

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEANDRO FRANCISCO DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda* L. A PARTIR DE MATERIAL JUVENIL

CURITIBA

2011

LEANDRO FRANCISCO DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda* L. A PARTIR DE MATERIAL JUVENIL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, Área de Concentração em Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas

Coorientadores: Prof.^a Dra. Marguerite Quoirin

Prof. Dr. Henrique Soares Koehler

CURITIBA

2011



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



“MICROPROPAGAÇÃO DE *PINUS TAEDA* A PARTIR DE MATERIAL JUVENIL”

por

LEANDRO FRANCISCO DE OLIVEIRA

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

Prof^a Dr^a Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR) - PRESIDENTE

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves (USP/ESALQ)

Dr^a Isabel Rodrigues Gerhardt (EMBRAPA/PR)

Curitiba, 31 de março de 2011.

Aos meus pais,
José e Lúcia.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus pais, Seu José e Dona Lúcia, que desde sempre são minha base de tudo, meu maior apoio, sempre os mais pacientes e os mais crentes de meus sonhos e conquistas. Amo vocês!

À Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas pela atenção, pela paciência, pelas inúmeras correções, pela bolsa de estudos, por me aceitar como orientando, por acreditar e por transmitir seus conhecimentos. Meu mais sincero obrigado pelos dois anos que passou me ensinando sobre a micropropagação. Muito obrigado.

Aos coorientadores Prof.^a Dra. Marguerite Quoirin e Prof. Dr. Henrique Soares Koehler, pela paciência nas frequentes dúvidas.

À Professora Dra. Erika Amano, pela parceria e que muito me ensinou sobre anatomia vegetal.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná, que tiveram participação direta ou indireta no meu aprendizado durante o mestrado.

À FINEP e ao REUNI, pelas concessões de bolsas.

À Empresa Battistella Florestal pelo financiamento do projeto, ao Professor Dr. Antonio Rioyei Higa e a toda a sua equipe que esteve envolvida no Projeto *Pinus*.

Aos amigos e estagiários do Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica, que por algum momento se envolveram nesse projeto.

Em especial, aos meus queridos amigos Emerson Luiz Gumboski, Rafaela Carla Mattia, Danielle Lopes Ferreira, Luciana Pelegrini, Betina Kellermann, Jaqueline Flor Ribeiro, Rorai Neto, Samuel Schwaida e Flávio Beilke que estiveram me apoiando nas horas mais difíceis, nas boas horas de conversa e inúmeras risadas. Sem dúvida vocês mudaram minha vida e esses dois anos não seriam tão maravilhosos!

Aos amigos de mestrado da turma 2009, pelas inúmeras vezes que nos reunimos na hora do almoço e compartilhamos das nossas aventuras e momentos irreverentes. Sentirei saudades de todos vocês!

E a todos aqueles que acompanharam minha jornada desde a graduação, professores e amigos, meu muito obrigado.

Se ao lado da biblioteca houver um jardim, nada faltará.

Cícero (106-43 a.C.)

RESUMO

Pinus taeda destaca-se pela produtividade e qualidade de sua madeira. Estudos relacionados com a micropropagação de *Pinus taeda* pela proliferação de gemas axilares são reduzidos. O objetivo foi desenvolver um protocolo de micropropagação de *Pinus taeda* a partir de material juvenil. Brotações apicais e segmentos nodais de 3 cm de comprimento, oriundos de mudas de dois a quatro meses de idade, foram inoculados em meios de cultura MS, DCR, WV3 ou WV5, no estabelecimento *in vitro*. Na etapa de indução de brotações múltiplas, os explantes foram transferidos para os meios DCR, WV3 ou WV5, na ausência de BAP ou em concentrações de 0,12 a 2,00 μM . Para a indução de raízes foi testado um meio composto por água e ágar ou GDm/2 e para expressão e desenvolvimento das raízes, os meios GDm/2, GDm/4 além do meio composto por água e ágar. Foram testadas concentrações de ANA variando entre 0,54 e 2,69 μM , combinadas com BAP em concentrações de 0,04 a 0,44 μM . Períodos de indução variaram entre 7, 9 e 12 dias ou permanecendo no mesmo meio por dez semanas. Também foi testado o meio dupla fase, com os sais do meio GDm/2 presentes na fase semissólida ou na fase líquida, suplementadas com reguladores durante nove dias de indução. As mudas enraizadas foram plantadas em substrato comercial Plantmax[®] Florestas e mantidas em casa de vegetação por 90 dias. Para o estudo anatômico foram coletadas amostras de raízes originadas a partir de calo e de raízes posteriormente aclimatizadas. Segmentos nodais apresentaram melhores respostas no estabelecimento *in vitro*, com até 100% dos explantes formando brotações axilares e uma média de 3,7 a 5,8 brotações por explante. O meio WV5 mostrou ser melhor por apresentar maior taxa de sobrevivência (86%) e maior porcentagem de alongamento (85,2%). As concentrações de BAP não promoveram melhores respostas quando comparadas ao controle. Contudo, com o uso alternado de concentrações de BAP (2,00; 0,25 e 1,00 μM em cada subcultivo) em meio de cultura WV5, pode aumentar a produção sendo estimada em 7530 brotações a partir de 100 explantes, em nove meses de cultivo. A melhor porcentagem de enraizamento (47,5%) foi obtida em brotações submetidas ao tratamento com 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP por 12 dias no meio de cultura composto por água e ágar, seguido de transferência para o meio GDm/2 sem reguladores. O meio dupla fase não aumentou a porcentagem de enraizamento. As raízes tiveram origem direta e indireta. Nas raízes originadas de calo, a conexão vascular foi estabelecida quando essas atingiram comprimento maior que 0,6 cm, sendo esse o tamanho mínimo recomendado para o transplântio. As traqueídes que formam a conexão vascular entre raiz e calo são diferenciadas a partir de células parenquimáticas. As plantas transplantadas apresentaram 90% de sobrevivência após 90 dias de permanência em casa de vegetação. A micropropagação de *Pinus taeda* a partir de material juvenil é viável, porém necessita de mais estudos para otimizar a etapa de enraizamento.

Palavras-chave: coníferas, brotações apicais, segmentos nodais, raízes adventícias.

ABSTRACT

Pinus taeda stands for productivity and quality of its timber. Studies on *Pinus taeda* micropropagation by axillary bud proliferation are quite few. The purpose of this study was to develop a protocol for micropropagation of this species from juvenile material. Apical shoots and nodal segments of 3 cm length, derived of two to four months old seedlings, were inoculated in MS, DCR, WV3 or WV5 medium, for *in vitro* establishment. For multiple shoots induction, the explants were transferred for the DCR, WV3 or WV5 medium, without BAP or with concentrations of 0.12 to 2.0 μM . For the induction of roots a medium composed of water and agar or GDM/2 was tested and for root initiation and development, the GDM/2, GDM/4 media beyond the medium composed of water and agar were compared. NAA concentrations were ranging from 0.54 to 2.69 μM , in combination with BAP at concentrations between 0.04 and 0.44 μM . Induction periods ranged from 7, 9 and 12 days, or remaining in the same medium for ten weeks. The double-layer medium, with GDM/2 present in the semisolid phase or liquid phase, supplemented with regulators during nine days of induction, was also tested. The rooted plants were maintained in the greenhouse for 90 days, planted in Plantmax[®] Forestry substrate. For the anatomical study, samples of roots originated from callus and subsequently acclimatized roots were used. Nodal segments showed better responses during *in vitro* establishment, with up to 100% of explants forming axillary shoots and an average of 3.7 to 5.8 shoots per explant. The WV5 media proved better due to a higher survival rate (86%) and highest elongation percentage (85.2%). BAP did not promote better multiplication when compared to control. However, the alternate use of BAP (2.00, 0.25 and 1.00 μM in each subculture) in WV5 culture medium can increase the production being estimated at 7530 shoots from 100 explants, in nine months of cultivation. The best rooting percentage (47.5%) was obtained in shoots treated with 2.69 μM NAA and 0.44 μM BAP for 12 days in culture medium composed of water and agar, followed by transfer to growth regulator-free GDM/2 medium. The double-layer medium did not increase the rooting percentage. The roots originated directly and indirectly. In the roots derived from callus, the vascular connection was established when roots were longer than 0.6 cm length, so that minimum size was recommended for transplanting. The tracheids that form the vascular connection between root and callus were differentiated from parenchymal cells. The transplanted plants in commercial substrate showed 90% survival after 90 days. Micropropagation of *Pinus taeda* from juvenile material is feasible, but requires further studies to optimize the rooting stage.

