. A. **Propagação vegetativa da aroeira *Schinus terebinthifolius* Roddi, canela sassafrás *Ocotea pretiosa* Benth e Hook e Cedro *Cedrella fissilis* Vellozo através de estacas radiciais e caulinares.** 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor Engenharia Floresal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 293-296, 2003.

SAADAT, Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting the multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 251-260, 2002.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect to relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, v. 7, p. 153-156, 1993.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh) e megumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433 – 437, 1993.

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomachal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, p. 468-472, 1990.

SILVA, I. C. **Propagação vegetativa de *Ocotea puberula* Benth e Hook e *Ocotea pretiosa* Ness pelo método da estaquia**. 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1984.

SILVA, A. T.; PASQUAL, M.; ISHIDA, J. S.; ANTUNES, L. E. C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 43-48, 1995.

SEMA - Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Lista vermelha das plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná**. Curitiba: SEMA: GTZ, 1995.

SUTTER, E. G.; SHACKEL, K. A.; DÍAZ, J. C. Acclimatization of tissue cultured plants. **Acta Horticultural**, v. 314, p. 115-119, 1992.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation: technology and application. **Dordrecht: Kluwer Academic**, 1991 p. 331-336.

THORPE, T. A.; PATEL, K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. **Academic Press**, 1984, p. 49-58.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPQ, v. 1, 1998.

VICENTINI, L. S. **Propagação vegetativa “*in vitro*” de imbuia (*Ocotea porosa* Nees) e sassafrás (*Ocotea odorifera* Vellozo)**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEN, T. S.; GIULIETTI, A. M.; KIRIZAWA, M. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. RIMA, São Paulo, v. 3, p. 200-201, 2003.

ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B., FARIA, J. T. C.; GOTTINARI, R. A.; CENTELLAS, A. Q. Uso do ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira ‘marubakaido’. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 387-391, 1998.

ZANIOLO, S. R.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, v. 2, n. 27, 2002.

### 3 CAPÍTULO I: GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE IMBUIA (*Ocotea porosa*) (NESS EX MARTIUS) LIBERATO BARROSO

#### RESUMO

*Ocotea porosa* (Lauraceae), conhecida como imbuia é uma importante espécie florestal com madeira de excelente qualidade que se encontra em risco de extinção. A propagação natural dessa espécie é difícil, por suas sementes serem recalcitrantes e apresentarem dormência tegumentar, irregularidade e baixa porcentagem de germinação. A germinação *in vitro* de embriões poderá solucionar o problema da dormência, além de acelerar e aumentar a porcentagem de germinação, produzindo mais mudas em menos tempo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de imbuia testando diferentes concentrações de sacarose, formulações salinas e concentrações de carvão ativado. As sementes foram desinfestadas com etanol 70% por cinco minutos, seguido de imersão em solução de 1,5 ou 2,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% de Tween<sup>®</sup> 20 por cerca de 20 minutos em agitação. Em seguida as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada e esterilizada. No primeiro experimento os embriões foram inoculados em meio de cultura MS/2, acrescido de 1 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado, sacarose (15; 30; 60 ou 90 gL<sup>-1</sup>) e ágar Micromed<sup>®</sup> (6 gL<sup>-1</sup>). No segundo experimento os embriões foram inoculados em diferentes formulações de sais (MS, WPM, MS/2 ou WPM/2), acrescido de sacarose (30 gL<sup>-1</sup>), carvão ativado (2 gL<sup>-1</sup>) e ágar BBL<sup>®</sup> (5,5 gL<sup>-1</sup>). No terceiro experimento os embriões foram inoculados em meio de cultura MS/2, acrescido de sacarose (30 gL<sup>-1</sup>), carvão ativado (0; 1; 2 ou 3 gL<sup>-1</sup>) e ágar BBL<sup>®</sup> (5,5 gL<sup>-1</sup>). O meio de cultura MS/2, suplementado com 60 ou 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose, proporcionou maiores porcentagens de germinação, com 56,3 ou 59,4% respectivamente. Foram superiores à de 15 gL<sup>-1</sup> que apresentou apenas 10,4% dos embriões germinados. Quando cultivados no meio de cultura MS/2, os embriões apresentaram a maior porcentagem de germinação (74,2%) a qual foi estatisticamente superior às obtidas com as formulações de meio de cultura WPM e WPM/2 (43,3 e 28,3% de germinação respectivamente). A adição de carvão ativado no meio de cultura MS/2 favoreceu a germinação de embriões zigóticos de imbuia, diferindo da testemunha, que não germinou. Desta forma, concluiu-se que a formulação do meio de cultura MS/2, com a adição de 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose e 1 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado, foi mais eficiente para acelerar a germinação de embriões zigóticos de imbuia.

Palavras-chave: cultura de embriões, carvão ativado, sacarose, meio de cultura.

### 3 CHAPTER I: *IN VITRO* GERMINATION OF EMBRYOS OF IMBUIA (*Ocotea porosa*) (NESS EX MARTIUS) LIBERATO BARROSO

#### ABSTRACT

*Ocotea porosa* (Lauraceae) known as imbuia is an important forest species with wood of excellent quality, in risk of extinction. The natural propagation is difficult for its seeds are recalcitrant and present tegumental dormancy, irregularity and low germination percentage. The *in vitro* germination of embryos can solve the problem of the dormancy, besides accelerating and increasing the germination percentage, producing more shoots in less time. The purpose of this work was to evaluate the *in vitro* germination of imbuia zygotic embryos testing different sucrose concentrations, salts formulations and concentrations of activated charcoal. The seeds were disinfested with ethanol 70% for five minutes, followed by immersion in a solution of 1.5 or 2.0% of NaOCl, supplemented with 0.1% of Tween® 20 for about 20 min under slaking. Then the seeds were washed six times in distilled and sterilized water. In the first experiment the embryos were inoculated in a MS/2 culture medium, supplemented 1 gL<sup>-1</sup> of activated charcoal, sucrose (15; 30; 60 or 90 gL<sup>-1</sup>) and ágar Micromed® (6 gL<sup>-1</sup>). In the second experiment the embryos were inoculated in different salts formulations (MS, WPM, MS/2 or WPM/2), supplemented with sucrose (30 gL<sup>-1</sup>), activated charcoal (2 gL<sup>-1</sup>) and ágar BBL® (5.5 gL<sup>-1</sup>). In the third experiment the embryos were inoculated in a MS/2 culture medium, sucrose (30 gL<sup>-1</sup>), activated charcoal (0; 1; 2 or 3 gL<sup>-1</sup>) and agar BBL® (5.5 gL<sup>-1</sup>). The MS/2 culture medium, supplemented with 60 or 90 gL<sup>-1</sup> sucrose, provided a higher percentage of germination, 56.3 and 59.4% respectively, than medium containing 15 gL<sup>-1</sup>, that presented only 10.4% germinated embryos. The formulation of the MS/2 culture medium presented 74.2% germination and it was superior to the formulations of WPM and WPM/2 culture medium, with respectively 43.3% and 28.3%. The addition of activated charcoal in the MS/2 culture medium was important for the germination of imbuia zygotic embryos, differing from the control, where germination didn't happen. It was concluded that salts formulation of MS/2 culture medium, with addition of 30 gL<sup>-1</sup> sucrose and 1gL<sup>-1</sup> of activated charcoal, was efficient to accelerate the germination of the imbuia zygotic embryos.

Key words: embryo culture, activated charcoal, sucrose, culture medium.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As espécies lenhosas apresentam dificuldades para estabelecimento *in vitro*, principalmente quando se utiliza material vegetal oriundo de plantas adultas, por apresentarem maior infestação de microorganismos (COUTO et al., 2004). Desta forma, os embriões são considerados excelentes fontes de explantes e apresentam baixos índices de contaminação microbiana, pelo fato de estarem alojados numa região estéril da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* dos embriões é muito baixo em relação às demais culturas (ILLG, 1986; HU e FERREIRA, 1998).

Os embriões zigóticos podem ser facilmente isolados e cultivados em condições assépticas em meio de cultura, mantendo-se geneticamente estáveis e produzindo descendentes idênticos a eles (ILLG, 1986).

Por meio do cultivo *in vitro* é possível determinar as necessidades nutricionais e fisiológicas dos embriões, superar a dormência em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras e obter fonte de explante com tecido de elevada totipotência (HU e FERREIRA, 1998). Além disso, a germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos ou maduros é utilizada no resgate de embriões, em programas de conservação e melhoramento genético (ZHANG e LESPINASSE, 1991).

O sucesso no resgate de embriões dependerá, principalmente, do estágio em que o embrião é excisado e da composição do meio de cultura utilizado no cultivo *in vitro*. O embrião, durante o seu desenvolvimento, passa pelas fases globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, necessárias para a formação da plântula. Embriões em estádios de desenvolvimento globular e cordiforme apresentam maiores exigências nutricionais no meio de cultura, pois quanto mais jovens os embriões, mais difícil é o cultivo *in vitro*, devido ao seu pequeno tamanho e pelos danos que podem ocorrer durante a excisão (HU e FERREIRA, 1998).

O meio de cultura deve ser adaptado para cada espécie. Embriões imaturos necessitam de 8 a 12% de sacarose, sais minerais e vitaminas (RIBEIRO et al., 1997; PASQUAL e PINTO, 1988), enquanto que embriões maduros requerem de 2 a 3% de sacarose, germinam e crescem em meio inorgânico. A utilização de maiores concentrações de sacarose para embriões imaturos deve-se ao fato destes serem heterotróficos, enquanto que os embriões maduros são quase autotróficos (HU e FERREIRA, 1998).

Vários trabalhos foram realizados com o intuito de elucidar os efeitos do pH, do meio de cultura, da sacarose, do fotoperíodo, dos reguladores vegetais e do carvão ativado no desenvolvimento de embriões (RIBEIRO et al., 1998, 1999 a, b, 2000; PASQUAL et al., 2002a, b, 2003; PASQUAL et al., 1990; RIBEIRO et al., 2000). O carvão ativado promove o crescimento de embriões, por adsorver substâncias inibidoras do meio de cultura ou que são eliminadas pelos explantes, podendo ser utilizado com sucesso para diferentes culturas em concentrações de 0,2 a 3% (PASQUAL, 2001b).

Na literatura não há trabalhos citando a germinação *in vitro* de imbuia. Porém, com outras espécies da família Lauraceae como *Aniba roseadora* (pau-rosa) HANDA et al. (2005) obtiveram 53% de germinação e com *Ocotea odorifera* (canela-sassafrás), foi obtido 78,5% de germinação (CATARINA et al., 2001) sendo possível obter plantas por meio da germinação *in vitro*.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito de diferentes concentrações de sacarose, de formulações salinas bem como a adição de diferentes concentrações de carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de imbuia.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

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

#### 3.2.1 Desinfestação das sementes

Foram utilizados frutos maduros, com coloração violácea escura a preta, coletados em abril de 2006, na localidade de Colombo – PR, medindo entre 1,2 a 1,7 cm de diâmetro (Figura 12B). Os frutos foram despulpados manualmente, as sementes permaneceram imersas em água por cerca de dez horas, em seguida foram lavadas e colocadas em local com insolação direta por cerca de duas horas para romper o tegumento (escarificação solar) (Figura 12C). Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação com solução de etanol 70% por cinco minutos, seguido de imersão em solução de 1,5 ou 2,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% de Tween<sup>®</sup> 20, por 20 minutos, em agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada e esterilizada.

#### 3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões de imbuia

Com auxílio de pinças e bisturis os embriões foram isolados do endosperma e inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura MS/2 (MS com a metade da concentração de sais), acrescido de carvão ativado (1 gL<sup>-1</sup>), sacarose (15; 30; 60 ou 90 gL<sup>-1</sup>) e ágar Micromed<sup>®</sup> (6 gL<sup>-1</sup>).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, quatro repetições e três frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía quatro embriões.



### 3.2.3 Efeito de diferentes formulações de sais na germinação *in vitro* de embriões de imbuia

Com auxílio de pinças e bisturis os embriões foram isolados do endosperma e inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura com diferentes formulações: MS, WPM, MS/2 e WPM/2 (meios de cultura com os sais reduzidos pela metade), acrescido de sacarose ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ), de carvão ativado ( $2 \text{ gL}^{-1}$ ) e ágar BBL<sup>®</sup> ( $5,5 \text{ gL}^{-1}$ ).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e cinco frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía quatro embriões.

### 3.2.4 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões de imbuia

Com auxílio de pinças e bisturis os embriões foram isolados do endosperma e inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura MS/2 (MS com a metade da concentração de sais), acrescido de sacarose ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ), carvão ativado (0; 1; 2 e  $3 \text{ gL}^{-1}$ ) e ágar BBL<sup>®</sup> ( $5,5 \text{ gL}^{-1}$ ).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e cinco frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía quatro embriões.

### 3.2.5 Avaliações

A avaliação da porcentagem de germinação, de embriões oxidados e de embriões sem resposta foi avaliada após 60 dias de cultivo, sendo os embriões contaminados desprezados. Foi considerado germinado o embrião que apresentou emissão da radícula (0,2 a 0,4 cm de comprimento).

### 3.2.6 Condições de cultivo

Os frascos utilizados nos experimentos possuíam 7 centímetros de diâmetro por 15 centímetros de altura, com capacidade de 300 ml, contendo 40 ml de meio de

cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento no escuro por sete dias e posteriormente foram transferidos para luz com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (dia) e  $19 \pm 2^\circ\text{C}$  (noite), sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett onde as variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade, a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.3 RESULTADOS DE DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões de imbuia

A análise de variância (Anexo 1) foi significativa para a germinação *in vitro* de embriões de imbuia com diferentes concentrações de sacarose.

A germinação *in vitro* de embriões de imbuia em meio de cultura com 30, 60 ou 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose não apresentou diferença estatística (Tabela 1). A adição de 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou 59,4% de germinação enquanto que com a menor concentração de sacarose (15 gL<sup>-1</sup>) foi obtido apenas 10,4% de germinação, como pode ser visto na Tabela 1. Resultados semelhantes ao deste trabalho foi obtido com embriões de *Aniba roseadora* (pau-rosa), espécie também da família Lauraceae, onde a concentração mais elevada de sacarose testada (50 gL<sup>-1</sup>) proporcionou 53% de germinação (HANDA et al., 2005).

TABELA 1 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE IMBUIA EM MEIO DE CULTURA MS/2, APÓS 60 DIAS.

Sacarose (gL <sup>-1</sup> )	Germinação (%)	Embriões oxidados (%)	Sem Resposta (%)
15	10,4 b	0,0	89,6
30	45,5 ab	5,7	48,8
60	56,3 ab	0,0	43,7
90	59,4 a	0,0	40,6

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para outras espécies lenhosas como *Parapiptadenia rigida* (angico), *Cedrela odorata* (cedro), *Copaiba spp.* (copaíba) e *Hancornia speciosa* (mangabeira), a ausência ou baixas concentrações de sacarose (10 e 20 gL<sup>-1</sup>) foram eficientes na germinação *in vitro* (NASCIMENTO et al., 2007; GOMES et al., 1997; AZEVEDO et al., 2002; PINHEIRO et al., 2001), ao contrário do que foi observado no presente trabalho, pois com a adição de 15 gL<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura ocorreu apenas 10,4% de germinação (Tabela 1).

A baixa porcentagem de germinação obtida em meio de cultura com 15 gL<sup>-1</sup> de sacarose, provavelmente deve-se ao fato de que os embriões não estavam bem

maduros, necessitando de concentrações mais elevadas de sacarose. Segundo HU e FERREIRA (1998) quando os embriões são imaturos e por serem heterotróficos, estes requerem concentrações maiores de sacarose entre 8 a 12%, ao passo que os embriões maduros necessitam de concentrações menores de sacarose de 2 a 3%, pois são quase autotróficos podendo germinar e crescer em meio inorgânico.

A oxidação dos embriões foi observada apenas no tratamento com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 1). Essa baixa porcentagem de embriões oxidados provavelmente tenha sido devido à adição de carvão ativado no meio de cultura, pois este age na adsorção de substâncias fenólicas liberadas pelo explante, as quais são responsáveis pela oxidação dos embriões (GEORGE, 1996).

### 3.3.2 Efeito de diferentes formulações de sais na germinação *in vitro* de embriões de imbuia

A análise de variância (Anexo 2) foi significativa para a germinação *in vitro* de embriões de imbuia em meio de cultura com diferentes formulações de sais.

A porcentagem de embriões germinados foi maior nos meios de cultura MS e MS/2 (MS com a metade da concentração de sais) obtendo-se 67,7 e 74,2% de germinação respectivamente, diferindo estatisticamente dos meios de cultura WPM e WPM/2 (Tabela 2).

Essa maior porcentagem de embriões germinados com a formulação de sais do MS, provavelmente tenha ocorrido devido às concentrações mais elevadas de sais nitrato e amônio desse meio, em relação à formulação do meio WPM, sendo mais eficaz no crescimento e germinação dos embriões (Figura 13A e B).

TABELA 2 – EFEITO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SAIS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE IMBUIA, APÓS 60 DIAS.

Formulação de sais	Germinação (%)	Sem Resposta (%)
MS	67,7 ab	32,3
MS/2	74,2 a	25,8
WPM	43,3 bc	56,7
WPM/2	28,3 c	71,7

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O meio de cultura MS contém 40 mM de  $\text{NO}_3^-$  e 20 mM de  $\text{NH}_4^+$  e o crescimento das células e tecidos das plantas está relacionado a alta concentração de amônia e nitrato (GEORGE, 1996), enquanto que a formulação do meio de cultura WPM é mais diluída apresentando na sua composição menor concentração de nitrogênio, potássio e menor força iônica total, que consiste em 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio de cultura MS (HARRY e THORPE, 1994; PASQUAL, 2001a).

Com isso, as formulações de nutrientes do meio de cultura MS e MS/2 apresentaram uma superioridade na germinação dos embriões de imbuia. Essa diferença é importante quando se procura um meio adequado para as diferentes espécies e tipos de culturas, pois os níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos nos meios de cultura constituem fator determinante para o crescimento e morfogênese (GEORGE, 1996; MALDANER et al., 2006).

Segundo DODD e DONOVAN (1999) a presença de uma concentração maior ou menor de sais, ou outros compostos osmoticamente ativos, no meio de cultura de germinação, de acordo com a espécie e com o potencial osmótico de suas sementes, poderá viabilizar ou inviabilizar a germinação. Além disso, estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* de espécies recalcitrantes são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação como para obter plântulas uniformes com qualidade genética e fitossanitária adequada (STEIN et al., 2007).

Para a imbuia, que apresenta sementes recalcitrantes e com forte dormência tegumentar, dificultando sua propagação natural (SILVA et al., 1997), a germinação *in vitro* é uma alternativa para a obtenção de plantas.

Uma vantagem da germinação *in vitro* da imbuia é que reduz a irregularidade da germinação e acelerar a produção de plantas, uma vez que após 60 dias obteve-se 74,2% de germinação em meio de cultura MS/2. KALIL-FILHO et al. (2004) obtiveram uma porcentagem máxima de germinação *ex vitro* de 71% das sementes de imbuia, após 200 dias de semeadura. CARVALHO (2003) indicou que as sementes de imbuia recém coletadas apresentaram 65% de germinação e quando estas permaneceram armazenadas por 12 meses, a porcentagem de germinação diminuiu drasticamente para 7,2 a 1% apenas. Como a imbuia é uma espécie que apresenta sementes com alto teor de água no ponto de maturação

fisiológica, a perda de água durante o armazenamento por longo período diminuiu a viabilidade.

Em outro trabalho de germinação *ex vitro* de imbuia, TONIN (2005) obteve uma porcentagem de germinação de 92,5%, porém após um período maior, de 270 dias de semeadura. De acordo com os resultados obtidos em estudos de germinação *ex vitro* da imbuia, observou-se que a germinação das sementes de imbuia é irregular, o que também foi citado por BILIA et al. (1998).

Segundo NOLETO e SILVEIRA (2004), a germinação de sementes *in vitro* permite, freqüentemente, uma maior germinação das sementes do que em viveiros, provavelmente porque as condições *in vitro* são mais adequadas aos processos de germinação e desenvolvimento inicial da plantas.

### 3.3.3 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões de imbuia

A análise de variância (Anexo 3) foi significativa para a germinação *in vitro* de embriões de imbuia com diferentes concentrações de carvão ativado no meio de cultura.

A adição de carvão ativado no meio de cultura favoreceu a germinação dos embriões de imbuia (Tabela 3). A maior porcentagem de germinação (62,1%) foi com o tratamento de 3 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado (Figura 13D). Porém, este foi estatisticamente igual aos tratamentos com 1 ou 2 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado e significativamente superiores à testemunha.

A adição de 1,5 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado no meio de cultura MS também foi positiva na germinação de embriões de *Ocotea odorifera* (canela-sassafrás) com 78,5% de germinação (CATARINA et al., 2001). Com outra espécie *Hancornia speciosa* (mangabeira), o meio de cultura MS/2, acrescido de 2 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado, foi eficiente na germinação *in vitro*, proporcionando 100% de germinação e bom desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de plantas (LEDO et al., 2007).

TABELA 3 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO NO MEIO DE CULTURA MS/2 SOBRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE IMBUIA, APÓS 60 DIAS.

Carvão ativado (gL <sup>-1</sup> )	Germinação (%)	Embriões oxidados (%)	Sem Resposta (%)
0	0,00 b	45,0	55,0
1	56,2 a	0,0	43,8
2	47,1 a	0,0	52,9
3	62,1 a	0,0	37,9

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na testemunha, não ocorreu germinação dos embriões e 45% destes oxidaram (Figura 13C). A oxidação do explante é considerada um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de tecidos. A oxidação dos embriões está atribuída à liberação e oxidação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante. Em estudos realizados por PREECE e COMPTON (1991) com algumas espécies lenhosas, estes autores caracterizaram as substâncias encontradas nos meios de cultura e as identificaram como sendo fenóis, flavonóides e taninos responsáveis pela oxidação.

Um fator que pode auxiliar na redução da oxidação fenólica dos explantes é o uso do carvão ativado no meio de cultura. O carvão ativado age promovendo a adsorção dos exsudatos liberados pelos explante, os quais provocam a oxidação como foi citado por GEORGE (1996) e PAN e VAN-STADEN (1998).

Outro fator que pode contribuir para a prevenção da oxidação fenólica dos explantes, é a manutenção por um período no escuro, como foi recomendado por MARKS e SIMPSON (1990). Nesse experimento, os embriões foram mantidos por sete dias na ausência de luz, no entanto, esse período não foi suficiente para evitar a oxidação da imbuia. Para AMARAL et al. (1997), a manutenção das culturas no escuro por 7 a 15 dias foi favorável à redução da oxidação fenólica de embriões de *Carapa guianensis* (andiroba) germinados *in vitro*.

CALDAS et al. (1998) afirmaram que a adição de antioxidantes no meio de cultura e a redução da concentração de sais podem minimizar os efeitos da oxidação dos explantes causados pela liberação de compostos fenólicos. No presente trabalho, apesar da concentração de sais do meio de cultura MS ter sido reduzida pela metade, não foi suficiente para controlar a oxidação fenólica.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a germinação *in vitro* é uma técnica que pode acelerar a geminação desta espécie, podendo assim obter um maior número de plantas em menos tempo, quando comparado com a germinação natural. Além de acelerar a germinação, a cultura de embriões zigóticos pode ser usada para superar a dormência das sementes da imbuia e também servir como ferramenta na obtenção de explantes assépticos para a multiplicação.

Dessa forma, os estudos de germinação *in vitro* de imbuia são de importância relevante. O protocolo de germinação busca obter uma maior porcentagem de plantas germinadas *in vitro*, obtendo explantes assépticos para o estabelecimento *in vitro*, como foi citado por CASTRO (2002), podendo estas serem utilizadas para fins de reposição de áreas degradadas e reflorestamentos.



### 3.4 CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* de embriões zigóticos de imbuia é viável, permitindo acelerar a produção de mudas dessa espécie e superar as dificuldades de germinação *ex vitro* devido a forte dormência tegumentar de suas sementes. Desta forma, recomenda-se a utilização da formulação de sais do meio de cultura MS/2, com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose e 1 gL<sup>-1</sup> carvão ativado.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, S. A.; SILVA, A. T.; MOTA, M. G. C.; VIEIRA, I. M. S. Uso de tratamento como antioxidantes de explantes (embrião, endosperma) de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP, 7., 1996, SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 1. **Resumos...** Belém: FCAP. 1997, p. 122-124.

AZEVEDO, K. S. de; PAIVA, R.; SANTOS, C. G. dos. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de sementes de copaíba (*Copaíba* spp.) In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2002.

BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; MALUF, A. M. Germinação de diásporos de canela (*Ocotea corymbosa* (Meissn.) Mez – Lauraceae) em função da temperatura, do substrato e da dormência. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 189-194, 1998.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo, PR.: EMBRAPA FLORESTAS, v. 1, 2003, 1039 p.

CASTRO, R. C. G. A ciência mais próxima do mercado. **Jornal da USP**, ano 17, n. 590, p. 8, 2002.

CATARINA, C. S.; MACIEL, S. C.; PEDROTTI, E. L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 501-510, 2001.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

DODD, G. L.; DONOVAN, L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 8, p. 1146-1153, 1999.

GOMES, A. P. R.; LAMEIRA, O. A.; LOPES, S. C.; MENEZES, I. C., LEO, N. V. M. Germinação de embriões de cedro (*Cedrela odorata*) submetidos a diferentes concentrações de sacarose em relação à luminosidade. In: Seminário de Iniciação Científica da FCAP,7.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL . 1. **Resumos...** Belém: FCAP, 1997, p. 275-276.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture.** Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.2, 1996.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba roseodora* Ducke). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.

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

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa/CNPq**, v. 1 p. 371-393, 1998.

ILLG, R.D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1986, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986, p .45-47.

KALIL-FILHO, A. N; SOUZA, V. A de; MARZOLLO, L. G.; HIRANO, E. Dinâmica da Germinação de sementes de progênie de populações de imbuia (*Ocotea porosa* Nees et Martius ex. Nees, Lauraceae) do Paraná e de Santa Catarina. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 48, p. 121-128, 2004.

LÉDO, A. S; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C; SILVA JUNIOR. J. F. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1201-1206, 2006.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**. v. 65, n. 2, p. 103-111, 1990.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 141-143, 2007.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 109-120, 2004.

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

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: PAEPE/UFLA, 2001a, 127 p.

PASQUAL, M. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. 79 p. Monografia (especialização em cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações) - Universidade Federal de Lavras, 2001b.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Ponca' x laranja 'Pera' em diferentes fotoperíodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 535-540, 2003.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Ponca': concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 49, n. 282, p. 191-189, 2002a.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Ponca' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002b.

PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de embriões**. Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, Brasília, v. 9, p. 2-12, 1988.

PASCOAL, M.; RIBEIRO, V. G.; RAMOS, J. D. Influência do GA<sub>3</sub> e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja "Natal". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 10, p. 1477-1482, 1990.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N.; MACÊDO, C. E. C.; ALLOUFA, A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry: 17 – High-Tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991, p. 168-189.

RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; JUNIOR, A. F. O.; CARVALHO, G. R. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Pera'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 11, p. 1147-1152, 1997.

RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; VICHATO, M.; SANÁBIO, D. Cultivo *in vitro* de embriões de Laranja 'Pêra': concentrações do meio MS e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n.4, p. 429 – 434, 1998.

RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; BEARZOTI, E.; NETO, S. D. Estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1327-1333, 1999a.

RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; et al. Influência do ágar e do pH sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 46, p. 587-595, 1999b.

RIBEIRO, V. G.; SANABIO, D.; SOUZA, C. N. et al. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 27-30, 2000.

SILVA, J. A.; SALOMÃO, A. N.; GRIPP, A.; LEITE, E. J. Phytosociological survey in Brazil forest genetic reserve of Caçador. **Plant Ecology**, Dordrecht, n. 133, p. 1-11, 1997.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; EMRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, 2007.

TONIN, G. A. **Efeito da época de coleta, condições de armazenamento, substratos e sombreamento na emergência de plântulas e produção de mudas de *Ocotea porosa* (Ness et Martius ex. Nees) Lauraceae e de *Sapindus saponaria* L. (Saponaceae).** 176 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Setor de Biológicas e da Saúde, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2005.

ZHANG, Y. X.; LESPINASSE, Y. Removal of embryogenic dormancy in apple (*Malus domestica* Borkh) by 6-benzilaminopurine. **Scientia Horticulturae**, v. 46, p. 215-223, 1991.

## 4 CAPÍTULO II: MICROPROPAGAÇÃO DE IMBUÍIA (*Ocotea porosa*) (NESS EX MARTIUS) LIBERATO BARROSO

### RESUMO

O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação da imbuíia. Brotações apicais de mudas de imbuíia de um ano de idade mantidas em casa-de-vegetação foram desinfestadas e estabelecidas *in vitro*. Brotações isentas de contaminação foram inoculadas em meio de cultura MS, acrescido de BAP (0; 2,5; 5 ou 10  $\mu\text{M}$ ) ou de combinações de BAP + CIN (0+0; 1,25+1,25; 2,5+2,5 e 5+5  $\mu\text{M}$ ). O alongamento das brotações foi avaliado em meio de cultura MS, com concentrações reduzidas de BAP (0; 0,5; 1 ou 1,5  $\mu\text{M}$ ), de CIN (0,5 ou 1  $\mu\text{M}$ ) ou de carvão ativado (0,5; 1; 2 ou 3  $\text{gL}^{-1}$ ). A indução de raízes foi avaliada em meio de cultura WPM/2 ou MS/2, acrescido de AIB (0; 1,25; 2,5; 5 ou 10  $\mu\text{M}$ ) durante 7 dias ou com tratamento pulso por 10 minutos em soluções de: 0; 2,5; 5 ou 10 mM de AIB, seguido de transferência para meio de cultura sem regulador vegetal. As plantas enraizadas foram plantadas nos substratos: Plantmax<sup>®</sup> HT; Plantmax<sup>®</sup> HT+carvão vegetal (3:1); Plantmax<sup>®</sup> HT+casca de arroz carbonizada (2:1); Plantmax<sup>®</sup> HT+casca de arroz carbonizada+terra peneirada (2:1:1) e mantidas em casa-de-vegetação. O meio de cultura MS, suplementado com 5  $\mu\text{M}$  de BAP foi mais eficiente proporcionando 5,3 brotações por explante, após quatro subcultivos. A adição de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,5  $\mu\text{M}$  de CIN proporcionaram 3,6 brotações, após quatro subcultivos. O comprimento médio das brotações foi maior no cultivo inicial, ocorrendo uma redução do comprimento nos demais subcultivos. O meio de cultura suplementado com concentrações reduzidas de BAP (1  $\mu\text{M}$ ), proporcionou as brotações mais alongadas (79,3%). A utilização de 2  $\text{gL}^{-1}$  de carvão ativado no meio de cultura proporcionou um melhor alongamento das brotações que a concentração de 0,5  $\text{gL}^{-1}$  no alongamento das brotações. A indução de raízes em meio de cultura WPM/2, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de AIB proporcionou 57,5% de enraizamento. Com a adição de 10  $\mu\text{M}$  de AIB em meio de cultura MS/2 obteve-se 68,7% de enraizamento. O tratamento pulso por 10 minutos em solução de 5 e 10 mM de AIB, induziu 61,1 e 62,5% de enraizamento. O meio de cultura MS/2 suplementado com 1  $\text{gL}^{-1}$  de carvão ativado no desenvolvimento de raízes não favoreceu o enraizamento, sendo que a maior porcentagem de enraizamento foi de 40%. A maior porcentagem de plantas sobreviventes após quatro semanas em casa-de-vegetação foi de 56,7% com o substrato Plantmax<sup>®</sup>+casca de arroz carbonizada (2:1). Concluiu-se que a micropropagação de imbuíia foi viável, utilizando para a multiplicação, o meio de cultura contendo 5  $\mu\text{M}$  de BAP durante quatro subcultivos, para o alongamento 1  $\mu\text{M}$  de BAP e para enraizamento o meio de cultura MS/2 com 5  $\mu\text{M}$  de AIB durante 7 dias. A aclimatização necessita de mais estudos para aumentar a porcentagem de sobrevivência.

Palavras-chave: multiplicação, enraizamento, citocininas, meio de cultura.

#### 4 CHAPTER II: MICROPROPAGATION OF IMBUIA (*Ocotea porosa*) (NESS EX MARTIUS) LIBERATO BARROSO

##### ABSTRACT

The purpose of this work was to establish a micropropagation protocol imbuia. One-year-old apical shoots from plants kept in greenhouse were disinfested and established *in vitro*. Contamination-free shoots were inoculated in MS culture medium, supplemented with BAP (0; 2.5; 5 or 10  $\mu\text{M}$ ) or combinations of BAP+KIN (0+0; 1.25+1.25; 2.5+2.5 and 5+5  $\mu\text{M}$ ). The shoots elongation was evaluated in MS culture medium with low concentrations of BAP (0; 0.5; 1 or 1.5  $\mu\text{M}$ ) KIN (0.5 or 1  $\mu\text{M}$ ) or activated charcoal (0.5; 1; 2 or 3  $\text{gL}^{-1}$ ). The induction of roots was evaluated in WPM/2 or MS/2 culture medium, supplemented with IBA (0; 1.25; 2.5; 5 or 10  $\mu\text{M}$ ) during 7 days or with pulse treatment for 10 minutes in solutions of: 0; 2.5; 5 or 10 mM IBA, followed by transfer to culture medium without growth regulator. The rooted plants were planted in the substrates Plantmax<sup>®</sup> (100%); Plantmax<sup>®</sup>+charcoal (3:1); Plantmax<sup>®</sup>+rind rince carbonized (2:1); Plantmax<sup>®</sup>+rind rice carbonized+land (2:1:1), all kept in a greenhouse. The culture medium, supplemented with 5  $\mu\text{M}$  BAP, was efficient and produced 5.3 shoots after four subcultures. The addition of 2.5  $\mu\text{M}$  BAP + 2.5  $\mu\text{M}$  KIN produced 3.6 shoots after four subcultures. The mean length of the shoots was higher in the initial culture, occurring a reduction during the following subcultures. The culture medium, supplemented with low concentrations of BAP (1  $\mu\text{M}$ ) provided more elongated shoots (79.3%). The use of 2  $\text{gL}^{-1}$  of activated charcoal in the culture medium was superior to the 0.5  $\text{gL}^{-1}$  in elongation of the shoots. The induction of roots in WPM/2 culture medium, supplemented with 2.5  $\mu\text{M}$  IBA provided 57.5% of rooting. With the addition of 10  $\mu\text{M}$  IBA in MS/2 culture medium 68.7% of rooting was obtained. The pulse treatment for 10 minutes in solution of 5 and 10 mM IBA provided 61.1% and 62.5% of rooted shoots. The culture medium supplemented with activated charcoal did not favor the rooting and the highest percentage of rooting was 40%. The percentage of surviving plants after four weeks in greenhouse was 56.7% with the substrate Plantmax<sup>®</sup>+rind rice carbonized. It was concluded that the micropropagation of the imbuia was viable, when the MS culture medium, containing 5  $\mu\text{M}$  of BAP was used for multiplication during four subcultures, 1  $\mu\text{M}$  of BAP for shoots elongation and MS/2 culture medium with 5  $\mu\text{M}$  of IBA during 7 days for rooting. The acclimatization of plants was 56.7% and more studies are needed to increase the survival percentage.

Key words: multiplication, rooting, cytokinins, medium culture.



## 4.1 INTRODUÇÃO

A imbuia (Lauraceae) é uma espécie florestal lenhosa, característica da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) podendo medir até 30 metros de altura (CARVALHO, 2003). Devido à redução da área de ocorrência natural pela exploração madeireira e das atividades agrícolas (CALDATO et al., 1999 e NETO et al., 2002) a imbuia se encontra em risco de extinção (CARVALHO, 2003).

A madeira da imbuia, devido a sua qualidade estética é mundialmente apreciada, sendo exportada em grande quantidade para fabricação de mobiliário de luxo, construção civil, marcenaria, carpintaria (CARVALHO, 2003).