Keywords: conifers, apical shoots, nodal segments, adventitious roots

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 - MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda* L.: A – MUDAS DE DOIS MESES DE IDADE MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E UTILIZADAS COMO FONTE DE EXPLANTES; BROTAÇÃO APICAL (B) E SEGMENTO NODAL (C), INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA MS, APRESENTANDO A FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES APÓS SEIS SEMANAS DE CULTIVO; D – BROTAÇÃO APICAL COM BROTAÇÕES AXILARES DENSENVOLVENDO AO LONGO DO CAULE, EM MEIO DE CULTURA WV3 SEM BAP, NO CULTIVO INICIAL; E – SEGMENTO NODAL COM BROTAÇÕES AXILARES DESENVOLVIDAS EM MEIO DE CULTURA WV3, ACRESCIDO DE 0,50 μ M BAP, NO SEGUNDO SUBCULTIVO. BARRA: 1,0 cm 47

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 - NÚMERO DE BROTAÇÕES DE *Pinus taeda* PRODUZIDAS AO FINAL DE NOVE MESES DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WV5, NA ETAPA DE ESTABELECIMENTO E DE MULTIPLICAÇÃO, COM OU SEM BAP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES 65
- FIGURA 2 - MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda* L.: BROTAÇÃO APICAL INOCULADA EM MEIO DE CULTURA WV5 (A) E SEGMENTO NODAL INOCULADO EM MEIO DE CULTURA WV3 (B), APÓS 90 DIAS DE CULTIVO. C – SEGMENTO NODAL INOCULADO EM MEIO DE CULTURA WV5 ACRESCIDO DE 2 μ M BAP, APÓS OITO SEMANAS DE CULTIVO; D – BROTAÇÃO INOCULADA EM MEIO WV5 SEM BAP, APÓS OITO SEMANAS DE CULTIVO. BARRA: 1,0 cm .. 73

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1 - PORCENTAGEM DE RAÍZES FORMADAS A PARTIR DE CALO OU DIRETAMENTE DO CAULE, EM BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*. AS BROTAÇÕES FORAM INOCULADAS EM MEIO GDm/2, EXCETO O ÚLTIMO TRATAMENTO QUE FOI INOCULADO EM MEIO DE INDUÇÃO CONTENDO ÁGUA, ÁGAR E REGULADORES. 1º PERÍODO DE INDUÇÃO DE NOVE DIAS E DEPOIS TRANSFERIDAS PARA O MEIO GDm/2 SEM REGULADORES, POR DEZ SEMANAS 84
- FIGURA 2 - EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DOS REGULADORES VEGETAIS NO ENRAIZAMENTO *in vitro* DE BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*. AS BROTAÇÕES FORAM INOCULADAS EM MEIO GDm/2, EXCETO O ÚLTIMO TRATAMENTO QUE FOI INOCULADO EM MEIO DE INDUÇÃO CONTENDO ÁGUA, ÁGAR E REGULADORES. 1º PERÍODO DE INDUÇÃO DE NOVE DIAS E DEPOIS TRANSFERIDAS PARA O MEIO GDm/2 SEM REGULADORES, POR DEZ SEMANAS 84
- FIGURA 3 - EFEITO DO MEIO DUPLA FASE NA PORCENTAGEM DE RAÍZES FORMADAS A PARTIR DE CALO OU DIRETAMENTE DO CAULE, EM BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*, APÓS 15 SEMANAS DE CULTIVO 86
- FIGURA 4 - EFEITO DO TEMPO DE INDUÇÃO E DO MEIO DE DESENVOLVIMENTO NA PORCENTAGEM DE RAÍZES FORMADAS A PARTIR DO CALO OU DIRETAMENTE DO CAULE, EM BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*. APÓS O PERÍODO DE INDUÇÃO EM MEIO COMPOSTO POR ÁGUA, ÁGAR E 2,69 μ M ANA E 0,44 μ M BAP, AS BROTAÇÕES FORAM INOCULADAS EM MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO GDm/2 (A) OU GDm/4 (B), POR DEZ SEMANAS 88

- FIGURA 5 - ENRAIZAMENTO *in vitro* DE *Pinus taeda* L. A – RAÍZES *in vitro* FORMADAS DIRETAMENTE DO CAULE; B – RAÍZES *in vitro* FORMADAS A PARTIR DE CALOS NA BASE DAS BROTAÇÕES; C – RAÍZES DESENVOLVIDAS *in vitro* EM MEIO DE CULTURA COMPOSTO POR ÁGUA E ÁGAR ACRESCIDO DE 2,69 μ M ANA E 0,44 μ M BAP POR 12 DIAS, DEPOIS TRANSFERIDAS PARA MEIO GDM/2; D – PLANTA TRANSPLANTADA EM BANDEJA DE SEMEADURA CONTENDO SUBSTRATO PLANTMAX® FLORESTAS EM CASA DE VEGETAÇÃO; E – PLANTA CRESCENDO EM SACO PLÁSTICO COM SUBSTRATO, DEPOIS DE TRANSPLANTADAS NAS BANDEJAS; F, G – CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO, APÓS 90 DIAS. BARRA: A – D, 1,0 cm; E, 10,0 cm; F – G, 5,0 cm 100
- FIGURA 6 - CORTES LONGITUDINAIS DE RAÍZES *in vitro* E ACLIMATIZADAS DE *Pinus taeda* L.: A – PRIMÓRDIO DE RAÍZES *in vitro* EMERGINDO DE CÉLULAS PERIFÉRICAS DO CALO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO E 0,2 CM DE COMPRIMENTO; B – CONEXÃO ENTRE O SISTEMA VASCULAR DA RAIZ E DO CALO AUSENTE; C – RAIZ *in vitro* EM ESTÁGIO MAIS AVANÇADO DE DESENVOLVIDO COM CONEXÃO ENTRE O SISTEMA VASCULAR DA RAIZ E DO CALO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO E 0,6 CM DE COMPRIMENTO; D, E – DETALHE DAS TRAQUEÍDES DIFERENCIADAS A PARTIR DE CÉLULAS PARENQUIMÁTICAS FORMANDO A CONEXÃO VASCULAR (SETA); F – TRAQUEÍDES FORMADAS A PARTIR DO PROCÂMBIO; G – COIFA DE RAIZ DESENVOLVIDA *in vitro*, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO E 0,6 CM DE COMPRIMENTO; H – COIFA DE RAÍZ *in vitro* APÓS 60 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO 101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 –	RESPOSTA DO ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> DE BROTAÇÕES APICAIS E SEGMENTOS NODAIS DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA MS, APÓS SEIS SEMANAS DE CULTIVO	37
TABELA 2 –	PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES AXILARES DE <i>Pinus taeda</i> , OBTIDA EM MEIO DE CULTURA WV3, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS DOIS SUBCULTIVOS POSTERIORES	38
TABELA 3 –	NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DE <i>Pinus taeda</i> , OBTIDO EM MEIO DE CULTURA WV3 ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS DOIS SUBCULTIVOS POSTERIORES	39
TABELA 4 –	PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES APICAIS DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADAS EM MEIO WV3, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP	40

CAPÍTULO 2

TABELA 1 –	PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE EXPLANTES DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADOS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, NO ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> , APÓS 90 DIAS DE CULTIVO	56
TABELA 2 –	EFEITO DOS MEIOS DE CULTURA E DO TIPO DE EXPLANTE NA FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES EM <i>Pinus taeda</i> , NO ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> , APÓS 90 DIAS DE CULTIVO	57
TABELA 3 –	EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES APICAIS, DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS 90 DIAS DE CULTIVO	58
TABELA 4 –	COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES AXILARES DE <i>Pinus taeda</i> , OBTIDA NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, ACRESCIDOS OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO	59
TABELA 5 –	NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DE <i>Pinus taeda</i> , OBTIDO EM DIFERENTES MEIO DE CULTURA, ACRESCIDOS OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO	60
TABELA 6 –	PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES APICAIS DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS DE PERMANÊNCIA EM CADA SUBCULTIVO	61
TABELA 7 –	PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES AXILARES DE <i>Pinus taeda</i> EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO	62
TABELA 8 –	NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO	63
TABELA 9 –	PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES APICAIS DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO	64

CAPÍTULO 3

TABELA 1 –	COMBINAÇÕES DOS MEIOS UTILIZADOS PARA INDUÇÃO DE RAÍZES DE <i>Pinus taeda</i> , CONTENDO 2,69 μM DE ANA E 0,44 μM DE BAP, POR NOVE DIAS, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA MEIO GDM/2 SEMISSÓLIDO	79
TABELA 2 –	COMBINAÇÕES ENTRE DIFERENTES PERÍODOS DE INDUÇÃO, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA O MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES <i>in vitro</i> DE <i>Pinus taeda</i>	80
TABELA 3 –	EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DAS CONCENTRAÇÕES DE ANA E BAP NO ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> DE BROTAÇÕES DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO	83
TABELA 4 –	EFEITO DO MEIO DUPLA FASE NA INDUÇÃO DE RAÍZES EM BROTAÇÕES DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS 15 SEMANAS DE CULTIVO	85
TABELA 5 –	PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> DE BROTAÇÕES DE <i>Pinus taeda</i> SUBMETIDAS A DIFERENTES PERÍODOS DE INDUÇÃO E DIFERENTES MEIOS DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES, APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO	87
TABELA 6 –	NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES POR BROTAÇÃO DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE INDUÇÃO, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES, APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO	87
TABELA 7 –	REPOSTAS NA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE <i>Pinus taeda</i> , APÓS 90 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO	89