A regeneração natural da imbuia é baixa (SILVA et al., 1997) por apresentar sementes recalcitrantes, forte dormência tegumentar e germinação irregular o que torna a propagação por meio de sementes onerosa (CARVALHO, 2003) e a propagação vegetativa da imbuia por meio da estaquia apresenta baixa porcentagem de estacas enraizadas (INOUE e PUTTON, 2007). Estes fatores fazem da propagação *in vitro*, uma alternativa vantajosa em relação aos outros métodos de propagação dessa espécie.

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de mais larga utilização, da qual é possível originar um grande número de plantas geneticamente uniformes (RIBEIRO et al., 2002) a partir de poucas plantas matrizes, em curto período de tempo e espaço físico reduzido, contribuindo para a preservação de patrimônio genético valioso (HU e WANG, 1993 e FRANÇA, 1999). Além disso, a micropropagação proporciona a produção de plantas livres de bactérias, fungos ou vírus, que podem afetar o desenvolvimento da planta (GRATTAPLIA e MACHADO, 1998). De acordo com GEORGE (1993), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares.

Na micropropagação, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas. A micropropagação difere da propagação tradicional nos componentes biológicos de cada etapa, pois são separados dentro de estágios (estabelecimento dos explantes *in vitro*, multiplicação, alongamento e enraizamento), aumentando assim o controle de cada aspecto da regeneração e dos processos de desenvolvimento. As etapas podem ser manipuladas pela seleção de explantes e controle do desenvolvimento da cultura (HARTMANN et al., 2002).

Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos cultivados e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Várias formulações de meios de cultura vêm sendo utilizadas para diferentes espécies. A formulação salina do meio de cultura MS apresenta altas concentrações de sais, principalmente os íons nitrato e amônio, (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (GEORGE, 1996) sendo a mais utilizada para as Angiospermas (HARRY e THORPE, 1994). Entretanto, essa formulação de sais não se mostrou eficiente para algumas espécies lenhosas e composições mais diluídas de macronutrientes como a do meio de cultura WPM “woody plant medium” (LLOYD e McCOWN, 1980 e HARRY e THORPE, 1994) tem sido utilizada com sucesso. O meio de cultura WPM apresenta menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio) e menor força iônica total quando comparado ao meio de cultura MS (SAADAT e HENNERTY, 2002).

Dentre as citocininas, a cinetina (CIN) e a 6-benzilaminopurina (BAP) são as mais utilizadas. A BAP tem sido muito eficaz em promover a multiplicação de diversas espécies, em concentrações que podem variar entre 0,4 a 22,19  $\mu\text{M}$  (GEORGE, 1993). As auxinas mais utilizadas para indução de raízes são o ácido indol-3-butírico (AIB) e o ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) (BERTAZZA et al., 1995; GEORGE, 1996). O AIB tem sido bastante utilizado por não causar fitotoxicidade aos explantes e ser eficiente no enraizamento de muitas espécies (HARTMANN et al., 2002). As concentrações mais freqüentes estão entre 0,5 a 5,0  $\mu\text{M}$  (GEORGE, 1996).

O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de diferentes concentrações e combinações de citocininas na multiplicação, bem como testar concentrações reduzidas de citocininas ou diferentes concentrações de carvão ativado no alongamento de brotações de imbuia. Testar diferentes concentrações de AIB na indução e desenvolvimento de raízes e determinar uma metodologia de transplante e aclimatização das mudas de imbuia regeneradas *in vitro*.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

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

### 4.2.1 Efeito do NaOCl na desinfestação de brotações juvenis de imbuia

Brotações apicais medindo de 2 a 3 cm de comprimento foram coletadas de mudas de imbuia germinadas em casa-de-vegetação com cerca de um ano de idade (Figura 12D e E). As brotações foram colocadas em frasco com água destilada e esterilizada e levadas para câmara de fluxo laminar onde foram submetidas ao tratamento de desinfestação com solução de etanol 70 % por 30 segundos, seguida de imersão em solução de 0,25% de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescida de 0,1% de Tween 20<sup>®</sup>, durante 10 minutos em agitação constante. Em seguida, as brotações foram lavadas cinco vezes em água destilada e esterilizada.

As brotações com aproximadamente 2 cm de comprimento foram inoculadas meio de cultura MS/2 suplementado com 0,5 gL<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) e solidificado com ágar Micromed<sup>®</sup> (6 gL<sup>-1</sup>).

As culturas foram mantidas por cinco dias na ausência de luz. As avaliações da porcentagem de necrose, de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana e de sobrevivência foram feitas após quatro semanas de cultivo.

### 4.2.2 Efeito da BAP e da combinação de BAP e CIN na multiplicação de brotações axilares de imbuia

Brotações apicais com cerca de 2 cm de comprimento com uma ou duas gemas e oriundas da fase de estabelecimento de culturas assépticas isentas de contaminação microbiana foram utilizadas como explantes para a multiplicação. As brotações foram inoculadas em meio de cultura MS, acrescido de BAP (0; 2,5; 5 ou 10 µM) ou de combinação de BAP e CIN (0+0; 1,25+1,25; 2,5+2,5 ou 5+5 µM), sacarose (30 gL<sup>-1</sup>) e solidificado com ágar BBL<sup>®</sup> (6 gL<sup>-1</sup>).

Após quatro semanas foi avaliado o número médio de brotações por explante, comprimento médio das brotações axilares e a porcentagem de

alongamento das brotações. As avaliações foram realizadas após o cultivo inicial ( $S_0$ ) e nos quatro subcultivos ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  e  $S_4$ ) subsequentes.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições e 11 frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía uma brotação.

#### 4.2.3 Efeito de concentrações reduzidas de BAP ou de CIN no alongamento de brotações de imbuia

Brotações oriundas do quarto subcultivo da fase de multiplicação com BAP que apresentavam comprimento entre 0,5 e 1,5 cm foram utilizadas como explantes para o experimento de alongamento das brotações. O meio de cultura utilizado foi o MS acrescido de 0; 0,5; 1 ou 1,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$  de CIN, sacarose ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ) e solidificado com ágar BBL<sup>®</sup> ( $6 \text{ gL}^{-1}$ ).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos, quatro repetições e dez frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía uma brotação. A avaliação da porcentagem de alongamento das brotações foi realizada após seis semanas de cultivo.

#### 4.2.4 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado no alongamento de brotações de imbuia

Brotações oriundas do quarto subcultivo da fase de multiplicação com BAP e CIN combinados, que apresentavam comprimento entre 0,5 e 1,5 cm foram utilizadas como explantes. As brotações foram inoculadas em meio de cultura MS, acrescido de 0,5; 1; 2 ou 3  $\text{gL}^{-1}$  de carvão ativado, sacarose ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ) e solidificado com ágar BBL<sup>®</sup> ( $5,5 \text{ gL}^{-1}$ ).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos, quatro repetições e quatro frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía cinco brotações. A avaliação da porcentagem de alongamento das brotações foi realizada após seis semanas de cultivo.

#### 4.2.5 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura WPM/2

Brotações oriundas da fase de alongamento em meio de cultura com carvão ativado e que apresentavam 2 cm de comprimento, com corte em bisel duplo na base e duas folhas apicais foram utilizadas para indução de raízes. As brotações foram inoculadas em de meio de cultura WPM/2 (com metade da concentração de sais), acrescido com AIB (0; 1,25; 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ), sacarose (20  $\text{gL}^{-1}$ ) e ágar BBL<sup>®</sup> (5,5  $\text{gL}^{-1}$ ) por sete dias na ausência de luz. Após esse período, as brotações foram transferidas para meio WPM/2, sem AIB, para o desenvolvimento das raízes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos, quatro repetições e dois frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía cinco brotações. A avaliação da porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes foi realizada após quatro semanas de cultivo.

#### 4.2.6 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura MS/2

Brotações oriundas da fase de alongamento em meio de cultura com carvão ativado e que apresentavam 2 cm de comprimento, corte em bisel duplo na base e duas folhas apicais foram utilizadas como explantes na indução e desenvolvimento de raízes de imbuia. As brotações foram inoculadas em de meio de cultura MS/2 (com metade da concentração de sais), acrescido com AIB (0; 1,25; 2,5; 5 ou 10  $\mu\text{M}$ ), sacarose (30  $\text{gL}^{-1}$ ) e ágar BBL<sup>®</sup> (5,5  $\text{gL}^{-1}$ ) por sete dias na ausência de luz. Após esse período, as brotações foram transferidas para meio de cultura MS/2 sem AIB, para o desenvolvimento das raízes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, quatro repetições e dois frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía cinco brotações. A avaliação da porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes foi realizada após quatro semanas de cultivo.

#### 4.2.7 Efeito do tratamento pulso na indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura WPM/2

Brotações oriundas da fase de alongamento em meio de cultura com carvão ativado, medindo aproximadamente 2 cm de comprimento e com extremidade basal cortada em bisel duplo e com duas folhas apicais foram utilizadas como explante para indução do enraizamento.

As brotações foram submetidas ao tratamento de imersão da base (0,5 cm) em soluções de 0; 2,5; 5 ou 10 mM de AIB (dissolvidas com NaOH 0,1N) por 10 minutos. Em seguida, as brotações foram inoculadas em de meio de cultura WPM/2 (com metade da concentração de sais) suplementado com sacarose (20 gL<sup>-1</sup>) e ágar BBL<sup>®</sup> (5,5 gL<sup>-1</sup>).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos, quatro repetições e dois frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía cinco brotações. A avaliação da porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes foi realizada após quatro semanas de cultivo.

#### 4.2.8 Efeito do AIB na indução de raízes e do carvão ativado no desenvolvimento das raízes

Brotações oriundas da fase de alongamento em meio de cultura com concentrações reduzidas de citocininas foram utilizadas como explantes na indução e desenvolvimento de raízes. Brotações com 2 cm de comprimento, com corte em bisel duplo na base e duas folhas apicais foram inoculadas em meio de cultura MS/2 acrescido de AIB (0; 2,5; 5 ou 10 µM), sacarose (30 gL<sup>-1</sup>) e ágar BBL<sup>®</sup> (5,5 gL<sup>-1</sup>) por sete dias na ausência de luz. Posteriormente, as brotações foram transferidas para meio de cultura MS/2 sem AIB, acrescido de 1 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos, quatro repetições e dois frascos por parcela, sendo que cada frasco possuía cinco brotações. A avaliação da porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes foi realizada após quatro semanas de cultivo.

#### 4.2.9 Transplântio e aclimatização de mudas de imbuia regeneradas *in vitro*

As brotações enraizadas foram pré-aclimatizadas em sala de crescimento por 48 horas, com a abertura gradativa da tampa dos frascos. As plantas foram retiradas dos frascos, as raízes lavadas em água para retirada do meio de cultura e plantadas em tubetes com capacidade de 53 cm<sup>3</sup> contendo como substrato: Plantmax<sup>®</sup> HT (100%); Plantmax<sup>®</sup> HT+carvão vegetal (3:1); Plantmax<sup>®</sup> HT+casca de arroz carbonizada (2:1); Plantmax<sup>®</sup> HT+casca de arroz carbonizada+terra peneirada (2:1:1).

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetao modelo *Van der Hoeven* sob nebulizao intermitente (um minuto de nebulizao em intervalo de 5 minutos) e com temperatura de 24±2°C e UR 90±2%. Após quatro semanas foi avaliada a porcentagem de plantas sobreviventes.

#### 4.2.10 Condições de cultivo

Os frascos utilizados nos experimentos de estabelecimento de culturas assépticas, multiplicao e alongamento possuíam três centímetros de diâmetro e sete centímetros de altura, com capacidade de 55 ml, contendo 15 ml de meio de cultura e foram tampadas com alumínio. Nos experimentos de alongamento e indução e desenvolvimento de raízes os frascos possuíam sete centímetros de diâmetro e 15 centímetros de altura, com capacidade para 300 ml, contendo 40 ml de meio de cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Nas etapas de estabelecimento de cultura assépticas, multiplicao e alongamento das brotações, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Na indução de raízes, as brotações foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz por sete dias, seguido de transferência para as mesmas condições acima citadas.

#### 4.2.11 Análise estatística

Os resultados dos experimentos de multiplicação, alongamento e indução de raízes foram submetidos à análise de regressão. Os dados obtidos para porcentagem de alongamento com concentrações reduzidas de BAP e CIN foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico MSTATC.



### 4.3 RESULTADOS DE DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Efeito do NaOCl na desinfestação de brotações juvenis de imbuia

A desinfestação de brotações de imbuia utilizando etanol 70% por 30 segundos, seguido de imersão em solução de 0,25% de hipoclorito de sódio (NaOCl) por dez minutos foi eficiente, apresentando elevada porcentagem de sobrevivência (95%). A concentração de NaOCl testada neste trabalho foi determinada a partir de experimentos já realizados por VICENTINI (1995) na desinfestação de brotações de imbuia.

Além da eficácia dos tratamentos na desinfestação eliminando os microorganismos e não causando morte ou danos às brotações, outros fatores que provavelmente contribuíram para obtenção de explantes livres de contaminação foi o fato das plantas matrizes terem sido mantidas em casa-de-vegetação e com irrigação das plantas diretamente no substrato. No entanto, a obtenção de culturas assépticas é uma das vantagens de utilizar a técnica de micropropagação na regeneração de plantas, principalmente de espécies lenhosas, as quais apresentam dificuldades no estabelecimento *in vitro*, quando utiliza-se material vegetal oriundo de plantas adultas, por apresentarem maior infestação de microorganismos como foi relatado por COUTO et al. (2004).

VICENTINI (1995) testando 0,5% de NaOCl na desinfestação de brotações de imbuia (*Ocotea porosa*) obteve 73,3% de sobrevivência de brotações porém, estas foram retiradas de plantas matrizes com dois anos de idade e regeneradas no campo. No entanto, neste trabalho foi testada uma concentração menor de NaOCl (0,25%) e as brotações foram obtidas de plantas mantidas em casa-de-vegetação. Com outras espécies da família Lauraceae como a canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) a concentração mais eficaz na desinfestação de brotações foi com 0,75% de NaOCl obtendo-se 72% de sobrevivência (VICENTINI, 1995). WANG et al. (1991) relataram dificuldades na desinfestação de Taiwan sassafrás (*Sassafras randaiense*) (Lauraceae) obtendo apenas 5,1% de sobrevivência utilizando etanol 75% e 0,5% de NaOCl.

#### 4.3.2 Efeito da BAP na multiplicação de brotações axilares de imbuia

A taxa média de multiplicação por brotação dos tratamentos com BAP foi baixa no cultivo inicial (Figura 1A). No primeiro e segundo subcultivo, ocorreu um aumento da taxa média de multiplicação, que foi proporcional ao aumento da concentração de BAP (Figura 1B e 1C).

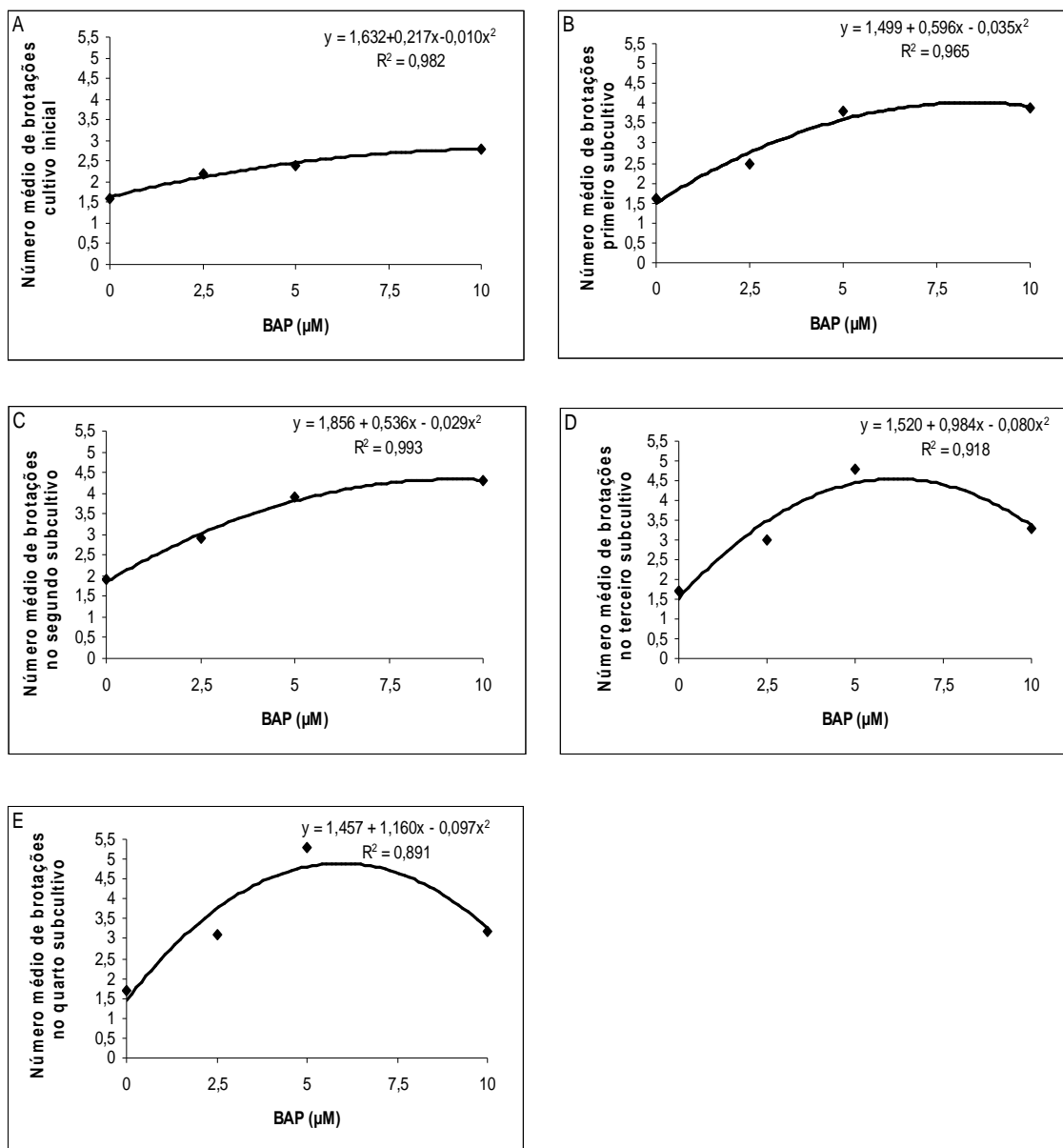


FIGURA 1 – Número médio de brotações de imbuia (*Ocotea porosa*) cultivadas em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP.

No terceiro e quarto subcultivo, a taxa média de multiplicação aumentou até a concentração de 5  $\mu\text{M}$ , ocorrendo um decréscimo com 10  $\mu\text{M}$  de BAP (Figura 1D, 1E; Figura 13E-F). Também pode ser observado que no terceiro subcultivo a maior concentração de BAP (10  $\mu\text{M}$ ) ocasionou maior necrose das brotações (21,2%) e conseqüentemente no quarto subcultivo a taxa média de multiplicação também reduziu (Figura 1D e 1E).

Em contraste com os resultados apresentados, a taxa média de multiplicação obtida por VICENTINI (1995) foi de 2,4 brotações por explante, em meio de cultura MS suplementado com 3,23  $\mu\text{M}$  de BAP. Em ambos os trabalhos foram utilizadas brotações apicais como explantes iniciais. No entanto, a idade das plantas matrizes doadoras de explantes foi diferente. VICENTINI (1995) coletou brotações apicais de plantas matrizes oriundas do campo e com cerca de dois anos de idade, enquanto que no presente trabalho, as brotações apicais foram obtidas de plantas matrizes com cerca de um ano de idade e germinadas em casa-de-vegetação.

Verificou-se neste experimento que a utilização de citocininas foi favorável na proliferação de gemas axilares, porém, quando concentrações mais elevadas de BAP (10  $\mu\text{M}$  de BAP) foram acrescentadas no meio de cultura foi observado o desenvolvimento de calo na base dos explantes. A formação de calo também foi constatada por BORGES-JUNIOR et al. (2004) na multiplicação de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) com adição de 9,69  $\mu\text{M}$  de BAP no meio de cultura.

No presente trabalho, o aumento da concentração de BAP até 5  $\mu\text{M}$  foi eficiente na proliferação de gemas axilares. Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies. MANTOVANI et al. (1999) constataram que o aumento da concentração de BAP até 3,23  $\mu\text{M}$  no meio de cultura, proporcionou melhores respostas na indução das brotações de caixeta (*Didymopanax morototoni*). ZANIOLO e ZANETTE (2002) também obtiveram maior número de brotações por explante de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (3,75) com concentrações mais elevadas de BAP (8,87  $\mu\text{M}$ ). O aumento do número de brotações também foi observado na multiplicação de acácia-negra com até 6,46  $\mu\text{M}$  BAP (BORGES-JUNIOR et al., 2004).

Segundo THORPE et al. (1991) o número de brotações produzidas por explante é limitante devido ao número de gemas axilares presentes. No entanto, neste experimento pode-se observar que o número de brotações iniciais

regeneradas foi baixo no cultivo inicial, obtendo no máximo 2,8 brotações com 10  $\mu\text{M}$  de BAP, apresentando um aumento durante os subcultivos e chegando a 5,3 brotações com 5  $\mu\text{M}$  de BAP no quarto subcultivo.

Neste experimento o meio de cultura MS acrescido com BAP, proporcionou até 5 brotações por explante no quarto subcultivo, sendo que este valor pode ser considerado satisfatório para multiplicação de espécies lenhosas. Desta forma, a citocinina testada foi importante na quebra da dominância apical, na indução e desenvolvimento de brotações axilares como foi relatado por PREECE (1995). A escolha da BAP para multiplicação de brotações axilares de imbuia foi devido ao custo mais baixo em relação às demais citocininas e também por este regulador vegetal em geral, apresentar melhores resultados *in vitro* em promover a multiplicação de diversas espécies, como para peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) (RIBAS et al., 2005), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (ZANIOLO e ZANETTE, 2002), louro-pardo (*Cordia trichotoma*) (MANTOVANI et al., 2001) e acácia-negra (*Acacia mearnsii*) (BORGES-JUNIOR et al., 2004).

Neste trabalho, constatou-se que o aumento do número de subcultivos proporcionou um aumento do número médio de brotações. Resultados semelhantes foram obtidos para erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (ZANIOLO e ZANETTE, 2002) e para *Vaccinium macrocarpon* (DEBNATH e McRAE, 2001). O aumento do número de brotações em relação ao aumento do número de subcultivos pode ser explicado pelo fato dos sucessivos subcultivos promoverem o rejuvenescimento das brotações *in vitro*. Segundo WENDLING e XAVIER (2001), a micropropagação é considerada uma técnica que permite o rejuvenescimento do material vegetal, por fazer com que a planta passe de um estado maduro para o juvenil retomando o vigor de crescimento e a capacidade de enraizamento.

Neste experimento a perda de vigor das brotações provavelmente ocorreu por não haver um balanço ideal na concentração de nutrientes disponíveis para a planta ou devido à concentração BAP ser mais elevada meio de cultura. Além disso, outro fator que pode causar morte na cultura ou inibir o crescimento das brotações são os compostos fenólicos liberados pelos próprios explantes, como foi citado por SATO et al. (2001). Segundo ANDRADE et al. (2000) os produtos da oxidação podem modificar a composição do meio de cultura. No entanto, neste experimento não houve uma relação entre a liberação de compostos fenólicos no meio de cultura com a morte das brotações.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foi observado por ROCHA (2005) na multiplicação de canjarana, em que a adição de concentrações mais elevadas de BAP (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) no meio de cultura causou fitotoxicidade das brotações, porém isso foi observado nos primeiros subcultivos, enquanto que neste trabalho a necrose e a perda de vigor das brotações ocorreu no terceiro subcultivo. Com mogno, SCHOTTZ (2003) também observou fitotoxicidade das brotações, com elevada taxa de mortalidade, porém, utilizando concentração mais elevada de BAP (50  $\mu\text{M}$ ) quando comparada à deste trabalho.

Em relação ao comprimento médio das brotações axilares regeneradas *in vitro*, observou-se pouca variação entre os tratamentos testados. No cultivo inicial, o aumento da concentração de BAP até 5  $\mu\text{M}$  apresentou um acréscimo no comprimento médio das brotações axilares, enquanto que o aumento da concentração de BAP para 10  $\mu\text{M}$ , induziu uma redução do comprimento das brotações axilares (Figura 2A).

No primeiro subcultivo o comprimento médio das brotações axilares foi praticamente constante em todas as concentrações de BAP testadas no meio de cultura, obtendo brotações com até 1 cm de comprimento (Figura 2B). Na figura 2C, pode-se observar uma redução no comprimento médio das brotações axilares com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura.

No terceiro e quarto subcultivo observou-se aumento no comprimento médio das brotações axilares com o aumento da concentração de BAP até 5  $\mu\text{M}$ . No entanto, pode-se observar uma redução no comprimento médio das brotações axilares com o aumento da concentração de BAP (10  $\mu\text{M}$ ) (Figura 2D e 2E).

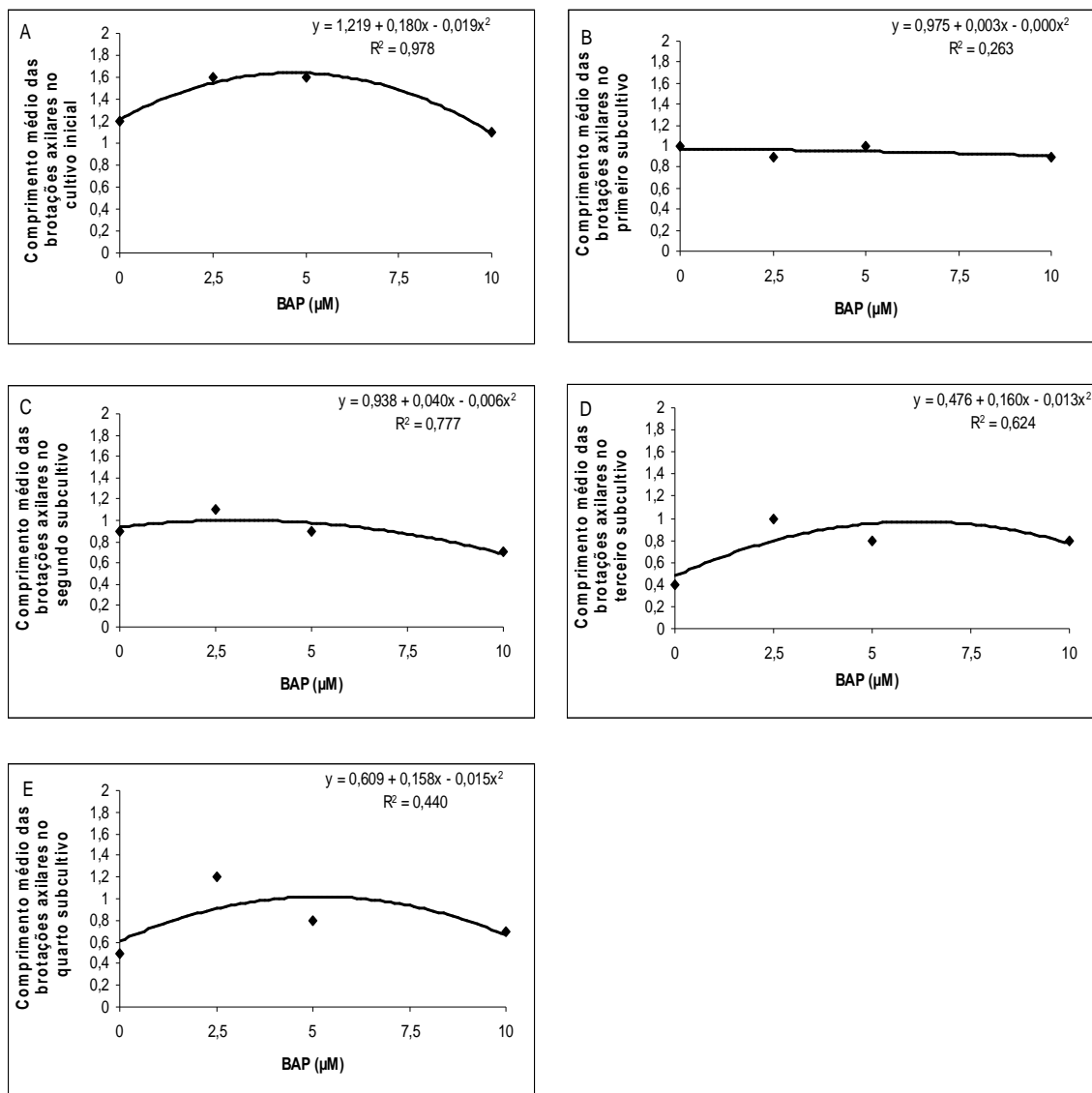


FIGURA 2 – Comprimento médio de brotações axilares de imbuia (*Ocotea porosa*) cultivadas em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP.

Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, VICENTINI (1995) obteve brotações de imbuia com até 4,3 cm de comprimento em meio de cultura MS acrescido com 3,23 µM de BAP. Na multiplicação de canjarana, ROCHA (2005) obteve brotações com comprimento inferior a 1 cm, e estas apresentaram pouca alteração em relação ao comprimento no decorrer dos subcultivos, o que pode ser observado no presente trabalho onde o comprimento médio das brotações axilares também apresentou pouca variação.

Nas Figuras 3A e 3C, pode ser observado que as maiores concentrações de BAP induziram um aumento na porcentagem de alongamento das brotações. No segundo subcultivo observou-se que houve aumento da porcentagem de alongamento das brotações com o aumento da concentração de BAP até 5  $\mu\text{M}$ . Enquanto que com 10  $\mu\text{M}$  de BAP no meio de cultura indicou tendência de reduzir o alongamento das brotações (Figura 3B e 3D).

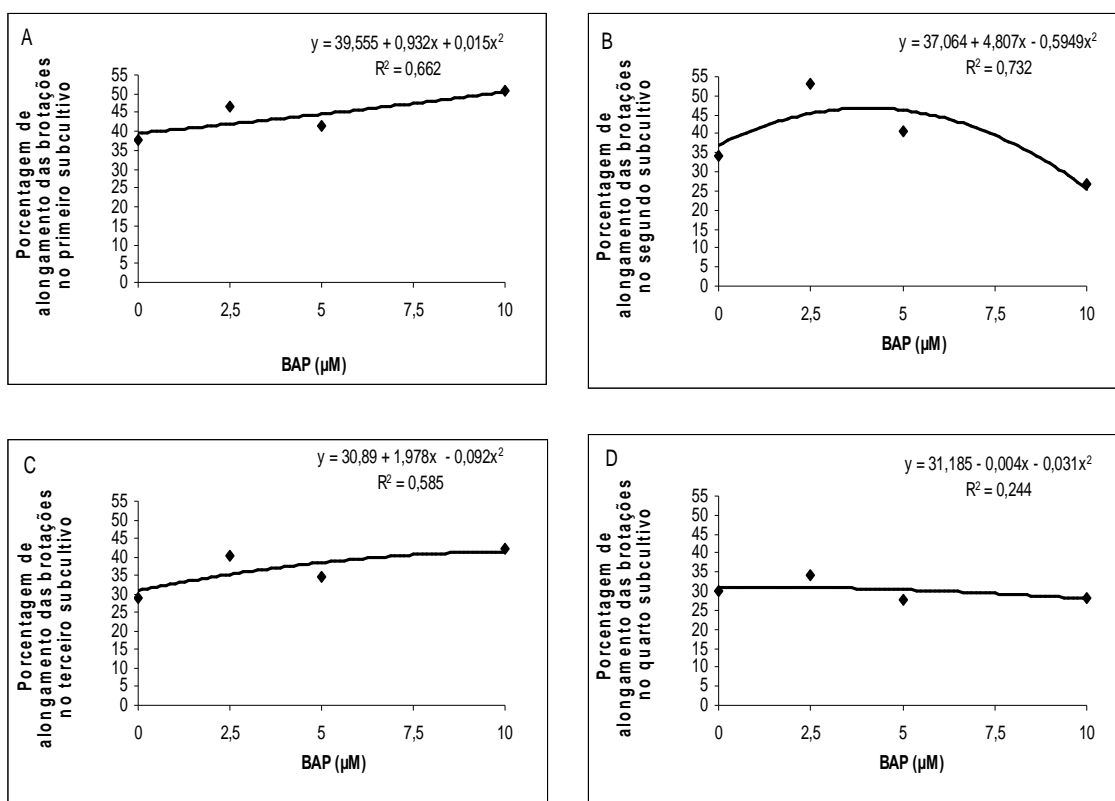


FIGURA 3 – Porcentagem de alongamento das brotações de imbuia (*Ocotea porosa*) cultivadas em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP.

#### 4.3.3 Efeito da combinação de BAP e CIN na multiplicação de brotações axilares de imbuia

No experimento de indução de brotações múltiplas em meio de cultura com BAP e CIN combinadas, observou-se que no cultivo inicial a taxa média de multiplicação aumentou até a concentração combinada de 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de CIN sendo que, a taxa máxima de multiplicação foi de 2,3 brotações por explante (Figura 4A).

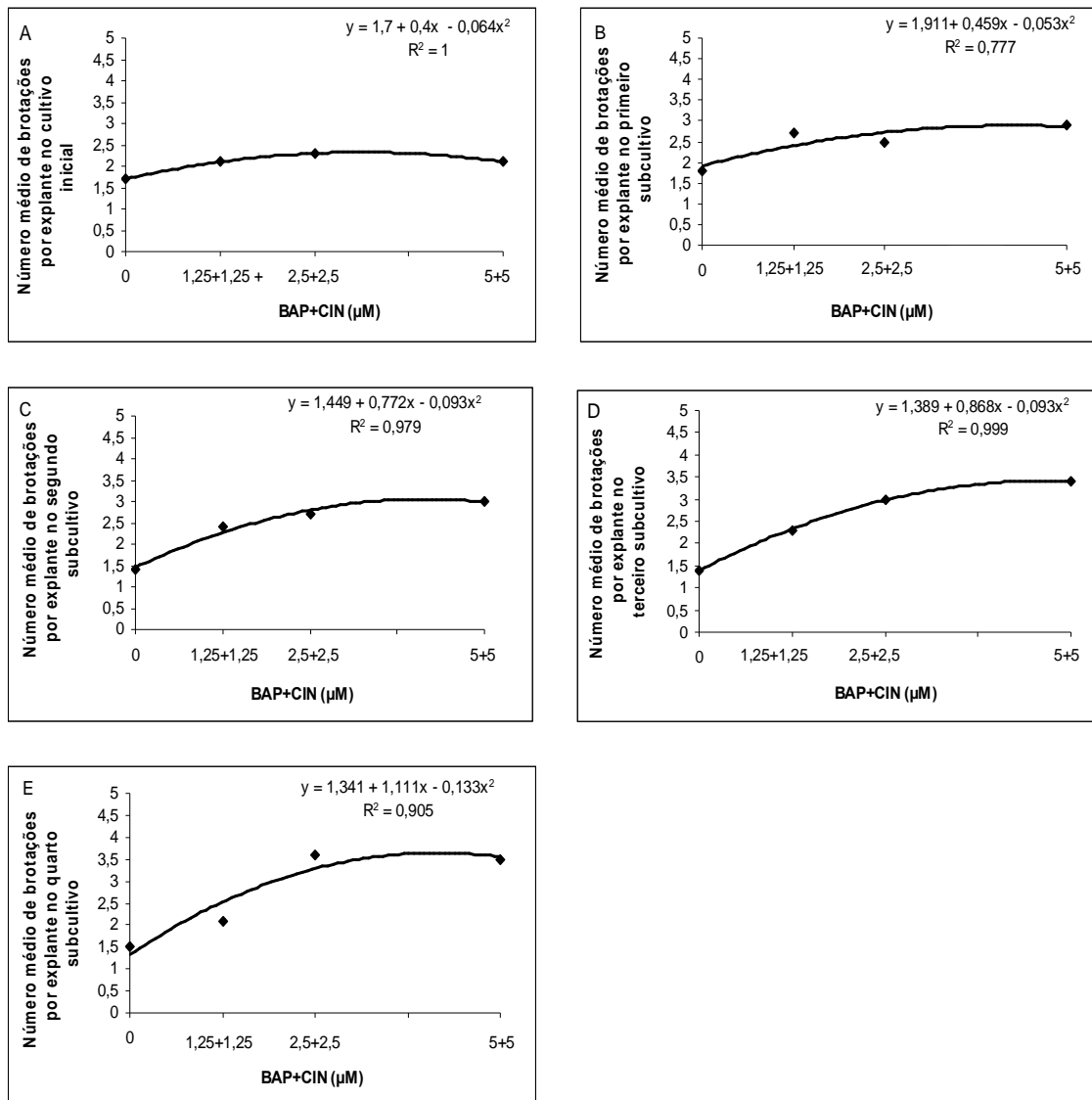


FIGURA 4 – Número médio de brotações de imbuia (*Ocotea porosa*) cultivadas em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e CIN combinadas.