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE	17
2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E CULTURA DE TECIDOS EM <i>Pinus</i>	17
2.3 MEIOS DE CULTURA	19
2.4 REGULADORES VEGETAIS	21
2.5 MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Pinus taeda</i>	21
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 1 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE 6-BENZILAMINOPURINA E DO TIPO DE EXPLANTE NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES DE <i>Pinus taeda</i> L. ...	30
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 MATERIAL VEGETAL	34
2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	34
2.3 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	35
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
2.5 CONDIÇÕES DE CULTIVOS	36
3 RESULTADOS	37
3.1 INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPLANTE NO ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	37
3.2 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	37
4 DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÕES	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO 2 – EFEITO DAS FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA NO ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> E INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES DE <i>Pinus taeda</i> L.	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 MATERIAL VEGETAL	52
2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	52
2.3 EFEITO DE TRÊS FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA E DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	53
2.4 EFEITO DO MEIO DE CULTURA WV5 ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	54
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55

2.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO	55
3 RESULTADOS	56
3.1 EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E DO MEIO DE CULTURA NO ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> DE CULTURAS ASSÉPTICAS	56
3.2 EFEITO DE TRÊS FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA E DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	58
3.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA WV5 ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP NA MULTIPLICAÇÃO DE <i>Pinus taeda</i>	61
3.4 ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE BROTAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE EXPLANTES CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WV5, COM OU SEM BAP	64
4 DISCUSSÃO	66
5 CONCLUSÕES	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO 3 – ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i>, TRANSPLANTIO, ACLIMATIZAÇÃO E ESTUDO ANATÔMICO DE RAÍZES DE <i>Pinus taeda</i> L.	74
RESUMO	74
ABSTRACT	75
1 INTRODUÇÃO	76
2 MATERIAIS E MÉTODOS	78
2.1 ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i>	78
2.1.1 Efeito das combinações de ANA e BAP na indução e expressão de raízes <i>in vitro</i>	78
2.1.2 Efeito do meio dupla fase na indução de raízes <i>in vitro</i>	79
2.1.3 Efeito do tempo de indução e da ausência ou redução de sais no meio de expressão e desenvolvimento de raízes <i>in vitro</i>	80
2.1.4 Análise estatística	81
2.2 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO	81
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	81
2.4 ESTUDO ANATÔMICO DAS RAÍZES DE PLANTAS <i>in vitro</i> E ACLIMATIZADAS	82
3 RESULTADOS	83
3.1 EFEITO DAS COMBINAÇÕES DE REGULADORES NA INDUÇÃO, EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES <i>in vitro</i>	83
3.2 EFEITO DO MEIO DUPLA FASE NA INDUÇÃO DE RAÍZES <i>in vitro</i>	85
3.3 EFEITO DO TEMPO DE INDUÇÃO E DA AUSÊNCIA OU REDUÇÃO DE SAIS NO MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES <i>in vitro</i>	86
3.4 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO	88
3.5 ESTUDO ANATÔMICO DAS RAÍZES DE PLANTAS <i>in vitro</i> E ACLIMATIZADAS	89
4 DISCUSSÃO	91
5 CONCLUSÕES	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Pinus taeda* L. foi introduzida no Brasil em 1948 pelo Serviço Florestal do Estado de São Paulo, atualmente Instituto Florestal do Estado de São Paulo, que importou as coníferas exóticas da região Sudeste dos Estados Unidos com objetivo de fomentar programas florestais no estado, disseminando-as inicialmente para os estados do Sul e posteriormente para todo o país (SHIMIZU, 2005).

No Brasil, a utilização de *Pinus* na indústria madeireira tem sido crescente nos últimos anos. As estimativas indicaram que há aproximadamente 1,8 milhão de hectares de plantações constituídas por espécies de *Pinus*, das quais 46% são de *Pinus taeda* (BALLARIN e PALMA, 2003; ABRAF, 2010). As diversas espécies de *Pinus* atualmente plantadas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sobretudo, as cultivadas nas terras mais altas da serra gaúcha e do planalto catarinense, foram introduzidas visando principalmente substituir a madeira da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, cujas populações naturais encontravam-se reduzidas devido a sua exploração (SELLE *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2006)

Atualmente, no Brasil, tanto a indústria madeireira quanto a de celulose e papel, utilizam em grande escala toras de árvores do gênero *Pinus*. Entre as espécies do gênero, *Pinus taeda* destaca-se pela produtividade e qualidade de sua madeira, sendo usada principalmente em serrarias, laminadoras, indústrias de aglomerado, MDF, para construções, móveis e caixotaria, celulose e papel (SCHULTZ, 1997).

A propagação *in vitro* de coníferas ainda está restrita à utilização de material juvenil e embrionário. O principal método de regeneração tem sido enraizamento de brotações axilares ou adventícias, o qual tem apresentado pouca aplicação comercial pelo fato de as taxas de multiplicação serem muito baixas e o custo muito elevado (BONGA, 1991).

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* baseia-se em um conjunto de técnicas que permitem a propagação vegetativa de genótipos elite, mantendo as características de interesse que estes possuem. A micropropagação é o método mais indicado para produção massal de genótipos superiores em cultura de tecidos. Possui as vantagens de produzir, em grande escala, uma série de clones com

características conhecidas, dispondo de um espaço menor e otimizando a escala produtiva (GOLLE, 2007).

Para *Pinus*, estudos relacionados com a micropropagação pela proliferação de gemas axilares são bastante reduzidos, haja vista as limitações impostas pela espécie à propagação clonal. Os poucos trabalhos existentes estão relacionados com a propagação vegetativa e o rejuvenescimento de clones selecionados num programa de silvicultura clonal da espécie (XAVIER *et al.*, 2007).

As coníferas são consideradas difíceis de enraizar e isso tem sido constatado para *Pinus taeda*, tanto pelas técnicas tradicionais de propagação vegetativa como para o enraizamento *in vitro* (MOTT e AMERSON, 1981). Segundo Bergmann e Stomp (1994), o sucesso de enraizamento em *Pinus* pode depender da espécie, família e clones.

As principais técnicas utilizadas para *Pinus taeda* foram a organogênese indireta e direta, sendo a última menos aplicada. Essas técnicas utilizaram como fonte de explante várias partes do embrião (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978), embriões zigóticos (TANG *et al.*, 1998; TANG e OUYANG, 1999; TANG, 2000; TANG e GUO, 2001), cotilédones (MOTT e AMERSON, 1981; NEWTON *et al.*, 1989; JANG e TAINTER, 1991; FRAMPTON *et al.*, 1998; RAHMAN *et al.*, 2003), epicótilos (FRAMPTON *et al.*, 1998) e meristemas apicais (DHUMALE e NEWTON, 1996).

As técnicas de micropropagação podem ser uma alternativa para plantas de difícil enraizamento por estaquia como ocorre com *Pinus taeda*, além de possibilitar a multiplicação rápida de indivíduos selecionados, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, mudas de maior qualidade e uma maior taxa de enraizamento (COMÉRIO, 1994; AMERSON *et al.*, 1985; FRAMPTON e HODGES, 2005).

Em função do exposto, o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a clonagem em escala massal de *Pinus taeda* representa, atualmente, uma prioridade de pesquisa do setor florestal na Região Sul do Brasil.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo foi desenvolver um protocolo de micropropagação de *Pinus taeda* a partir de material juvenil.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar o tipo de explante mais apropriado: segmentos nodais ou brotações apicais para o estabelecimento de culturas assépticas;
- b) Determinar o melhor meio de cultura e a concentração de BAP para as etapas de estabelecimento *in vitro* e de indução de brotações múltiplas;
- c) Determinar a melhor concentração de auxina e citocinina e o tempo de indução de raízes *in vitro*;
- d) Determinar a origem das raízes e comparar as raízes *in vitro* e aclimatizadas por meio de estudo anatômico;
- e) Estabelecer metodologia de transplante e de aclimatização de mudas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE

As coníferas são espécies importantes para a produção de celulose e madeira serrada (MULLEN *et al.*, 1996). O pinheiro-americano (*Pinus taeda* L.) é uma das espécies lenhosas mais importantes economicamente no mundo. Nativa do sudeste dos Estados Unidos, ela é amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais (TANG *et al.*, 1998). Sua área natural abrange desde o leste do estado de Virginia e sul da Carolina do Norte até o norte da Flórida (GUPTA e DURZAN, 1991). Principal espécie comercial de madeira nos Estados Unidos e uma das espécies lenhosas mais importantes economicamente do mundo (GUPTA e DURZAN, 1991; TANG *et al.*, 1998). No Brasil, a espécie foi introduzida em 1948 disseminando-se inicialmente para os estados do Sul (SHIMIZU, 2005).

A maior parte dos produtos advindos de florestas, no Brasil, é obtida de plantios com espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, diminuindo a pressão que é imposta sobre as florestas naturais, principalmente a Amazônica (SOUZA *et al.*, 2008) e as florestas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (SELLE *et al.*, 1994). *Pinus taeda* tem se destacado pela produtividade e qualidade de sua madeira, sendo usada principalmente em serrarias, laminadoras, indústria de aglomerado, MDF, para construções, móveis e caixotaria, celulose e papel (SCHULTZ, 1997).