No primeiro subcultivo a taxa média de multiplicação foi maior do que a do cultivo inicial, a qual apresentou tendência de aumento com as maiores concentrações de BAP e CIN (Figura 4B). Também pode ser observado aumento na taxa média de multiplicação no segundo, terceiro e quarto subcultivo, a qual foi proporcional ao aumento das concentrações de BAP e CIN combinadas e também ao número de subcultivos (Figura 4C, 4D e 4E; Figura 13H-J).

Neste experimento o aumento do número de subcultivos e a maior combinação de reguladores (2,5 μM de BAP e 2,5 μM CIN) proporcionou a maior



taxa média de multiplicação (3,6 brotações). No entanto, esse resultado foi inferior a do experimento anterior com 5  $\mu$ M de BAP em que foi possível obter 5,3 brotações por explante. De uma forma geral, o uso das citocininas isoladas ou combinadas no meio de cultura promoveu a quebra de dominância apical favorecendo a indução e o desenvolvimento das brotações axilares. Quando comparado à taxa média de multiplicação com meio de cultura sem BAP e CIN combinadas foi obtido 1,8 brotações, enquanto que com o meio de cultura suplementado com as combinações das citocininas promoveu até 3,6 brotações. Porém, quando a BAP foi testada isolada, a taxa média de multiplicação foi maior (5,3 brotações) do que quando combinada com cinetina.

Conforme relatado para algumas espécies como *Cercis canadensis* (MACKAY et al., 1995) e *Morus australis* (PATTNAIK et al., 1996) a cinetina promoveu a regeneração de 2 a 3 brotações e em algumas espécies ela pode induzir apenas o alongamento das brotações. No entanto, neste experimento a CIN foi testada em combinação com BAP a fim de obter brotações axilares mais longas. Porém, essa combinação de citocininas promoveu no máximo 3,6 brotações e não foi eficaz em promover brotações mais longas durante a etapa de multiplicação (Tabela 5).

Pode-se observar que houve aumento no comprimento médio das brotações axilares até a concentração de 2,5  $\mu$ M BAP e CIN combinadas, tanto no cultivo inicial quanto no primeiro, segundo e quarto subcultivo. O aumento da combinação de BAP e CIN para 5  $\mu$ M, indicou que houve uma redução no comprimento médio das brotações (Figura 5A, 5B, 5C e 5E).

No terceiro subcultivo, o comprimento médio das brotações axilares foi praticamente constante em todas as combinações testadas (Figura 5D). Com BAP e CIN combinadas de uma forma geral, ocorreu um declínio no comprimento das brotações com o aumento dos subcultivos.

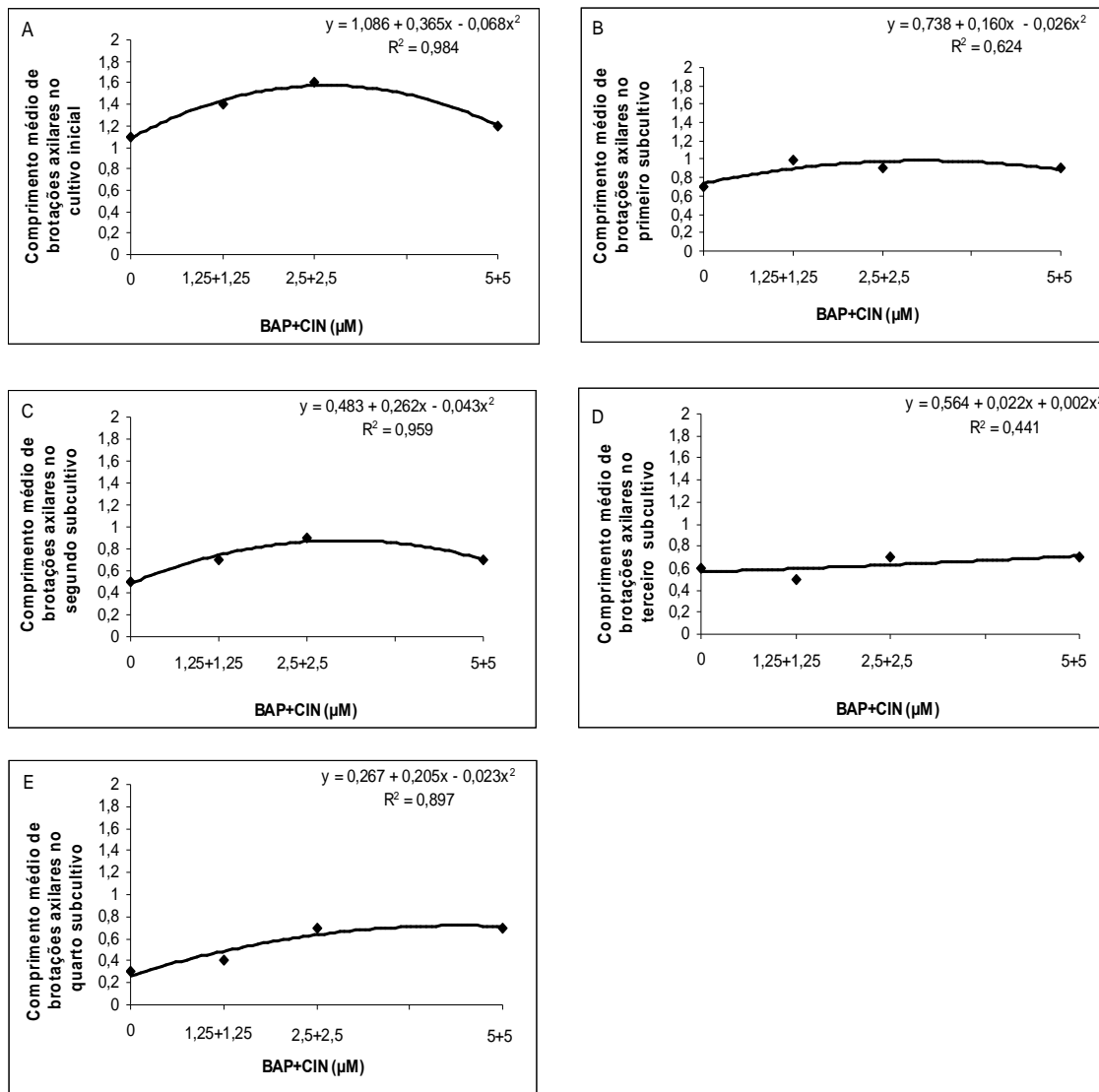


FIGURA 5 – Comprimento médio das brotações axilares de imbuia (*Ocotea porosa*) cultivadas em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e CIN combinadas.

Para a porcentagem de alongamento das brotações, no cultivo inicial as brotações não alongaram. No primeiro, terceiro e quarto subcultivo, observou-se que a relação entre porcentagem de alongamento das brotações e as combinações de BAP e CIN apresentou tendência de diminuir a porcentagem de alongamento com o aumento das concentrações dos reguladores vegetais (Figura 6A, C e D).

No segundo subcultivo, as combinações de BAP e CIN, apresentaram tendência de reduzir a porcentagem de alongamento das brotações com o aumento das concentrações combinadas de BAP e CIN até 2,5+2,5 μM, enquanto que com a

combinação de 5 µM de BAP e CIN houve uma pequena tendência de aumento do alongamento das brotações (Figura 6B).

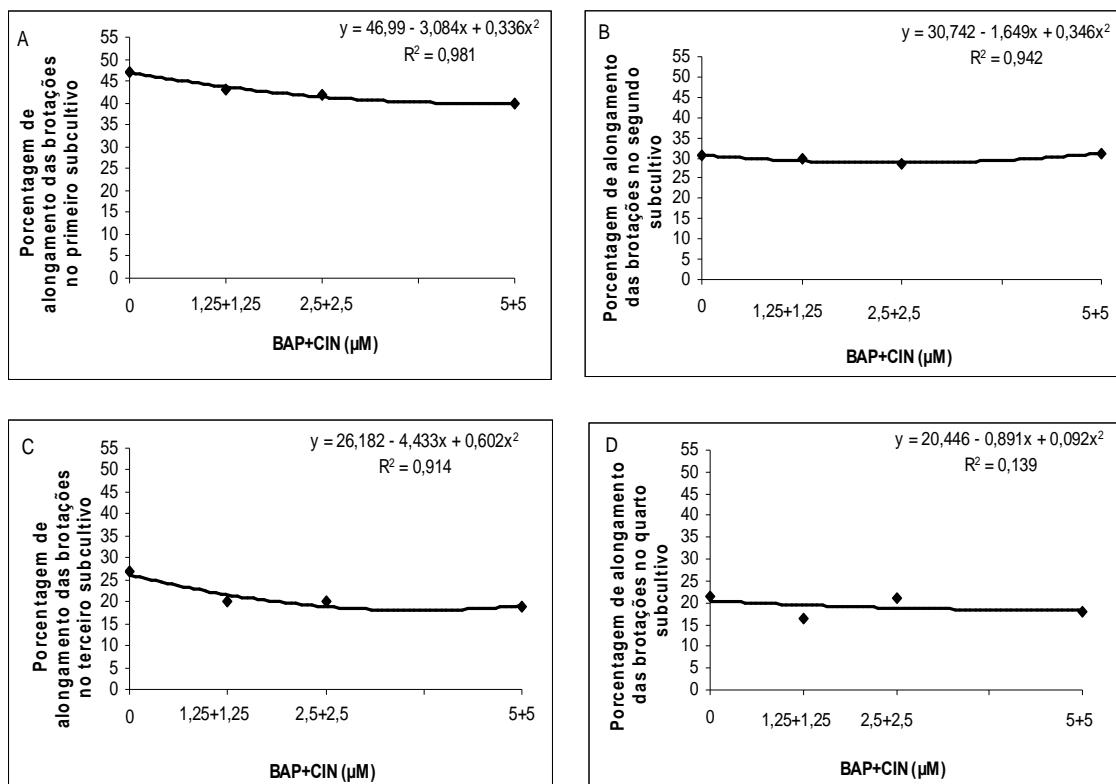


FIGURA 6 – Porcentagem de alongamento das brotações de imbuia (*Ocotea porosa*) cultivadas em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e CIN combinadas.

#### 4.3.4 Efeito de concentrações reduzidas de BAP ou de CIN no alongamento de brotações de imbuia

A análise de variância (Anexo 4) não foi significativa para o alongamento das brotações de imbuia testando concentrações reduzidas de BAP ou CIN. Apesar dos resultados não terem sido significativos para a utilização de concentrações reduzidas de BAP ou CIN, pode-se observar que o tratamento que mais se destacou foi com 1 µM de BAP, o qual possibilitou 79,3% de incremento no alongamento das brotações (Tabela 4; Figura 13k).

TABELA 4 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE BAP OU CIN EM MEIO DE CULTURA MS NO ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES DE IMBUIA, APÓS SEIS SEMANAS DE CULTIVO.

Tratamentos	Alongamento (%)
0 $\mu\text{M}$	47,9 a
0,5 $\mu\text{M}$ de BAP	59,7 a
1,0 $\mu\text{M}$ de BAP	79,3 a
1,5 $\mu\text{M}$ de BAP	61,8 a
0,5 $\mu\text{M}$ de CIN	25,9 a
1,0 $\mu\text{M}$ de CIN	42,8 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resultado semelhante ao deste trabalho foi obtido por VICENTINI (1995) com maior alongamento das brotações de imbuia, em meio de cultura suplementado com concentração reduzida de BAP (1,62  $\mu\text{M}$ ), enquanto que, com outra espécie da família Lauraceae, canela-sassáfras (*Ocotea odorífera*) a suplementação de concentrações reduzidas de BAP no meio de cultura não proporcionou nenhum incremento no alongamento para essa espécie. Com outra espécie florestal, sarandi (*Sebastiania schottiana*) o uso de 1,1  $\mu\text{M}$  de BAP, também foi eficaz no alongamento das brotações (DESCHAMPS, 1993).

Desta forma, para otimizar a multiplicação de imbuia e obter brotações mais alongadas para etapa de enraizamento, os explantes poderiam ser induzidos a formar brotações múltiplas em meio de cultura suplementado com 5  $\mu\text{M}$  de BAP e posteriormente estas seriam transferidas para meio de cultura com 1  $\mu\text{M}$  de BAP para promover o alongamento das brotações. HUETTEMAN e PREECE (1993) já haviam sugerido o cultivo dos explantes em um meio de cultura para induzir a regeneração das brotações, seguido de transferência para um meio de cultura secundário com concentrações reduzidas de regulador vegetal.

#### 4.3.5 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado no alongamento de brotações de imbuia

Com relação à adição de carvão ativado no meio de cultura de alongamento das brotações, pode-se observar que o aumento do alongamento das brotações foi proporcional ao aumento da concentração de carvão ativado até 2  $\text{gL}^{-1}$ , enquanto que no meio de cultura com 3  $\text{gL}^{-1}$  de carvão ativado ocorreu uma redução no alongamento das brotações (Figura 7). Além de apresentar um incremento no

alongamento das brotações, a adição de 2 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado proporcionou brotações com folhas maiores (Figura 13L).

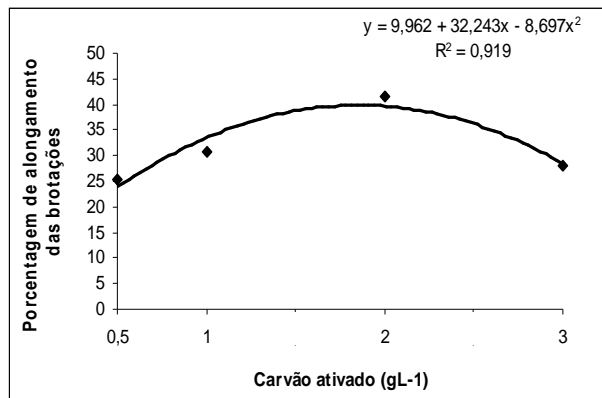


FIGURA 7 – Porcentagem de alongamento das brotações de imbuia (*Ocotea porosa*) cultivadas em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de carvão ativado.

Resultado semelhante ao deste trabalho foi observado por MANTOVANI et al. (1999) no alongamento de caixeta (*Didymopanax morototoni*) em que o carvão ativado, apresentou brotações com folhas verdes e grandes além de caules mais alongados. Segundo PAN e VAN-STADEN (1998) o efeito do carvão ativado no meio de cultura, deve-se a adsorção do excesso de reguladores vegetais e também de compostos fenólicos liberados pelos explantes no meio de cultura. Ao contrário do que foi observado neste experimento, VICENTINI (1995) constatou efeito negativo do carvão ativado no alongamento das brotações de imbuia.

#### 4.3.6 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura WPM/2

A indução de raízes em meio de cultura WPM/2 indicou aumento da porcentagem de enraizamento, a qual foi proporcional ao aumento da concentração de AIB até 2,5 µM. No entanto, com 5 µM, houve uma redução da porcentagem de brotações enraizadas (Figura 8A).

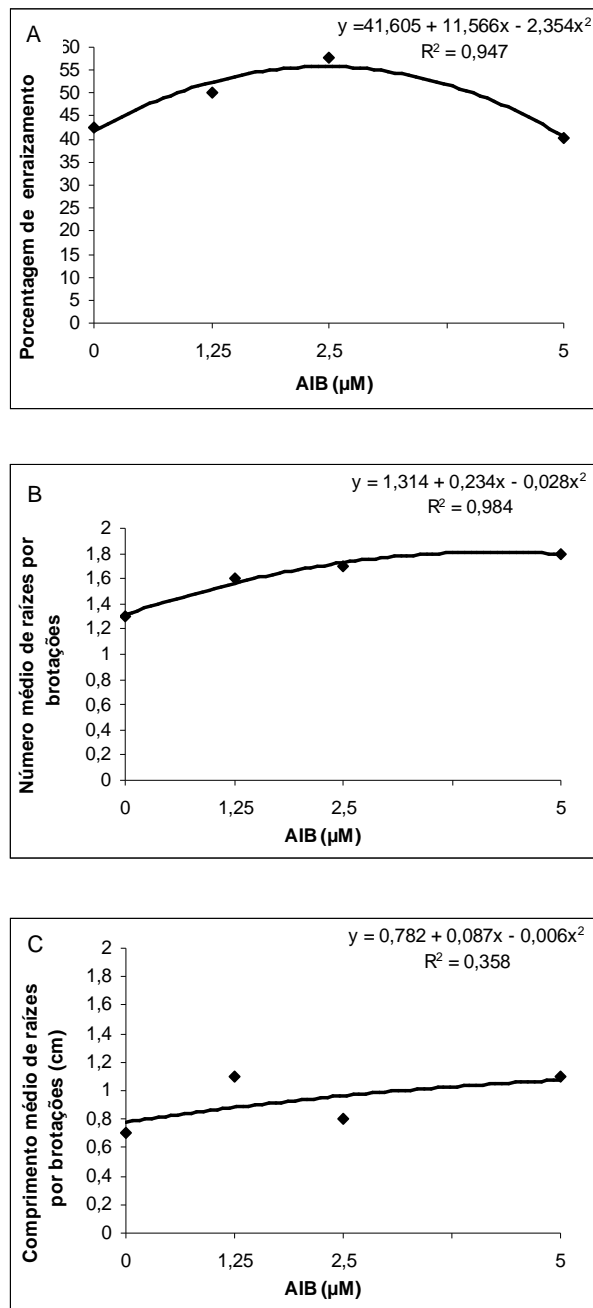


FIGURA 8 – Indução de enraizamento, número médio e comprimento médio das raízes de imbuia (*Ocotea porosa*) em meio de cultura WPM/2, suplementado com diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB), durante sete dias, seguido de transferência para meio de cultura sem auxina.

Nas Figuras 8B e 8C, pode-se observar que houve aumento do número médio e comprimento médio das raízes, os quais foram proporcionais ao aumento da concentração de AIB (Figura 14A e 14B).

No enraizamento de canjarana, ROCHA (2005) obteve uma porcentagem bem inferior a da imbuia, com apenas 18% das brotações enraizadas em meio de cultura WPM, acrescido de 2,5  $\mu\text{M}$  de AIB.

As espécies lenhosas são mais difíceis de enraizar quando comparadas com as herbáceas. Essa dificuldade de enraizamento pode ser em parte resolvida no processo da micropropagação pelas contínuas subculturas que promovem o rejuvenescimento dos tecidos, o que aumenta a capacidade de enraizamento (McCown, 1988; PASQUAL, 2001).

#### 4.3.7 Experimento de indução e desenvolvimento de raízes em meio de cultura MS/2

O enraizamento de brotações de imbuia foi testado primeiramente em meio de cultura MS/2 com AIB (0; 1,25; 2,5 ou 5  $\mu\text{M}$ ) mantendo as brotações no meio de cultura com a auxina durante quatro semanas. No entanto, observou-se que o enraizamento desta espécie em apenas uma fase não foi eficiente, obtendo-se uma porcentagem máxima de 30% das brotações enraizadas com 2,5  $\mu\text{M}$  de AIB (dados não mostrados). Desta forma, verificou-se a necessidade de enraizamento de brotações de imbuia em duas fases; com a indução de raízes em meio de cultura com auxina por sete dias na ausência de luz, seguido de transferência para meio de cultura sem auxina para o desenvolvimento das raízes.

A indução de raízes em meio de cultura com AIB durante sete dias, indicou que o aumento da porcentagem de brotações enraizadas foi proporcional ao aumento da concentração de AIB no meio de cultura, com 68,7% de enraizamento com 10  $\mu\text{M}$  de AIB (Figura 9A).

Para o número médio de raízes observou-se que houve tendência de aumento do número médio de raízes com o aumento da concentração de AIB até 5  $\mu\text{M}$  e, conseqüentemente com 10  $\mu\text{M}$  de AIB ocorreu um decréscimo do número médio de raízes (Figura 9B). Comportamento semelhante foi observado para o comprimento médio das raízes, com tendência de aumento do comprimento médio das raízes com o aumento da concentração de AIB (Figura 9C).

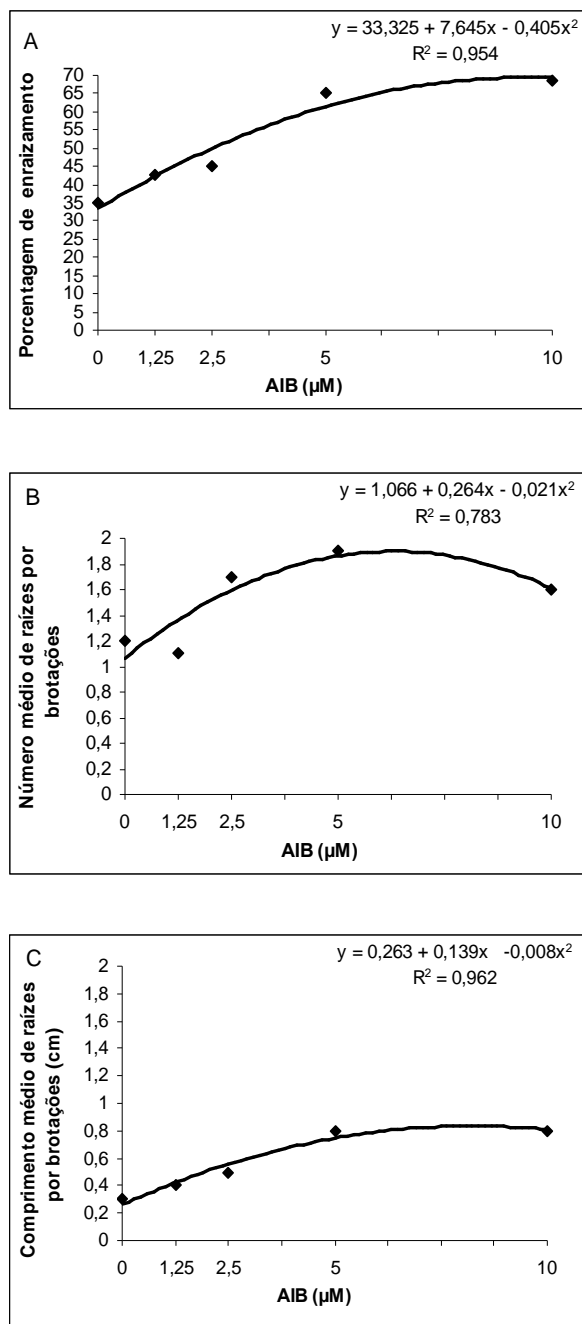


FIGURA 9 – Indução do enraizamento, número médio e comprimento médio das raízes de imbuia (*Ocotea porosa*) em meio de cultura MS/2, suplementado com diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB), por sete dias, seguido de transferência pra meio de cultura sem auxina.

No presente trabalho foi obtido resultado semelhante ao encontrado por VICENTINI (1995) com 64% das brotações de imbuia enraizadas em meio de cultura MS/2 com 2,46 μM de AIB. Embora as porcentagens de enraizamento tenham sido



similares em ambos os trabalhos, provavelmente VICENTINI (1995) obteve uma maior porcentagem de enraizamento em meio de cultura com uma concentração menor de AIB devido a avaliação ter sido realizada com aproximadamente seis semanas de cultivo, entretanto, neste trabalho as avaliações foram realizadas com quatro semanas de cultivo. Para outra espécie lenhosa florestal, o mogno (*Swietenia macrophylla*) LOPES et al. (2001) obtiveram uma porcentagem máxima de 20% de enraizamento com 4,9  $\mu$ M de AIB, com isso, indicando que diferentes espécies respondem de forma diferente a um mesmo tipo de regulador vegetal.

#### 4.3.8 Efeito do tratamento pulso com AIB na indução e desenvolvimento de raízes de imbuia

A indução de raízes com tratamento pulso durante 10 minutos, indicou que houve aumento da porcentagem de enraizamento, a qual foi proporcional ao aumento das concentrações de AIB (Figura 10A). Na Figura 10A, pode-se observar que a indução de raízes em brotações de imbuia na ausência de AIB foi baixa (15,3%) e de certa forma, isso mostra que a auxina foi essencial para indução de raízes desta espécie.

Comportamento semelhante ao encontrado para a porcentagem de indução de raízes foi obtido para o número médio de raízes. No entanto, verificou-se que o tratamento pulso com 10 mM de AIB gerou um número médio de 2 raízes por brotação (Figura 10B). Resultados semelhantes ao deste trabalho foram obtidos por RIBAS et al. (2005) que constataram uma maior porcentagem de brotações de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) enraizadas (80%), utilizando tratamento pulso de imersão da base das brotações em solução de 10 mM de AIB por 15 minutos.

Em relação ao comprimento médio das raízes, com o aumento do tratamento pulso de AIB (10 mM) ocorreu um decréscimo no comprimento médio das raízes (Figura 10C).

A indução de raízes adventícias por meio de tratamento pulso pode ser uma alternativa para otimizar o enraizamento dessa espécie. No entanto, seria necessário testar um tempo maior de permanência das brotações em solução com auxina (durante 15 minutos) para aumentar a porcentagem de enraizamento como ocorreu com a peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*).

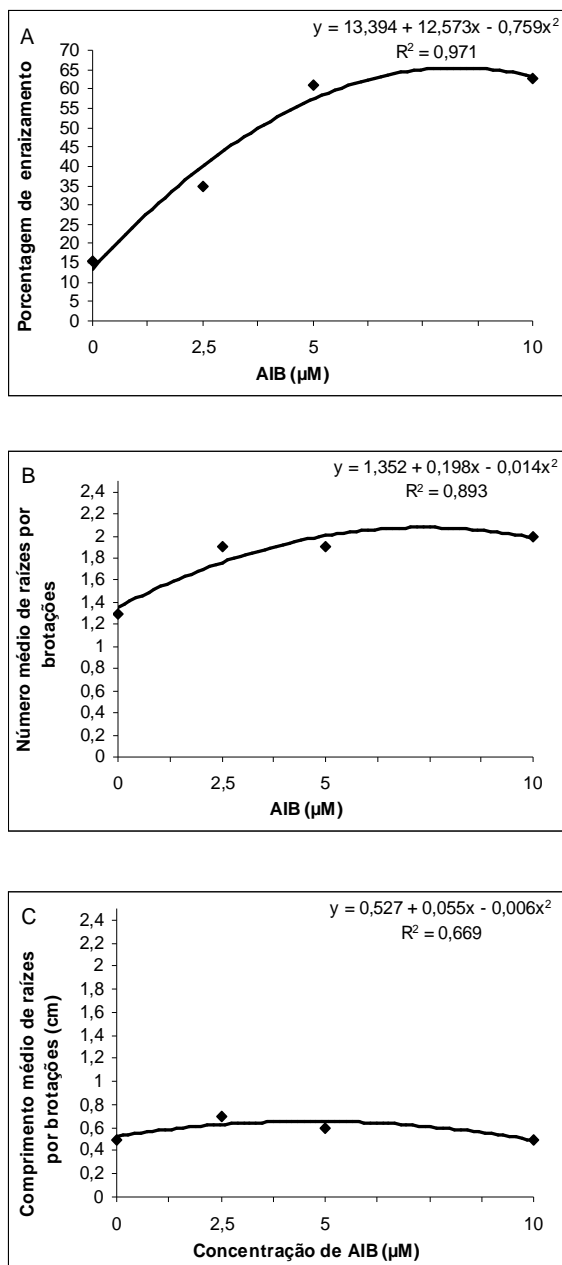


FIGURA 10 – Indução do enraizamento, número médio e comprimento médio das raízes de imbuia (*Ocotea porosa*) com diferentes tratamentos em solução de ácido indol-3-butírico (AIB), durante 10 minutos.

#### 4.3.9 Efeito do AIB na indução de raízes e no desenvolvimento de raízes de imbuia em meio de cultura com carvão ativado

Na indução de raízes, observou-se que houve aumento da porcentagem de enraizamento com o aumento da concentração até 5  $\mu\text{M}$  de AIB, enquanto que, o

aumento da concentração de AIB para 10  $\mu\text{M}$  houve tendência de reduzir a porcentagem de enraizamento (Figura 11A).

Nas Figuras 11B e 11C, pode-se observar que o aumento do número médio e do comprimento médio das raízes foi proporcional ao aumento da concentração de AIB no meio de cultura. No entanto, verificou-se que a indução de raízes em meio de cultura suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de AIB, seguido de meio de cultura com carvão ativado proporcionou a formação de raízes maiores medindo até 1,3 cm de comprimento (Figura 11C).

Ao contrário do que foi constatado neste experimento, ZANIOLO e ZANETTE (2002) obtiveram resultados positivos no enraizamento de brotações de erva-mate (86,2%) cultivando as brotações em meio com auxina por 12 dias, seguido de transferência para meio sem regulador vegetal acrescido com 1  $\text{gL}^{-1}$  de carvão ativado. No entanto, o período de permanência no meio de cultura com auxina foi maior que o da imbuia. A adição de carvão ativado também favoreceu o enraizamento de louro-pardo (*Cordia trichotoma*) (MANTOVANI et al., 2001) e da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana*) (DAL VESCO e GUERRA, 1999).

A baixa porcentagem de enraizamento provavelmente tenha ocorrido devido a adição de carvão ativado no meio de cultura de desenvolvimento das raízes, o qual pode ter adsorvido a auxina das brotações inibindo o enraizamento. Outro fator que pode ter contribuído para a baixa porcentagem de brotações enraizadas é o tempo de permanência das brotações em meio de cultura com auxina, necessitando de um período maior de indução para posterior transferência para meio de cultura com carvão ativado.

O carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% pode ser benéfico em alguns casos. Ele simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor pela redução da incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicial, além de adsorver substâncias tóxicas, principalmente fenóis e/ou quinonas que podem afetar o desenvolvimento do explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). No entanto, para a imbuia, a presença de carvão ativado no meio de cultura para o desenvolvimento das raízes não favoreceu o enraizamento, sendo necessário testar um tempo maior de permanência no meio de cultura com auxina, antes de transferir para o meio de cultura com carvão ativado.

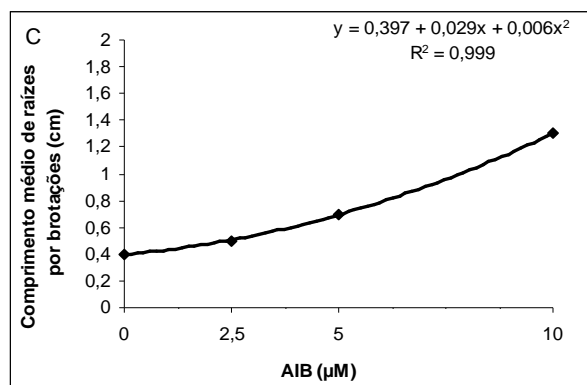
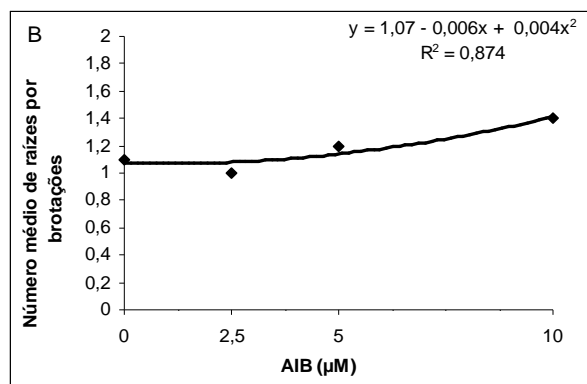
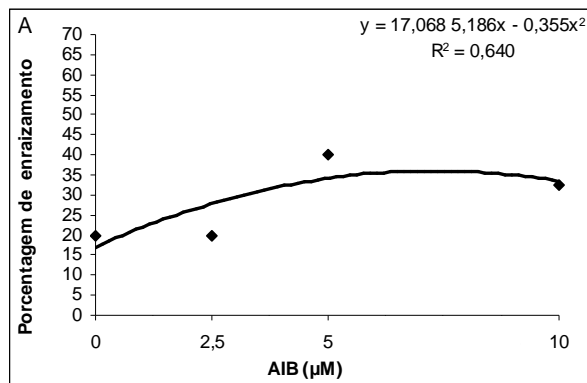


FIGURA 11 – Indução de enraizamento, número médio e comprimento médio das raízes de imbuia (*Ocotea porosa*) em meio de cultura MS/2, suplementado com diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) por 7 dias, seguido de transferência para meio de cultura com  $1 \text{ gL}^{-1}$  de carvão ativado.

#### 4.3.10 Transplântio e aclimatização de mudas de imbuia regeneradas *in vitro*

As mudas de imbuia transplantadas para casa-de-vegetação, não apresentaram nenhuma alteração morfológica nas duas primeiras semanas de

aclimatização. Após esse período grande parte das mudas apresentou necrose, sendo que, a pré-aclimatização em sala de crescimento antes do transplântio não foi suficiente para aumentar a porcentagem de sobrevivência (Figura 14D). No entanto, após quatro semanas de aclimatização a porcentagem máxima de sobrevivência foi de 56,7%, com o substrato Plantmax®+casca de arroz carbonizada (2:1) (Tabela 5; Figura 14C; 14E e 14F). Resultado semelhante ao deste trabalho foi obtido por TELLES e BIASI (2005) na aclimatização de *Diospyrus kaki*, espécie que também apresenta problema de oxidação fenólica, sendo obtida uma porcentagem de sobrevivência inferior a 50%.

TABELA 5 - PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE IMBUÍIA REGENERADAS *IN VITRO* E TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS MANTIDAS EM CASA-DE-VEGETAÇÃO CLIMATIZADA APÓS QUATRO SEMANAS.

Tipo de Substrato	Nº. de Plantas	Sobrevivência (%)
Plantmax®*	24	25,0
Plantmax® + carvão vegetal* (3:1)	24	41,7
Plantmax® + casca de arroz carbonizada** (2:1)	30	56,7
Plantmax® + casca de arroz carbonizada + terra peneirada** (2:1:1)	30	53,3

\*Plantas oriundas de meio de cultura sem carvão ativado; \*\*Plantas oriundas do meio de cultura MS/2, suplementado com 1 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Embora não tenha sido avaliado o crescimento das mudas durante a fase de aclimatização, visualmente estas apresentaram um crescimento inicial lento. No entanto, devem ser levadas em consideração as condições de transplântio assim como, o estado funcional das raízes formadas *in vitro*, pois segundo DEBERGH e MAENE (1981) as raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais, por não apresentarem pelos radiculares, além de propiciarem uma conexão vascular deficiente com a parte aérea das plantas, o que resulta numa restrita transferência de água e nutrientes para a parte aérea.

Outro fator que pode ter contribuído para baixa porcentagem de sobrevivência das mudas pode estar relacionado com o tempo de permanência das brotações enraizadas no meio de cultura, pois quando cultivadas por muito tempo em meio de cultura, este pode proporcionar um rápido envelhecimento das raízes, tornando-as menos funcionais podendo prejudicar a sobrevivência das plantas em casa-de-vegetação como foi citado por PEREIRA e FORTES (2001).

O substrato tem fundamental importância no crescimento e no desenvolvimento das plantas e dificilmente em um único substrato são encontradas todas as características que favoreçam o desenvolvimento da planta como foi citado por KÄMPF (2000). No entanto, neste trabalho a maior porcentagem de mudas sobreviventes foi obtida com a mistura de Plantmax<sup>®</sup> + casca de arroz carbonizada. Segundo NETO et al. (1999) e HOFFMANN et al. (2001) o substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> apresenta vantagem pela uniformidade química e física. Enquanto que a casca de arroz carbonizada é considerada um bom substrato por permitir uma melhor aeração do sistema radicial, maior drenagem e aumentar a porosidade (SOUZA, 1993; COUTO et al., 2003) e também por seu baixo custo e grande disponibilidade (MEDEIROS, 1998). Desta forma, a casca de arroz carbonizada é um importante aliado em promover melhor estruturação física do substrato (COUTO et al., 2003).