Muitas pesquisas são realizadas com a espécie *Pinus taeda* devido ao seu interesse econômico. Estudos sobre seu genoma e sobre genes que são induzidos por reguladores vegetais têm sido relatados na literatura (BUSOV *et al.*, 2004; KOVACH *et al.*, 2010).

2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E CULTURA DE TECIDOS EM *Pinus*

A propagação de *Pinus* geralmente é realizada por sementes, uma vez que a estaquia tem apresentado baixas taxas de enraizamento, havendo necessidade de testar outras técnicas alternativas de propagação vegetativa para essas espécies (STOJIČIĆ *et al.*, 1999).

As técnicas de micropropagação possuem a vantagem de proporcionar altas taxas de multiplicação de plantas comercialmente importantes, permitindo a

propagação massal de genótipos selecionados (GOVIL e GUPTA, 1997; MENZIES e AIMERS-HALLIDAY, 1997). Além disso, a micropropagação serve de estratégia para o melhoramento de árvores e captura de ganhos genéticos (GUPTA e DURZAN, 1991). A produção em larga escala em um curto período de tempo tornou-se um fator importante quando aplicado em programas de melhoramento de espécies florestais (MOTT *et al.*, 1977; MENZIES e AIMERS-HALLIDAY, 1997; WATT *et al.*, 1998; GOLLE, 2007).

As coníferas em geral apresentam dificuldades na micropropagação quando comparadas a outros grupos de lenhosas sendo que, para *Pinus*, as respostas *in vitro* se restringem a material juvenil (EL-NIL, 1982; MUDGE, 1986; DUNSTAN, 1988; TANG *et al.*, 1998). Embriões zigóticos ou cotilédones têm sido as principais fontes de explantes de *Pinus taeda* (MUDGE, 1986; TANG, 2000; SCHESTIBRATOV *et al.*, 2003; CUESTA *et al.*, 2008).

Várias técnicas foram utilizadas em micropropagação de *Pinus*, sendo a mais citada na literatura a organogênese a partir de cotilédones. A organogênese pode ser obtida direta ou indiretamente, sendo que na indireta ocorre uma etapa complementar com a formação de calos e a partir deles se desenvolvem órgãos, podendo ser raiz ou parte aérea (GEORGE *et al.*, 2008).

Na organogênese podem ser utilizados vários tipos de explantes como embriões, cotilédones e discos foliares. Stojičić *et al.* (1999) utilizaram embriões maduros de *Pinus heldreichii*, conseguindo uma média de onze brotações adventícias por explante, em meio GD acrescido de 2,22 μM de BAP. Gladfelter e Phillips (1987) obtiveram 40% de explantes formando brotações axilares em *Pinus elliottii*, em meio MS acrescido de 4,65 μM de cinetina e 0,0246 μM de AIB.

Outra técnica da micropropagação é multiplicação via gemas axilares. Essa técnica possui a vantagem de ser um método mais simples quando comparado às outras, pois são utilizados meristemas pré-formados, além de evitar elevadas concentrações de citocininas para o desenvolvimento das brotações axilares (BAXTER *et al.*, 1989). Plantas regeneradas de ápices caulinares ou gemas axilares são geneticamente estáveis e livres de variação somaclonal, o que não ocorre em plantas regeneradas por organogênese e embriogênese somática (ABDULLAH *et al.*, 1986).

Baxter *et al.* (1989) obtiveram a regeneração *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Pinus oocarpa* e *Pinus tecunumanii*, a partir de gemas axilares. Para

Pinus oocarpa, 13 clones produziram entre 100 e 1000 explantes em um ano, em um total de sete subcultivos, em meio de cultura MS/2 acrescido de 10 μM de BAP e 0,025 μM de ANA por duas semanas.

Diferentes meios de cultura e concentrações de BAP foram utilizadas na técnica de multiplicação de gemas axilares. Para *Pinus ponderosa*, 60% dos explantes formaram brotações em meio MS contendo 4,4 μM de BAP (LIN *et al.*, 1991). Para *Pinus patula*, 65% dos explantes apresentaram brotações axilares e em média cinco brotações por explante, em meio GD acrescido de 3,3 μM de BAP (WATT *et al.*, 1998). E para *Pinus lambertiana* houve a formação em média de 2 a 3 brotações por explante em meio DCR com 0,88 μM de BAP (GUPTA e DURZAN, 1985).

McKellar *et al.* (1994) compararam as técnicas de indução de gemas axilares, gemas adventícias e embriogênese somática de *Pinus patula*, sendo que os melhores resultados foram obtidos a partir de gemas axilares. As melhores respostas de porcentagem de explantes com brotações (65%) foram obtidas com o meio DCR com 3,33 μM de BAP e uma média de duas de brotações por explante em meio acrescido de 2,22 μM de BAP.

Nandwani *et al.* (2001), utilizando ápices caulinares de *Pinus kesiya*, obtiveram uma alta taxa de regeneração a partir de gemas axilares com média de 20 brotações axilares por explante em meio MS acrescido de 22,2 μM de BAP ou 23 μM de cinetina.

2.3 MEIOS DE CULTURA

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). O sucesso da cultura de tecidos como meio de propagação vegetal é fortemente influenciado pelo meio de cultura utilizado (GEORGE *et al.*, 2008). Das formulações salinas citadas na literatura para *Pinus*, as mais comuns são DCR (GUPTA e DURZAN, 1985), SH (SCHENK e HILDEBRANDT, 1972), GD (GRESSHOFF e DOY, 1972), GD modificado (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), LP (QUOIRIN e LEPROIVE, 1977) e outros menos citados como o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) e B5 (GAMBORG *et al.*, 1968).

As diferentes concentrações de sais influenciaram as respostas *in vitro* de *Pinus*. Para cultura de células, por exemplo, Teasdale *et al.* (1986) testaram várias formulações salinas e relataram que elevados níveis de boro, iodo, magnésio e zinco foram benéficos para o crescimento de células de *Pinus taeda*. Sul e Korban (2004) testando sete meios de cultura com diferentes concentrações de sais, vitaminas, fonte de carbono e reguladores vegetais, encontraram diferentes respostas para *Pinus pinea*. A sacarose adicionada ao meio MS com sais reduzidos pela metade (MS/2) ou ao meio SH foi a que apresentou maior taxa de organogênese (89 e 72%, respectivamente).

Tang e Ouyang (1999) compararam a regeneração de *Pinus taeda* via organogênese indireta utilizando embriões zigóticos maduros de seis famílias da espécie. Foram testadas diferentes formulações salinas, sendo que os melhores resultados ocorreram no meio de cultura TE, descrito por Tang *et al.* (1998). A melhor resposta ocorreu devido às concentrações dos sais e compostos orgânicos do meio. O meio TE contém baixa concentração de nitrogênio, altas concentrações de manganês, potássio, magnésio, zinco e é rico em compostos orgânicos. Isso ressalta a importância na escolha das formulações salinas e orgânicas ideais para cada espécie.

O meio GD (GRESSHOFF e DOY, 1972) modificado por Mehra-Palta *et al.* (1978), foi utilizado em vários trabalhos de *Pinus taeda* por promover a indução de raízes *in vitro* (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978; MOTT e AMERSON, 1981; FRAMPTON *et al.*, 1998).

Os meios de cultura WV3 (COKE, 1996b) e WV5 (COKE, 1996a) são formulações desenvolvidas especialmente para cultura *in vitro* de *Pinus taeda*. Coke (1996a) relatou que essas formulações, quando combinadas com outros fatores, tais como uma fonte apropriada de carboidrato, reguladores vegetais e carvão ativado, fornecem nutrientes básicos para numerosas aplicações na cultura de tecidos. Comparados aos meios de cultura DCR e MS, os meios WV3 e WV5 apresentam, sobretudo, maiores quantidades de B, Ca, Mg, S, Cl e P, menores quantidades de Mn e menor quantidade de N em relação ao meio MS. Os meios de cultura WV5 e WV3 apresentam a tiamina como fonte de vitamina e a L-glutamina é presente no meio WV3. A concentração do inositol nesses dois meios é dez vezes maior que no meio de cultura MS.

2.4 REGULADORES VEGETAIS

A composição e concentração de reguladores vegetais no meio de cultura podem determinar o padrão de crescimento e desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS *et al.*, 1998). Auxinas e citocininas são os mais importantes para a regulação do crescimento e da morfogênese na cultura de tecidos (GEORGE *et al.*, 2008).

A 6-benzilaminopurina (BAP) é comumente citada com boas respostas na etapa de indução de brotações em várias espécies de *Pinus*. Alguns trabalhos incluíram também o uso de cinetina (GUPTA e DURZAN, 1985; GLADFELTER e PHILLIPS, 1987) e tidiazuron (SUL e KORBAN, 2004).

Para a etapa de enraizamento *in vitro* do *Pinus*, o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) são os mais utilizados. Nessa etapa também foi citado o uso da giberelina em conjunto com ANA e AIB para a indução de raízes *in vitro* de *Pinus taeda* (TANG e OUYANG, 1999).

Muitos trabalhos com *Pinus* têm relatado uma combinação de auxinas e citocininas para promover o enraizamento, embora para outras espécies as citocininas possuam efeito inibidor. Abdullah *et al.* (1989) testaram combinações com ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e 6-benzilaminopurina (BAP), alcançando melhor resultado com 73% de enraizamento de *Pinus brutia*, combinando os três reguladores nas concentrações de 5,37 μM , 9,80 μM e 0,22 μM , respectivamente.

2.5 MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda*

A cultura de tecidos em *Pinus taeda* tem se desenvolvido para um ponto em que ela se tornou uma ferramenta útil que pode interagir com os programas tradicionais de propagação vegetal e pomares clonais (HANDLEY *et al.*, 1995).

A micropropagação de *Pinus taeda* vem sendo realizada pelos seguintes métodos: via organogênese a partir de cotilédones; via gemas axilares obtidas de explantes juvenis e maduros e embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos (AMERSON *et al.*, 1988).

Poucos trabalhos foram publicados com micropropagação de *Pinus taeda*. Mehra-Palta *et al.* (1978) utilizaram como explantes cotilédones e segmentos de

hipocótilos. Foram obtidos de 80 a 100% de explantes com brotações, em meio de cultura GD, acrescido de 6,66 μM de BAP ou de 4,56 μM de zeatina. A porcentagem de 50% de enraizamento foi alcançada com as brotações inoculadas em meio GD modificado por Mehra-Palta *et al.* (1978) acrescido de 0,54 μM de ANA com 0,04 e 0,22 μM de BAP.

Tang e Ouyang (1999) obtiveram a regeneração de plantas de *Pinus taeda* via organogênese direta a partir de cotilédones e hipocótilos de embriões. Os melhores resultados foram obtidos com meio de cultura TE acrescido de 8,87 μM de BAP e 2,46 μM de AIB, com 28% dos explantes produzindo brotações adventícias e uma média de 32 brotações por embrião utilizado.

Na etapa de enraizamento, o sucesso é muitas vezes influenciado pela qualidade do explante, meio de cultura e reguladores vegetais. Mehra-Palta *et al.* (1978) obtiveram 50% de enraizamento em brotações maiores que 0,5 cm, inoculadas em meio GDM acrescido de 0,54 μM de ANA e 0,22 ou 0,04 μM de BAP. Em outros trabalhos de *Pinus taeda*, a porcentagem variou entre 30 e 50%, porém foi necessário acrescentar GA3, além de AIB e BAP para promover o enraizamento (TANG *et al.*, 1998; TANG e OUYANG, 1999; TANG, 2000, TANG e GUO, 2001). Bergmann e Stomp (1994) também relataram que o sucesso de enraizamento em *Pinus* depende da espécie, família e clones.

A aclimatização é a última e a mais crítica etapa da micropropagação, principalmente quando se trata de espécies de *Pinus*, as quais nem sempre apresentavam uma alta porcentagem de sobrevivência. Leach (1979) relatou que plantas micropropagadas de *Pinus taeda* apresentaram 38% de mortalidade, após seis meses de crescimento em casa de vegetação.

Mckeand e Allen (1984) estudaram os fatores nutricionais e de desenvolvimento das raízes que pudessem interferir no crescimento das plantas micropropagadas de *Pinus taeda*. Eles indicaram que a principal diferença entre plantas micropropagadas e plântulas germinadas pelo método convencional, estava relacionada primariamente pelas diferenças morfológicas no sistema radicial. Plantas micropropagadas tendem a ter menos raízes laterais e proporcionar um sistema de raízes menos eficiente do que mudas germinadas (ANDERSON *et al.*, 1992).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. A.; GRACE, J.; YEOMAN, M. M. Rapid micropropagation of Calabrian pine from primary and secondary buds on shoot explants. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 16, p. 637-641, 1986.

ABDULLAH, A. A.; GRACE, J.; YEOMAN, M. M. Rooting and establishment of Calabrian pine plantlets propagated *in vitro*: influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. **New Phytologist**, v. 113, p. 193-202, 1989.

ABRAF, Associação brasileira dos produtores de florestas plantadas. **Anuário estatístico da ABRAF ano base 2009**. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR/control.html>. Acesso em 18/10/2010.

AMERSON, H. V.; FRAMPTON, L. J. Jr.; McKEAND, S. E.; MOTT, R. L.; WEIR, R. J. Loblolly pine tissue culture: laboratory, greenhouse and field studies. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A.; WILSON, C. M. **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, p. 271-287, 1985.

AMERSON, H. V.; FRAMPTON, L. J. Jr.; MOTT, R. L.; SPAINE, P. C. Tissue culture of conifers using loblolly pine as a model. In: HANOVER, J. W.; KEATHLEY, D. E. **Genetics manipulation on woody plants**. New York: Plenum Press, p. 117-137, 1988.

ANDERSON, A. B.; FRAMPTON, L. J. Jr.; McKEAND, S. E.; HODGES, J. F. Tissue-culture shoot and root system effects on field performance of loblolly pine. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 22, p. 56-61, 1992.

BALLARIN, A. W.; PALMA, H. A. L. Propriedades de resistência e rigidez da madeira juvenil e adulta de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, v. 27, n. 3, p. 371-380, 2003.

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

BERGMANN, B. A.; STOMP, A. M. Effect of genotype on rooting of hypocotyls and in vitro-produced shoots of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 195-202, 1994.

BONGA, J. M. *In vitro* propagation of conifers: fidelity of the clonal offspring. AHUJA, M. **Woody plant biotechnology**. New York: Plenum Press, p. 13-21, 1991.

BUSOV, V. B.; JOHANNES, E.; WHETTEN, R. W.; SEDEROFF, R. R.; SPIKER, S. L.; LANZ-GARCIA, C.; GOLDFARB, B. An auxin-inducible gene from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein. **Planta**, v. 218, p. 916-927, 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.

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines**. USA Patent 5.534.433, 1996a.

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines**. USA Patent 5.534.434, 1996b.

COMÉRIO, J. Silvicultura clonal na Champion. In: **Anais/IPEF**. p. 44-51, 1994.

CUESTA, C.; ORDÁS, R. J.; FERNÁNDEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Clonal micropropagation of six selected half-sibling families of *Pinus pinea* and somaclonal variation analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 125-130, 2008.

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

DUNSTAN, D. I. Prospects and progress in conifers biotechnology. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 18, p. 1497-1506, 1988.

EL-NIL, A. M. M. **Method for asexual reproduction of coniferous trees**. U.S. Patent 5.353.184, 1982.

FRAMPTON, L. J. Jr.; AMERSON, H. V.; LEACH, G. N. Tissue culture method affects *ex vitro* growth and development of loblolly pine. **New Forests**, v. 16, p. 125-138, 1998.

FRAMPTON, L. J. Jr.; HODGES, J. F. Nursery rooting of cuttings from seedlings of slash and loblolly pine. In: ALCANTARA, G. B. **Miniestaquia de *Pinus taeda* L.** Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Botânica. Universidade Federal do Paraná, 2005.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

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

GLADFELTER, H. J.; PHILLIPS, G, C. De novo shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Medw. *in vitro* I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 163-166, 1987.

GOLLE, D. P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas.** Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

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

GRESSHOFF, P. M.; DOY, C. H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). **Planta**, v. 107, p. 107-161, 1972.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. **Loblolly pine (*Pinus taeda* L.)**. In: BAJAJ Y. P. S. (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees III**. Springer, Verlag Berlin Heidelberg New York, v. 16, p. 383-407, 1991.

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

HANDLEY, L. W.; BECWAR, M. R.; CHESICK, E. E.; COKE, J. E.; GODBEY, A. P.; RUTTER, M. R. Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine. **Tappi Journal**, v. 18, p. 169-175, 1995.

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

KOVACH, A.; WEGRZYN, J. L.; PARRA, G.; HOLT, C.; BRUENING, G. E.; LOOPSTRA, C. A.; HARTIGAN, J.; YANDELL, M.; LANGLEY, C. H.; KORF, I.; NEALE, D. B. The *Pinus taeda* genome is characterized by diverse and highly diverged repetitive sequences. **Genomics**, v. 11, p. 420, 2010.

LEACH, G. N. Growth in soil of plantlets produced by tissue culture. **Tappi Journal**, v. 62, n. 4, p. 59-61, 1979.

LIN, Y.; WAGNER, M. R.; HEIDMANN, L. J. *In vitro* formation of axillary buds by immature shoots of Ponderosa pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 161-166, 1991.

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

McKEAND, S. E.; ALLEN, H. L. Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. **Physiologia Plantarum**, v. 61, p. 523-528, 1984.

McKELLAR, D. S.; HERMAN, B.; WHITE, M. P. Towards a protocol for the micropropagation of *Pinus patula*. **South African Forestry Journal**, v. 171, p. 33-41, 1994.

MEHRA-PALTA, A.; SMELTZER, R. H.; MOTT, R. L. Hormonal control of induced organogenesis experiments with excised plant parts of loblolly pine. **Tappi Journal**, v. 61, n. 1, p. 37-40, 1978.