A transferência das mudas para condições *ex vitro* provoca um estresse hídrico e desta forma, a aclimatização das mudas com alta umidade e temperatura controlada se torna imprescindível. A perda excessiva de água pelas mudas produzidas *in vitro*, que ocorre nas primeiras horas após o transplante, é apontada como um dos principais fatores envolvidos na aclimatização (HOFFMANN, 2002). Pré-tratamentos visando diminuir a umidade relativa no interior dos frascos de cultivo podem ser aplicados para aumentar a sobrevivência (JOHANSSON et al., 1992), contribuindo para a formação de uma cutícula mais espessa, diminuindo a evaporação quando as plantas são transferidas para o ambiente *ex vitro* (WARDLE et al., 1983). No entanto, a pré-aclimatização em sala de crescimento por um período de 48 horas e mesmo assim não foi suficiente para aumentar a taxa de sobrevivência das mudas.

No presente trabalho as maiores porcentagens de sobrevivência foi oriundas do meio de cultura com carvão ativado ( $1 \text{ gL}^{-1}$ ) (Tabela 5). Para *Caryocar brasiliense* (pequizeiro) SANTOS et al. (2006) observaram resultados similares, onde as plantas provenientes do cultivo *in vitro* em meio acrescido de  $4 \text{ gL}^{-1}$  de carvão ativado apresentaram, no final da aclimatização, maiores porcentagens de plantas vivas em relação às plantas provenientes do meio de cultivo com ausência de carvão ativado. Resultados positivos também foram obtidos na aclimatização de *Salix humboldtiana* (SANTOS, 2001) e *Annona glabra* (SANTANA, 2003) com alto índice de sobrevivência das plantas enraizadas em meio de cultura com carvão ativado.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Foi estabelecido um protocolo de micropropagação de mudas de imbuia (Figura 15).

A taxa de multiplicação aumentou com o número de subcultivos, sendo maior após o quarto subcultivo, obtendo-se 5,3 brotações por explante em meio de cultura MS, acrescido com 5  $\mu$ M de BAP.

As combinações de BAP e CIN foram inferiores a BAP na multiplicação de imbuia.

O alongamento das brotações foi maior em meio de cultura MS, suplementado com 1  $\mu$ M de BAP.

O enraizamento da imbuia pode ser realizado em duas etapas em meio de cultura MS/2 de indução com 5  $\mu$ M de AIB durante 7 dias, seguido de transferência para meio de cultura sem regulador vegetal.

O uso de Plantmax<sup>®</sup> e casca de arroz carbonizada (2:1) podem ser recomendados como substrato para transplântio. Porém, necessita-se de mais estudos para aumentar a sobrevivência das mudas de imbuia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A germinação *in vitro* de embriões zigóticos de imbuia mostrou ser viável, pois permite acelerar a produção de mudas e superar as dificuldades de germinação *ex vitro*. A utilização dessa técnica permite a obtenção de explantes assépticos que podem ser utilizados na micropropagação, além das plântulas poderem ser utilizadas em projetos de reflorestamentos.

A multiplicação de brotações axilares de imbuia em meio de cultura MS, suplementada com 5  $\mu$ M de BAP foi eficaz. No entanto, a BAP não favoreceu o alongamento das brotações durante a multiplicação. Portanto, para otimizar a multiplicação seria interessante testar outras citocininas (2-iP, TDZ ou ZEA) ou combinação de citocininas para tentar obter brotações mais longas.

A indução de raízes foi mais eficiente com o tratamento de 5  $\mu$ M de AIB em meio de cultura MS/2, no entanto, seria interessante testar um período maior de indução de raízes (10 a 15 dias) no meio de cultura com auxina para tentar aumentar a porcentagem de enraizamento. Uma alternativa seria testar o enraizamento *ex vitro* com a indução de raízes em meio de cultura com auxina, seguido de transferência direta para o substrato.

As mudas micropropagadas de imbuia apresentaram dificuldades de aclimatização, devido à necrose das plantas após o transplante. Portanto, seria importante a realização de estudos fotoquímicos e anatômicos contribuindo para o estudo dessa espécie.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p.174-180, 2000.
- BERTAZZA, G.; BARALDI, R.; PREDIERI, S. Light effects on *in vitro* rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, p. 139-143, 1995.
- BORGES-JUNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; MARTINS-CODER, M. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 4, p. 493-498, 2004.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, v. 1, p. 87-132, 1998.
- CALDATO, S. L.; LONGHI, S. J.; FLOSS, P. A. Estrutura populacional de *Ocotea porosa* (Lauraceae) em uma floresta ombrófila mista, em Caçador (SC). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 89-101, 1999.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo, PR.: EMBRAPA FLORESTAS, v. 1, 2003, 1039 p.
- COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 633-642, 2004.
- COUTO, M.; WAGNER, A. J.; QUEZADA, A. C. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* Ehrh.) em casa-de-vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p.125-128, 2003.
- DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana*) Berg. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 60-64, 1999.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, 14:335-345; 1981.

DEBNATH, S.; McRAE, K. E. An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* AIT.) by axillary bud proliferation. **In Vitro Cellular & developmental Biology - Plant**, Largo, v. 37, p. 243-249, 2001.

DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa *in vivo* e *in vitro* de sarandi (*Sebastiania schottiana* Mull. Arg.), espécie florestal de mata ciliar.** 128 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Lavras, ESAL, 1993.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMOES, C. M. O., et al. (eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: Ed. UFRS, P. 101-21, 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture.** Part 1: The Technology, Great Britain: Exegetics Limited, 574 p, 1993.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture.** Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.2, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. . Micropropagação. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, p. 183-260, 1998.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture.** Dordrecht: Kluwer Academic, p. 539-560, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices.** 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUNM N. C. N. J.; FRÁGUAS, C. B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 462-467, 2001.

HOFFMANN, A. Aclimatização de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 21-24, 2002.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures: In: EVANS, D. A. et al., **Handbook of plant cell culture.** New York: MacMillian Publishing, v. 1, p. 177-227, 1983.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, p. 105-109, 1993.

INOUE, M. T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**, Curitiba, v.37, n.1, p. 55-61, 2007.

JOHANSSON, M.; KRONESTEDT-ROBARDS, E. C.; ROBARDS, A. W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v. 6, p. 165-176, 1992.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000, 254 p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Intern. Pl. Propag. Soc. Proceed.**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, v. 7, n. 1, p. 124 -128, 2001.

MACKAY, W. A.; TIPTON, J. L.; THOMPSON, G. A. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis Canadensis* var. *mexicana*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 43, p. 295-299, 1995.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; GUERRA, M. P.; HOPPE, J. M. Micropropagação de caixeta, (*Didymopanax morototoni*, (Albl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.

MANTOVANI, N. C.; 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.

McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.289-302.

MEDEIROS, C. A. B. Carbonização da casca de arroz para utilização em substratos destinados a produção de mudas. **Comunicado Técnico**, Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CPACT, n. 8, p.1, 1998.

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

NETO, A. A.; MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, P, T. G. Avaliação de substratos alternativos e tipos de adubação para a produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 270-280, 1999.

NETO, R. M. R.; WATZLAWICK, L. F.; CALDEIRA, M. V. W.; SCHOENENGER, E. R. Análise florística e estrutural de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, situado em Crúuva, RS – Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 29-37, 2002.

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

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.

PATTNAIK, S. K.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. Syn *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Report**, v. 15, p. 841-845, 1996.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 417-420, 2001.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1 n. 1, p. 26-37, 1995.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 29, n. 49, p. 517-524, 2005.

RIBEIRO, L. S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Multiplicação *in vitro* de brotações de varias cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.949-954, 2002.

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 85 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SAADAT, Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting the multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 251-260, 2002.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2003.

SANTOS, B. R. **Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em *Salix (Salix humboldtiana Willd.)***. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2001.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; DA SILVA, D. P. C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. O. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SCHOTTZ, E. S. **Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de material juvenil**. 56 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SILVA, J. A.; SALOMÃO, A. N.; GRIPP, A.; LEITE, E. J. Phytosociological survey in Brazil forest genetic reserve of Caçador. **Plant Ecology**, Dordrecht, n. 133, p. 1-11, 1997.

SOUZA, F. X. Casca de arroz carbonizada: um substrato para a propagação de plantas. **Revista Lavoura arrozeira**, CNPI/EMBRAPA, v. 46, n. 406, p. 11, 1993.

TELLES, C. A.; BIASI, L. A. Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa-de-vegetação do caquizeiro (*Dyospyrus kaki* L.) **Ciência e Agrotecnologica**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 481-484, 2005.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation: technology and application. **Dordrecht: Kluwer Academic**, 1991 p. 331-336.

VICENTINI, L. S. **Propagação vegetativa “in vitro” de imbuia (*Ocotea porosa* Nees) e sassafrás (*Ocotea odorifera* Vellozo)**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

WANG, P. J.; HU, C. Y. e CHEN, M. H. Taiwan sassafrás. In: BAJAJ, Y. P. S. Biotechnology in agriculture and forestry. **Springer-Verlag**, Berlin, 1991, p. 180-190.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal American Society Horticultural Science**, v. 108, p. 386-9, 1983.

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

ZANIOLO, S. R.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, v. 2, n. 27, 2002.

## FIGURAS



FIGURA 12 – *Ocotea porosa*. A) Aspecto geral da árvore; B) Frutos de imbuia coletados em Colombo; C) Sementes de imbuia; D) Plantas matrizes de imbuia; E) Brotações juvenis (explantes). Barra: 10 cm.

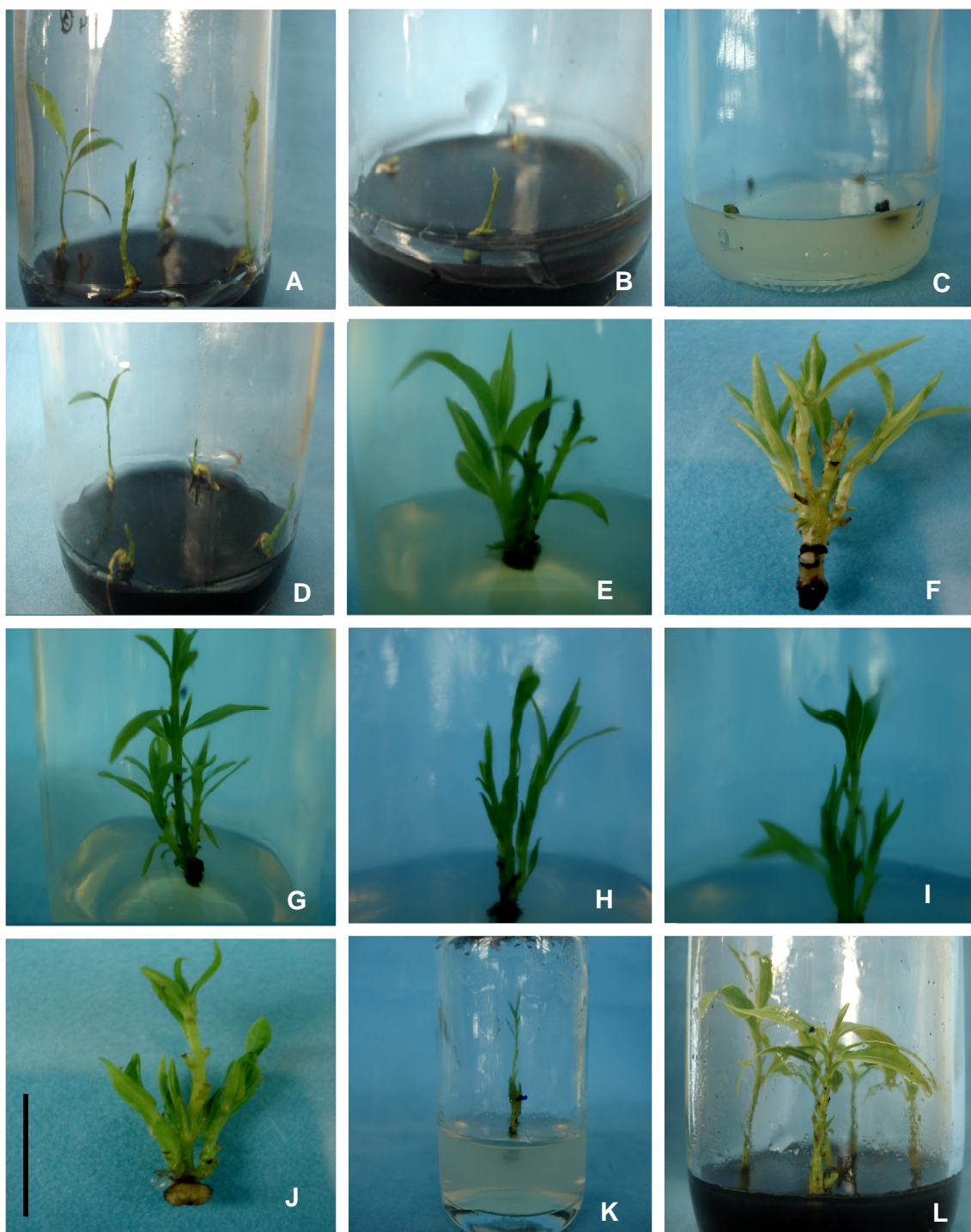


FIGURA 13 – A-D) Germinação *in vitro* de imbuia. A) MS/2; B) WPM/2; C) MS/2 sem carvão ativado; D) MS/2, acrescido de  $3\text{gL}^{-1}$  de carvão ativado. E-G) Brotações de imbuia: E)  $10\ \mu\text{M}$  de BAP (3º subcultivo); F)  $5\ \mu\text{M}$  de BAP (4º subcultivo); G)  $10\ \mu\text{M}$  de BAP (4º subcultivo). H-J) Brotações de imbuia: H)  $2,5\ \mu\text{M}$  de BAP +  $2,5\ \mu\text{M}$  de CIN (2º subcultivo); I)  $5\ \mu\text{M}$  de BAP +  $5\ \mu\text{M}$  de CIN (2º subcultivo); J)  $5\ \mu\text{M}$  de BAP +  $5\ \mu\text{M}$  de CIN (3º subcultivo). K-L) Alongamento: K)  $1\ \mu\text{M}$  BAP; L)  $2\ \text{gL}^{-1}$ . Barra: 1 cm.



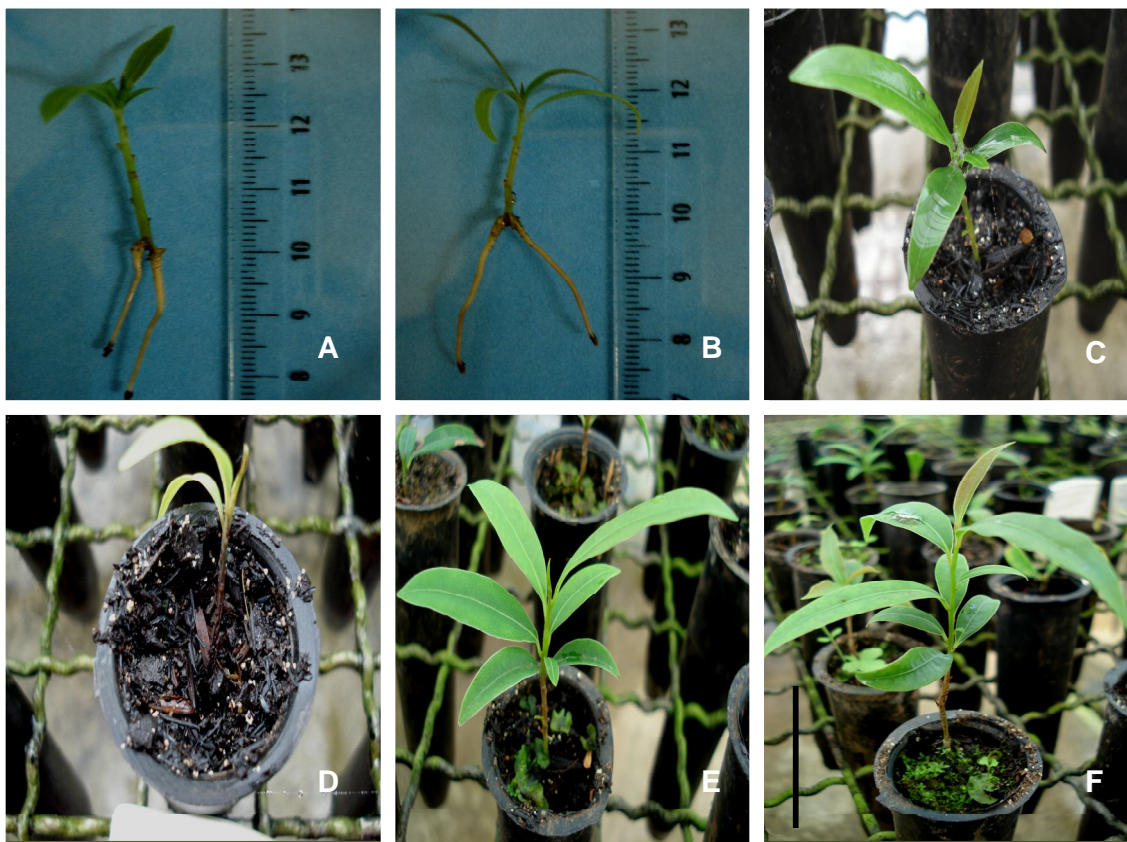


FIGURA 14 - A-B) Enraizamento: A) 1,25  $\mu\text{M}$  AIB; B- 2,5  $\mu\text{M}$  AIB; C) Muda com folhas novas após quatro semanas; D) Planta necrosada; E-F) Plantas aclimatizadas após 12 semanas. Barra: 2 cm.