MENZIES, M. I.; AIMERS-HALLIDAY, J. A. Propagation options for clonal forestry with *Pinus radiata*. **IUFRO '97 Genetics of radiata pine**, New Zealand, p. 256-263, 1997.

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

MOTT, R. L.; SMELTZER, R. H.; MEHRA-PALTA, A.; ZOBEL, B. J. Production of forest trees by tissue culture. **Tappi Journal**, v. 60, n. 6, p. 62-64, 1977.

MUDGE, K. W. Micropropagation of Mugo pine from embryonic and seedling explants. **Hortscience**, v. 21, n. 2, p. 298-299, 1986.

MULLEN, R. T.; KING, J. E.; GIFFORD, D. J. Changes in mRNA populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification, germination and post-germinative growth. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 545-553, 1996.

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

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

NEWTON, R. J.; SEN, S.; FONG, F.; NEUMAN, P. Enhancement of shoot organogenesis in conifers. **20th Southern Forest Tree Improvement Conference**, p. 168-175, 1989.

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

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etudes de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.

RAHMAN, M. S.; MESSINA, M. G.; NEWTON, R. J. Performance of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seedlings and micropropagated plantlets on an east Texas site I. Above- and belowground growth. **Forest Ecology and Management**, v. 178, p. 245-255, 2003.

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

SCHESTIBRATOV, K. A.; MIKHAILOV, R. V.; DOLGOV, S. V. Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 139-146, 2003.

SCHULTZ, R. I. Genetics and tree improvement. In: SCHULTZ, R. I. **Loblolly pine: the ecology and culture of loblolly pine (*Pinus taeda* L.)**. New Orleans: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, p. 1-50, 1997.

SELLE, G. L.; SCHNEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G. Classificação de sítio para *Pinus taeda* L., através da altura dominante, para a região de Cambará do Sul, RS, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 4, n. 1, p. 77-95, 1994.

SHIMIZU, J. Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. In: ROSSI, V. L. **Crescimento e qualidade de mudas de *Pinus taeda* L. submetidas à poda química de raízes com cobre e ethefon**. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em agronomia. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2005.

SOUZA, C. A. M.; CHASSOT, T.; FINGER, C. A. G.; SCHNEIDER, P. R.; FLEIG, F. D. Modelos de afilamento para o sortimento do fuste de *Pinus taeda* L. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2506-2511, 2008.

STOJIČIĆ, D.; BUDIMIR, S.; ČULAFIĆ, L. Micropropagation of *Pinus heldreichii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 147-150, 1999.

SUL, III-W.; KORBAN, S. S. Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 197-205, 2004.

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

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

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

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

TEASDALE, R. D.; DAWSON, P. A.; WOOLHOUSE, H. W. Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. **Plant Physiology**, v. 82, p. 942-945, 1986.

WATT, M. P.; RAMGAREEB, S.; HOPE, B.; BLAKEWAY, F. C.; DENISON, N. P. Micropropagation via axillary bud proliferation from seedlings and juvenile shoots of *Pinus patula* Schiede et Deppe. **Southern African Forestry Journal**, n. 181, p. 1-5, 1998.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p. 55-74.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE 6-BENZILAMINOPURINA E DO TIPO DE EXPLANTE NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES DE *Pinus taeda* L.

RESUMO

A técnica de proliferação de gemas axilares permite uma maior estabilidade genética e menor variação somaclonal, sendo importante para produção em larga escala de clones. Existem poucos estudos de regeneração de mudas de *Pinus taeda* com a utilização dessa técnica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tipo de explante e de concentrações de BAP na multiplicação de brotações a partir de gemas axilares de *Pinus taeda*. Brotações apicais e segmentos nodais de 3,0 cm de comprimento foram coletadas de mudas, com dois a quatro meses de idade, do pomar clonal comercial e inoculados em meio de cultura MS. Os explantes foram transferidos para meio de cultura WV3, na ausência de BAP ou acrescido de 0,12; 0,25 e 0,50 μM , no cultivo inicial e nos dois subcultivos posteriores, visando a indução de brotações múltiplas. Os resultados indicaram que as concentrações reduzidas de BAP não promoveram grandes diferenças na indução de brotações múltiplas, não sendo recomendada a sua utilização. Tanto para brotações apicais como para segmentos nodais, houve uma redução da porcentagem de brotações no segundo subcultivo, sendo mais expressiva em segmentos nodais. Os segmentos nodais apresentaram maiores porcentagens de explantes com brotações no cultivo inicial e primeiro subcultivo. No entanto, o número médio de brotações foi maior para brotações apicais em todos os subcultivos (1,7 a 3,6) com alongamento médio 30%. Concluiu-se que segmentos nodais são recomendados para o estabelecimento *in vitro* e para a etapa de indução de brotações múltiplas deve ser utilizada a combinação dos dois tipos de explantes de *Pinus taeda*.

Palavras-chave: pinheiro, brotações apicais, segmentos nodais, citocinina.

CHAPTER 1
INFLUENCE OF 6-BENZYLAMINOPURINE CONCENTRATION AND EXPLANT
TYPE ON AXILLARY SHOOTS INDUCTION IN *Pinus taeda* L.

ABSTRACT

The axillary bud proliferation technique permits greater genetic stability and less somaclonal variation, which is important for large scale production of clones. Studies related to micropropagation by axillary bud proliferation of *Pinus taeda* are reduced. This study aimed to evaluate the effect of explant type and BAP concentrations on shoot multiplication from axillary buds of *Pinus taeda*. Apical shoots and nodal segments of 3 cm length were collected of two to four months old seedlings, from a commercial clonal orchard and inoculated on MS medium. The explants were transferred into WV3 culture medium, without BAP or supplemented with 0.12, 0.25 and 0.50 μM BAP, in the initial culture and after two subcultures, to induce multiple shoots. The results showed that the use of low concentrations of BAP did not promote major difference in the shoot induction and is not recommended. For both apical shoots and nodal segments, there was a reduction in the percentage of axillary shoots in the second subculture, especially in nodal segments. The nodal segments exhibited higher percentages of explants with shoots in the initial culture and first subculture. However, the average number of shoots was higher in apical shoots in all subcultures (1.7 to 3.6). There was an average of 30% elongation in all treatments. In conclusion, nodal segments are recommended for establishment *in vitro* and, for induction of axillary shoots, a combination of both types of explants should be used.

Keywords: loblolly pine, apical shoots, nodal segments, cytokinin

1 INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* de coníferas ainda está restrita à utilização de material juvenil e embrionário. Estudos relacionados com a micropropagação pela proliferação de gemas axilares de *Pinus taeda* são reduzidos, haja vista as limitações impostas pela espécie à propagação clonal. Os poucos trabalhos existentes estão relacionados com organogênese, utilizando material juvenil como fonte de explante, tais como várias partes do embrião (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978), embriões zigóticos (TANG *et al.*, 1998; TANG e OUYANG, 1999; TANG, 2000; TANG e GUO, 2001), cotilédones (MOTT e AMERSON, 1981; NEWTON *et al.*, 1989; JANG e TAINTER, 1991; FRAMPTON *et al.*, 1998; RAHMAN *et al.*, 2003), epicótilos (FRAMPTON *et al.*, 1998) e meristemas apicais (DHUMALE e NEWTON, 1996).

Uma das técnicas da micropropagação envolve a indução de gemas adventícias ou a proliferação de gemas axilares preexistentes. As espécies de *Pinus* possuem gemas axilares nas bases de suas acículas e podem ser induzidas a se desenvolver em brotações que então são alongadas e multiplicadas. Essas brotações crescem em meio artificial contendo ágar e todos os nutrientes necessários, reguladores vegetais e outras substâncias necessárias ao crescimento (MENZIES e AIMERS-HALLIDAY, 1997). Plantas regeneradas de ápices caulinares ou gemas axilares são geneticamente estáveis e livres de variação somaclonal, o que não ocorre em plantas regeneradas por organogênese e embriogênese somática (ABDULLAH *et al.*, 1986).

A presença da gema apical pode induzir um maior alongamento das brotações, enquanto a ausência possibilita o desenvolvimento de brotações axilares, como foi observado para algumas espécies de *Pinus* (McKELLAR *et al.*, 1994; SCALTSOYIANNES *et al.*, 1994). Quando a gema apical é mantida, a outra estratégia usada foi a subdivisão das brotações alongadas, o que a torna uma alternativa de multiplicação (BAXTER *et al.*, 1989).

Vários fatores influenciam a indução e proliferação de gemas axilares em coníferas, como o tipo de explante, a formulação do meio nutritivo e a concentração, o tipo e modo de aplicação de citocininas (WATT *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 1991).

Dentre as citocininas citadas para *Pinus*, a 6-benzilaminopurina (BAP) foi a mais utilizada. Outras citocininas testadas foram a cinetina (MEHRA-PALTA *et al.*,

1978; GUPTA e DURZAN, 1985; GLADFELTER e PHILLIPS, 1987), tidiazuron (SUL e KORBAN, 2004) e zeatina (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978). A zeatina e BAP foram as que proporcionaram melhores respostas na indução de brotações adventícias de *Pinus taeda* (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978) e também para *Pinus lambertiana* (GUPTA e DURZAN, 1985). Segundo Nandwani *et al.* (2001), além de BAP, a cinetina também promoveu boas respostas na multiplicação de *Pinus kesiya*.

A micropropagação a partir de gemas axilares de *Pinus patula* foi a melhor técnica quando comparada com multiplicação de gemas adventícias e embriogênese somática, por não envolver a etapa de formação de calos. Os melhores resultados de explantes com brotações (65%) foram obtidos em meio de cultura DCR, acrescido de 3,33 μM de BAP e o maior número médio de brotações (2) com 2,22 μM de BAP (McKELLAR *et al.*, 1994).

Segundo Baxter *et al.* (1989), a micropropagação a partir de gemas axilares de *Pinus oocarpa* foi eficiente, sendo que 13 clones produziram até 1000 explantes em um ano, com sete subcultivos em meio de cultura MS/2, acrescido de 10 μM de BAP e 0,025 μM de ANA por duas semanas.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer metodologia de multiplicação de brotações a partir de gemas axilares de *Pinus taeda*, comparando a presença e ausência de gema apical e concentrações reduzidas de BAP.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Mudas de dois a quatro meses de idade de pomar clonal comercial (Figura 1A), semeadas entre os meses de janeiro e março de 2009, foram fornecidas pela empresa Battistella Florestal, situada em Rio Negrinho, Estado de Santa Catarina. As mudas foram mantidas por 20 dias em casa de vegetação no Departamento de Botânica-UFPR. Foram pulverizadas a cada dois ou três dias com 1 g L^{-1} do fungicida Cercobin[®] e 24 horas antes da instalação dos experimentos, totalizando sete pulverizações.

2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal, do Departamento de Botânica, pertencente ao Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

Brotações apicais de 3,5 cm de comprimento foram coletadas, cortadas 90% de suas acículas e colocadas em frascos contendo água destilada. As brotações foram levadas para câmara de fluxo laminar e submetidas ao tratamento de desinfestação com imersão em soluções de 0,05% de HgCl_2 (cloreto de mercúrio) e 0,5% de NaOCl (hipoclorito de sódio) durante cinco minutos cada, em agitação constante. As soluções desinfestantes foram acrescidas de 0,1% Tween 20[®]. Após o tratamento de cada solução desinfestante, as brotações foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada.

Foram testados como explantes, brotações apicais e segmentos nodais de aproximadamente 3,0 cm de comprimento. Cada planta deu origem a um explante, sendo esse coletado da porção apical da muda. Nas brotações apicais foi mantida a gema apical enquanto que nos segmentos nodais a mesma foi retirada.

Os explantes foram inoculados na posição vertical em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose e $5,6 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico Himedia[®]. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e o meio esterilizado em autoclave a

121°C por 20 minutos. Os tubos de ensaio utilizados na fase de estabelecimento de culturas assépticas possuíam 15,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, com capacidade de 50 mL, contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura e tampados com tampas de polipropileno.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 30 repetições e 10 explantes por repetição, totalizando 300 explantes para brotações apicais e 300 para segmentos nodais.

Ao final de seis semanas foram avaliadas: porcentagem de contaminação bacteriana, fúngica, necrose, sobrevivência, porcentagem de explantes com brotações e número médio de brotações por explante (número final de brotações / número inicial de explantes).

2.3 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Os explantes sobreviventes, isentos de contaminação bacteriana ou fúngica, oriundos da fase de estabelecimento de culturas assépticas, foram utilizados para a fase de indução de brotações múltiplas. As brotações apicais e segmentos nodais foram inoculados em frascos contendo meio de cultura WV3 (COKE, 1996) (Anexo 1), acrescido ou não de 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,12; 0,25 e 0,50 μM . Os meios de cultura foram suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose e 5,6 g L^{-1} de ágar bacteriológico Himedia[®]. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e os meios esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Foram utilizados frascos que possuíam 12,5 cm de altura e 6,2 cm de diâmetro, com capacidade de 320 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno.

No cultivo inicial foram testados dois tipos de explantes (brotações apicais e segmentos nodais). Nos subcultivos seguintes, explantes com gema apical e alongados foram subdivididos em dois segmentos de aproximadamente 2,0 cm, sendo os apicais contendo gema apical e os basais sem a gema apical.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, com três explantes por frasco, cinco frascos por repetição e cinco repetições por tratamento. O controle e as três concentrações de BAP testadas foram aplicadas às parcelas e os três subcultivos nas subparcelas. Os resultados foram analisados separadamente para cada tipo de explante. Os

experimentos foram subcultivados duas vezes para o mesmo meio de cultura e para as mesmas concentrações do regulador. O tempo de cultivo foi de quatro semanas para o cultivo inicial e oito semanas para os subcultivos subsequentes.

A avaliação foi feita pela porcentagem de explantes com brotações axilares, pelo número médio de brotações por explante (número final de brotações / número inicial de explantes) e porcentagem de alongamento obtida pela fórmula: $(f - i) / i \cdot 100$, onde f é o comprimento final da brotação e i é o comprimento inicial.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico MSTATC®.

2.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Em todas as etapas, as culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de $19 \pm 2^\circ\text{C}$ (noite) e $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (dia), com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3 RESULTADOS

3.1 INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPLANTE NO ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

O tratamento de desinfestação foi eficiente com pouca contaminação bacteriana. Porém, ocorreu contaminação fúngica permitindo a sobrevivência em torno de 60% e não havendo influência do tipo de explante. A porcentagem de necrose foi quase nula para brotações apicais e segmentos nodais (Tabela 1).

A análise de variância revelou que houve diferença significativa entre os dois tipos de explantes testados, para duas variáveis avaliadas (Anexo 2). Os segmentos nodais apresentaram maior porcentagem de explantes com brotações axilares e o maior número médio de brotações por explante, quando comparados com brotações apicais (Tabela 1; Figuras 1B e 1C).

TABELA 1 – RESPOSTA DO ESTABELECIMENTO *in vitro* DE BROTAÇÕES APICAIS E SEGMENTOS NODAIS DE *Pinus taeda* INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA MS, APÓS SEIS SEMANAS DE CULTIVO.

Tipo de explante	Contaminação		Necrose (%)	Sobrevivência (%)	Explantes com brotações axilares (%)	Número médio de brotações por explante
	Bactéria (%)	Fungo (%)				
Brotações apicais	7,0	31,0	0,3	61,7	38,3 ± 18,3 b	1,5 ± 0,3 b
Segmentos nodais	8,3	30,7	0,0	61,0	92,0 ± 13,0 a	3,7 ± 0,4 a

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.2 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Os resultados da análise de variância da porcentagem de explantes com brotações, do número médio de brotações por explante e da porcentagem de alongamento, comparando diferentes concentrações de BAP e subcultivos, são apresentados no Anexo 3 para as brotações apicais e no Anexo 4 para os segmentos nodais.

A análise de variância revelou que a interação dos fatores concentrações de BAP e subcultivos não foi significativa para nenhuma das variáveis avaliadas, tanto

para brotações apicais como para segmentos nodais, indicando que esses fatores são independentes.

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) revelou que as brotações apicais inoculadas em meio de cultura WV3, contendo $0,25 \mu\text{M}$ de BAP, obtiveram maior porcentagem de explantes com brotações axilares (72,4%), quando comparada ao tratamento controle (56,4%) (Tabela 2).

Os segmentos nodais apresentaram melhores respostas em relação às brotações apicais, acima de 75% dos explantes com brotações axilares, sendo que os tratamentos não diferiram significativamente entre si (Figura 1D e 1E; Tabela 2).

A comparação das médias da porcentagem de explantes com brotações, entre os subcultivos, revelou diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para as brotações apicais, a porcentagem de explantes formando brotações no primeiro subcultivo foi significativamente maior a do cultivo inicial, enquanto que os segmentos nodais apresentaram respostas próximas a 100% dos explantes com brotações axilares no cultivo inicial e primeiro subcultivo, sendo estatisticamente superiores ao segundo subcultivo (41,2%) (Tabela 2).

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES AXILARES DE *Pinus taeda*, OBTIDA EM MEIO DE CULTURA WV3, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS DOIS SUBCULTIVOS POSTERIORES.

Tipo do explante no cultivo inicial	BAP (μM)	Cultivo inicial ¹	1º Subcultivo ²	2º Subcultivo ²	Média geral
Brotações apicais	0,00	48,9	63,9	56,4	56,4 \pm 14,8 b
	0,12	57,8	64,8	66,7	63,1 \pm 16,8 ab
	0,25	70,8	80,0	66,5	72,4 \pm 11,5 a
	0,50	60,0	84,5	62,7	69,1 \pm 19,1 ab
Média geral		59,4 \pm 19,5 B	73,3 \pm 14,0 A	63,1 \pm 13,0 AB	
Segmentos nodais	0,00	96,7	100,0	38,1	78,3 \pm 37,3 a
	0,12	96,7	100,0	35,3	77,3 \pm 36,8 a
	0,25	100,0	100,0	42,8	80,9 \pm 37,3 a
	0,50	100,0	98,3	48,6	82,3 \pm 38,3 a
Média geral		98,4 \pm 26,4 A	99,6 \pm 30,1 A	41,2 \pm 14,0 B	

¹ Quatro semanas cultivo

² Oito semanas de cultivo

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

Para a variável número médio de brotações por explante, não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de BAP testadas e o controle, tanto para as brotações apicais como para os segmentos nodais.