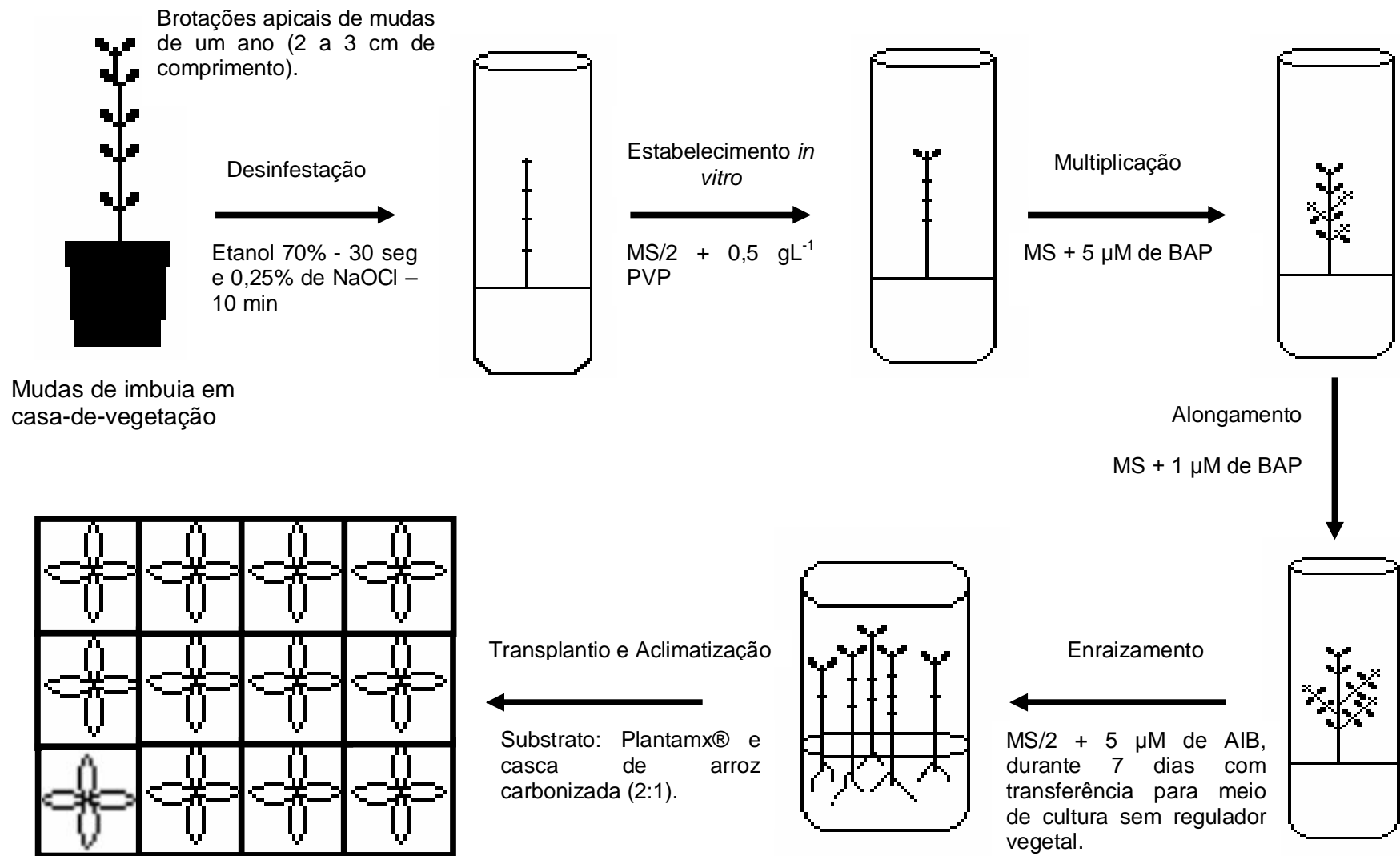


FIGURA 15 - ESQUEMA DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Ocotea porosa*.

## ANEXOS

ANEXO 1 - Análise de variância e teste de Bartlett's sob o efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de embriões de imbuia em meio de cultura MS/2, após 60 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio Germinação (%)
Tratamentos	3	2016,876*
Erro	12	538,101
Total	15	
Coeficiente de variação (%)		54,10
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		5,284 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo

ANEXO 2 - Análise de variância e teste de Bartlett's sob o efeito de diferentes formulações de sais na germinação *in vitro* de embriões de imbuia em meio de cultura MS/2, após 60 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio Germinação (%)
Tratamentos	3	2273,936*
Erro	16	239,556
Total	19	
Coeficiente de variação (%)		29,00
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		2,556 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo

ANEXO 3 - Análise de variância e teste de Bartlett's sob o efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na germinação *in vitro* de embriões de imbuia em meio de cultura MS/2, após 60 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio Germinação (%)
Tratamentos	3	3991,932*
Erro	16	526,168
Total	19	
Coeficiente de variação (%)		55,46
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		6,782 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo

ANEXO 4 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável porcentagem de alongamento das brotações em meio MS sob concentrações reduzidas de BAP ou CIN, após seis semanas de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
		Alongamento (%)
Tratamentos	5	1340,844 <sup>ns</sup>
Erro	18	678,281
Total	23	
Coeficiente de variação (%)		49,24
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		9,415 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo.

ANEXO 5 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável número médio de brotações por explante em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP, após quatro semanas de cultivo durante o cultivo inicial (S<sub>0</sub>) e em quatro subcultivos (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
Tratamentos	3	1,019*	4,659*	4,675*	6,202*	8,463*
Erro	12	0,216	0,265	0,285	0,688	0,815
Total	15					
Coeficiente de variação (%)		20,50	17,44	16,57	25,95	27,11
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		3,512 <sup>ns</sup>	4,459 <sup>ns</sup>	6,607 <sup>ns</sup>	6,058 <sup>ns</sup>	7,104 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo.

ANEXO 6 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável comprimento médio das brotações axilares em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP, após quatro semanas de cultivo durante o cultivo inicial (S<sub>0</sub>) e em quatro subcultivos (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
Tratamentos		0,283 <sup>ns</sup>	0,018 <sup>ns</sup>	0,122*	0,266*	0,302 <sup>ns</sup>
Erro		0,083	0,033	0,032	0,059	0,100
Total						
Coeficiente de variação (%)		20,89	19,54	20,47	33,78	40,89
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		0,918 <sup>ns</sup>	2,016 <sup>ns</sup>	1,723 <sup>ns</sup>	4,150 <sup>ns</sup>	7,455 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo

ANEXO 7 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável porcentagem de alongamento de brotações em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP, após quatro semanas de cultivo durante o cultivo inicial (S<sub>0</sub>) e em quatro subcultivos (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
Tratamentos	2	0,0	131,482 <sup>ns</sup>	499,622*	139,899 <sup>ns</sup>	35,317 <sup>ns</sup>
Erro	9	0,0	143,569	90,977	107,203	49,925
Total	11					
Coeficiente de variação (%)		0,0	27,14	24,73	28,33	23,48
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		0,0	0,411 <sup>ns</sup>	4,401 <sup>ns</sup>	7,361 <sup>ns</sup>	3,700 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo

ANEXO 8 - Efeito de diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS, na multiplicação de imbuia, após quatro semanas de cultivo, durante o cultivo inicial (S<sub>0</sub>) e em quatro subcultivos (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>).

Cultivos	BAP (µM)	Número médio de brotações por explante	Comprimento médio das brotações axilares (cm)	Alongamento das brotações (%)
Cultivo inicial (S <sub>0</sub> )	0	1,6 b	1,2 a	0,0
	2,5	2,2 ab	1,6 a	0,0
	5	2,4 ab	1,6 a	0,0
	10	2,8 a	1,1 a	0,0
Primeiro subcultivo (S <sub>1</sub> )	0	1,6 b	1,0 a	37,9 a
	2,5	2,5 b	0,9 a	46,4 a
	5	3,8 a	1,0 a	41,3 a
	10	3,9 a	0,9 a	51,0 a
Segundo subcultivo (S <sub>2</sub> )	0	1,9 c	0,9 ab	34,2 ab
	2,5	2,9 bc	1,1 a	53,0 a
	5	3,9 ab	0,9 ab	40,5 ab
	10	4,3 a	0,7 b	26,6 b
Terceiro subcultivo (S <sub>3</sub> )	0	1,7 b	0,4 b	29,0 a
	2,5	3,0 b	1,0 a	40,3 a
	5	4,8 a	0,8 ab	34,7 a
	10	3,3 ab	0,8 ab	42,1 a
Quarto subcultivo (S <sub>4</sub> )	0	1,7 b	0,5 a	29,9 a
	2,5	3,1 b	1,2 a	34,4 a
	5	5,3 a	0,8 a	27,8 a
	10	3,2 b	0,7 a	28,4 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ANEXO 9 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável número médio de brotações por explante em meio MS sob diferentes concentrações combinadas de BAP e CIN, após quatro semanas de cultivo, durante o cultivo inicial ( $s_0$ ) e em quatro subcultivos ( $s_1, s_2, s_3, s_4$ ).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		$S_0$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$
Tratamentos	3	0,209*	0,919*	1,888*	2,945*	4,527*
Erro	12	0,051	0,101	0,204	0,505	0,541
Total	15					
Coeficiente de variação (%)		10,98	12,78	19,01	28,13	27,70
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		1,982 <sup>ns</sup>	2,749 <sup>ns</sup>	2,839 <sup>ns</sup>	7,369 <sup>ns</sup>	5,842 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo

ANEXO 10 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável comprimento médio das brotações axilares em meio MS sob diferentes concentrações combinadas de BAP e CIN, após quatro semanas de cultivo, durante o cultivo inicial ( $s_0$ ) e em quatro subcultivos ( $s_1, s_2, s_3, s_4$ ).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		$S_0$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$
Tratamentos	3	0,195 <sup>ns</sup>	0,047 <sup>ns</sup>	0,152 <sup>ns</sup>	0,031 <sup>ns</sup>	0,171 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,065	0,019	0,084	0,074	0,097
Total	15					
Coeficiente de variação (%)		19,30	16,02	41,87	44,34	60,80
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		1,870 <sup>ns</sup>	3,697 <sup>ns</sup>	4,286 <sup>ns</sup>	7,177 <sup>ns</sup>	2,835 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo.

ANEXO 11 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável porcentagem de alongamento das brotações em meio MS sob diferentes concentrações combinadas de BAP e CIN, após quatro semanas de cultivo, durante o cultivo inicial ( $s_0$ ) e em quatro subcultivos ( $s_1, s_2, s_3, s_4$ ).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		$S_0$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$
Tratamentos	3	0,0	38,621 <sup>ns</sup>	5,902 <sup>ns</sup>	50,001 <sup>ns</sup>	25,842 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,0	250,729	56,085	25,114	13,004
Total	15					
Coeficiente de variação (%)		0,0	36,83	25,00	23,38	18,74
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		0,0	0,767 <sup>ns</sup>	5,056 <sup>ns</sup>	4,205 <sup>ns</sup>	1,650 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo.

ANEXO 12 - Efeito de diferentes combinações de BAP e CIN em meio de cultura MS, na multiplicação de imbuia, após quatro semanas de cultivo, durante o cultivo inicial ( $s_0$ ) e em quatro subcultivos ( $s_1, s_2, s_3, s_4$ ).

Cultivos	BAP + CIN ( $\mu$ M)	Número médio de brotações por explante	Comp. médio das brotações axilares (cm)	Alongamento das brotações (%)
Cultivo inicial ( $S_0$ )	0	1,7 b	1,1 a	0,0
	1,25 + 1,25	2,1 ab	1,4 a	0,0
	2,5 + 2,5	2,3 a	1,6 a	0,0
	5 + 5	2,1 ab	1,2 a	0,0
Primeiro subcultivo ( $S_1$ )	0	1,8 b	0,7 a	47,2 a
	1,25 + 1,25	2,7 a	1,0 a	43,1 a
	2,5 + 2,5	2,5 a	0,9 a	41,8 a
	5 + 5	2,9 a	0,9 a	39,9 a
Segundo subcultivo ( $S_2$ )	0	1,4 b	0,5 a	30,6 a
	1,25 + 1,25	2,4 ab	0,7 a	29,6 a
	2,5 + 2,5	2,7 a	0,9 a	28,5 a
	5 + 5	3,0 a	0,7 a	31,2 a
Terceiro subcultivo ( $S_3$ )	0	1,4 b	0,6 a	26,7 a
	1,25 + 1,25	2,3 ab	0,5 a	20,2 a
	2,5 + 2,5	3,0 a	0,7 a	19,9 a
	5 + 5	3,4 a	0,7 a	18,9 a
Quarto subcultivo ( $S_4$ )	0	1,5 b	0,3 a	21,6 a
	1,25 + 1,25	2,1 ab	0,4 a	16,4 a
	2,5 + 2,5	3,6 a	0,7 a	21,1 a
	5 + 5	3,5 a	0,7 a	17,9 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ANEXO 13 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável porcentagem de alongamento de brotações de imbuia em meio MS sob diferentes concentrações de carvão ativado, após seis semanas de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio Alongamento (%)
Tratamentos	3	199,115*
Erro	12	42,006
Total	15	
Coeficiente de variação (%)		20,64
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		1,250 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo.

ANEXO 14 - Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado em meio MS sob o alongamento de brotações de imbuia, após seis semanas de cultivo.

Carvão ativado (gL <sup>-1</sup> )	Alongamento (%)
0,5	25,3 b
1,0	30,9 ab
2,0	41,4 a
3,0	27,9 ab

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ANEXO 15 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável porcentagem de brotações enraizadas, número médio de raízes e comprimento médio das raízes em meio de cultura WPM/2 sob diferentes concentrações de AIB, após quatro semanas de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		E (%)	NMR	CMR (cm)
Tratamentos	3	245,063 <sup>ns</sup>	0,178 <sup>ns</sup>	0,167 <sup>ns</sup>
Erro	12	407,563	0,137	0,143
Total	15			
Coeficiente de variação (%)		42,45	23,39	41,43
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		1,637 <sup>ns</sup>	7,113 <sup>ns</sup>	0,590 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> não significativo. ER: porcentagem de enraizamento. NMR: número médio de raízes por brotação. CMR: comprimento médio das raízes.

ANEXO 16 - Efeito do ácido indolbutírico na indução de raízes em brotações de imbuia em meio WPM/2, após quatro semanas de cultivo.

AIB ( $\mu$ M)	E (%)	NMR	CMR (cm)
0	42,5 a	1,3 a	0,7 a
1,25	50,0 a	1,6 a	1,1 a
2,5	57,6 a	1,7 a	0,8 a
5	40,3 a	1,8 a	1,1 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. E: porcentagem de enraizamento; NMR: número médio de raízes por brotação; CMR: comprimento médio das raízes.



ANEXO 17 - Análise de variância e teste de Bartlett's para a variável porcentagem de brotações enraizadas, número médio de raízes e comprimento médio das raízes em meio de cultura MS/2 sob diferentes concentrações de AIB, após quatro semanas de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		E (%)	NMR	CMR (cm)
Tratamentos	3	875,000 <sup>ns</sup>	0,414 <sup>ns</sup>	0,248*
Erro	12	499,583	0,331	0,043
Total	15			
Coeficiente de variação (%)		43,61	38,16	35,69
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		3,380 <sup>ns</sup>	6,788 <sup>ns</sup>	0,653 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> não significativo. E: porcentagem de enraizamento; NMR: número médio de raízes por brotação; CMR: comprimento médio das raízes.

ANEXO 18 - Efeito do ácido indolbutírico na indução de raízes em brotações de imbuia em meio MS/2, após quatro semanas de cultivo.

AIB ( $\mu$ M)	E (%)	NMR	CMR (cm)
0	35,0 a	1,2 a	0,3 c
1,25	42,5 a	1,1 a	0,4 bc
2,5	45,0 a	1,7 a	0,5 abc
5	65,0 a	1,9 a	0,9 a
10	68,7 a	1,6 a	0,8 ab

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. E: porcentagem de enraizamento; NMR: número médio de raízes por brotação; CMR: comprimento médio das raízes.

ANEXO 19 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável porcentagem de brotações enraizadas, número médio de raízes e comprimento médio das raízes em meio de cultura WPM/2 sob tratamento pulso com diferentes concentrações de AIB, após quatro semanas de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		E (%)	NMR	CMR (cm)
Tratamentos	3	2053,539*	0,424 <sup>ns</sup>	0,029 <sup>ns</sup>
Erro	12	332,587	0,874	0,149
Total	15			
Coeficiente de variação (%)		41,95	52,29	67,17
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		2,178 <sup>ns</sup>	7,119 <sup>ns</sup>	2,017 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> não significativo. ER: porcentagem de enraizamento; NMR: número médio de raízes por brotação; CMR: comprimento médio das raízes.

ANEXO 20 - Efeito do tratamento pulso na indução de raízes em brotações de imbuia com diferentes concentrações de AIB, durante 10 minutos, após quatro semanas de cultivo em meio de cultura WPM/2.

AIB (mM)	E (%)	NMR	CMR (cm)
0	15,3 b	1,3 a	0,5 a
2,5	35,0 ab	1,9 a	0,7 a
5	61,1 a	1,9 a	0,6 a
10	62,6 a	2,0 a	0,5 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. E: porcentagem de enraizamento; NMR: número médio de raízes por brotação; CMR: comprimento médio das raízes.

ANEXO 21 - Análise de variância e teste de Bartlett's para variável porcentagem de brotações enraizadas, número médio de raízes e comprimento médio das raízes em meio de cultura MS/2 sob diferentes concentrações de AIB, após quatro semanas de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		ER (%)	NMR	CMR (cm)
Tratamentos	3	389,583 <sup>ns</sup>	0,129 <sup>ns</sup>	0,691*
Erro	12	206,250	0,176	0,116
Total	15			
Coeficiente de variação (%)		51,06	36,63	48,79
Teste de Bartlett's ( $\chi^2$ )		0,014 <sup>ns</sup>	5,625 <sup>ns</sup>	4,553 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> não significativo. ER: porcentagem de enraizamento; NMR: número médio de raízes por brotação; CMR: comprimento médio das raízes.

ANEXO 22 - Efeito do tratamento de indução de enraizamento durante 7 dias em meio de cultura MS/2 contendo AIB, seguido de transferência para meio contendo 1 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado durante quatro semanas de cultivo.

AIB ( $\mu$ M)	E (%)	NMR	CMR (cm)
0	20,0 a	1,1 a	0,4 b
2,5	20,0 a	1,0 a	0,5 b
5	40,0 a	1,2 a	0,7 ab
10	32,5 a	1,4 a	1,3 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. E: porcentagem de enraizamento; NMR: número médio de raízes por brotação; CMR: comprimento médio das raízes.