Comparando os tipos de explantes, brotações apicais apresentaram melhor resposta do que os segmentos nodais, ao final dos subcultivos (Tabela 3).

Ao comparar as médias dos subcultivos, o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) revelou que o número médio de brotações do primeiro e segundo subcultivo foi significativamente superior ao cultivo inicial, quando foram utilizadas brotações apicais como explantes. No entanto, para os segmentos nodais, o número médio de brotações do cultivo inicial foi superior ao dos subcultivos seguintes (Tabela 3).

TABELA 3 – NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DE *Pinus taeda*, OBTIDO EM MEIO DE CULTURA WV3 ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NO CULTIVO INICIAL E NOS DOIS SUBCULTIVOS POSTERIORES.

Tipo do explante no cultivo inicial	BAP (μM)	Cultivo inicial ¹	1º Subcultivo ²	2º Subcultivo ²	Média Geral
Brotações apicais	0,00	1,7	2,7	2,4	2,3 \pm 0,7 a
	0,12	1,8	3,0	2,7	2,5 \pm 0,9 a
	0,25	2,2	3,3	3,4	3,0 \pm 0,6 a
	0,50	2,1	3,6	3,0	2,9 \pm 0,8 a
Média Geral		2,0 \pm 0,5 B	3,2 \pm 0,7 A	2,9 \pm 0,6 A	
Segmentos nodais	0,00	1,5	1,2	1,2	1,3 \pm 0,2 a
	0,12	1,5	1,3	1,2	1,3 \pm 0,2 a
	0,25	1,4	1,2	1,2	1,3 \pm 0,2 a
	0,50	1,3	1,2	1,3	1,3 \pm 0,3 a
Média Geral		1,4 \pm 0,3 A	1,2 \pm 0,1 B	1,2 \pm 0,2 B	

¹ Quatro semanas de cultivo

² Oito semanas de cultivo

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

Quanto à variável porcentagem de alongamento, não houve diferença significativa entre as concentrações de BAP testadas e o controle, com média em torno de 30% de alongamento. Comparando as médias dos subcultivos, o cultivo inicial e segundo subcultivo apresentaram as maiores porcentagens de alongamento pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (TABELA 4).

TABELA 4 – PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES APICAIS DE *Pinus taeda* INOCULADAS EM MEIO WV3, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP.

BAP (μM)	Cultivo inicial ¹ (%)	1º Subcultivo ² (%)	2º Subcultivo ² (%)	Média Geral (%)
0,00	31,2	23,6	39,1	31,3 \pm 9,2 a
0,12	30,9	24,4	33,8	29,7 \pm 6,7 a
0,25	29,8	19,7	27,4	25,6 \pm 7,3 a
0,50	29,9	23,6	31,5	28,4 \pm 5,1 a
Média Geral	30,4 \pm 5,2 A	22,8 \pm 6,0 B	33,0 \pm 6,8 A	

¹ Quatro semanas de cultivo

² Oito semanas de cultivo

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

4 DISCUSSÃO

Foram utilizados explantes coletados de mudas de dois a quatro meses de idade para induzir o desenvolvimento de brotações axilares, por ter sido verificado em testes preliminares que explantes de maior idade apresentaram respostas mais lentas e maior contaminação microbiana. Para coníferas e lenhosas em geral, explantes juvenis têm apresentado melhores respostas *in vitro* (EL-NIL, 1982; LAPP *et al.*, 1996; BONGA *et al.*, 2010).

O tipo de explante utilizado inicialmente influenciou as respostas de indução de brotações axilares durante os subcultivos. Os segmentos nodais, em virtude da superação da dominância apical, apresentaram inicialmente uma maior porcentagem de explantes com brotações axilares (90 a 100%) e maior número médio de brotações por explante (3,7), comparados às brotações apicais. Resposta semelhante foi obtida para *Pinus brutia* x *Pinus halepensis*, provavelmente em decorrência da superação da dominância apical quando retirada a gema apical (SCALTSOYIANNES *et al.*, 1994; GEORGE *et al.*, 2008). McKellar *et al.* (1994) também observaram melhores respostas em segmentos nodais do que em brotações apicais de *Pinus patula*, comparando o número médio de brotações nos dois tipos de explantes.

O número de subcultivos influenciou as respostas de indução de brotações axilares. No segundo subcultivo, segmentos nodais apresentaram uma queda significativa na porcentagem de explantes com brotações axilares (41,2%) e no número médio de brotações por explante (1,2). Essa redução também ocorreu com brotações apicais, no entanto foi mais expressiva para segmento nodal, indicando ser um fator limitante para esse tipo de explante. Segundo George (1996), em lenhosas, é comum ocorrer uma diminuição na taxa de multiplicação em subcultivos, depois de atingir um valor máximo.

Na etapa de indução de brotações axilares, ao contrário da etapa de estabelecimento *in vitro*, os segmentos nodais não apresentaram um aumento no número médio de brotações por explante, ficando em torno de 1,3 brotações por explante no final dos subcultivos. Embora a superação da dominância apical tenha proporcionado a formação de até três brotações axilares por explante no estabelecimento *in vitro*, na etapa de multiplicação essas brotações não alongaram

ou não puderam ser individualizadas, permanecendo a mesma taxa de multiplicação.

As brotações axilares se desenvolveram ao longo de todo o eixo do explante, contudo, em brotações apicais, ocorreu maior desenvolvimento preferencialmente nas regiões medianas e com maior frequência na porção basal. Esse efeito provavelmente deve estar relacionado com um gradiente de juvenilidade presente próxima à região basal do explante, a exemplo que ocorre em árvores adultas ou em plântulas (HARTMANN *et al.*, 2002, GEORGE *et al.*, 2008).

Os maiores números médio de brotações por explante do presente trabalho (2 a 3) foram obtidos com brotações apicais, sendo que não houve diferença entre o controle e as concentrações de BAP testadas (0,12; 0,25 e 0,50 μM). Resultado semelhante ocorreu com *Pinus lambertiana*, no entanto, em meio de cultura DCR acrescido de concentração mais elevada de BAP (2,22 μM), após oito semanas (GUPTA e DURZAN, 1985).

Os resultados obtidos indicaram que tanto as baixas concentrações de BAP como a ausência desse regulador podem promover a indução de brotações axilares. Contudo, as brotações juvenis de *Pinus taeda* devem ter um nível endógeno de citocininas suficiente para promover a indução, pois as concentrações mais elevadas podem ocasionar necrose ou até mesmo um menor desenvolvimento das brotações axilares, como também foi observado por Lapp *et al.* (1996) em *Pinus monticola*. Segundo Baxter *et al.* (1989), para *Pinus oocarpa*, *Pinus caribaea* e *Pinus tecunumanii* houve multiplicação de gemas axilares mesmo em concentrações baixas de citocininas (0,1 a 5,0 μM BAP), evitando assim as altas concentrações como aquelas utilizadas em outras técnicas de micropropagação, como a organogênese.

De uma maneira geral, ocorreu um pequeno alongamento das brotações em meio de cultura WV3. No entanto, as concentrações reduzidas de BAP testadas no presente trabalho não influenciaram o alongamento. As citocininas em concentrações elevadas podem promover maior desenvolvimento de gemas, porém podem inibir o alongamento das brotações (ŽEL *et al.*, 1988).

5 CONCLUSÕES

O tipo de explante influenciou as respostas das etapas de estabelecimento *in vitro* e de indução de brotações axilares.

Na etapa de estabelecimento *in vitro* recomenda-se utilizar segmentos nodais e na etapa de indução de brotações axilares, brotações apicais.

O número de subcultivos influenciou as respostas de indução de brotações, sendo que no segundo subcultivo ocorreu uma redução, sendo essa mais expressiva para segmentos nodais.

De uma maneira geral, as concentrações de BAP não influenciaram nas respostas de indução de brotações e alongamento e o controle apresentou respostas semelhantes às concentrações testadas, tornando-se desnecessário o uso desse regulador.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. A.; GRACE, J.; YEOMAN, M. M. Rapid micropropagation of Calabrian pine from primary and secondary buds on shoot explants. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 16, p. 637-641, 1986.

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

BONGA, J. M.; KLIMASZEWSKA, K. K.; ADERKAS, P. von. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 241-254, 2010.

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines**. USA Patent 5.534.434, 1996.

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

EL-NIL, A. M. M. **Method for asexual reproduction of coniferous trees**. U.S. Patent 5.353.184, 1982.

FRAMPTON, L. J. Jr.; AMERSON, H. V.; LEACH, G. N. Tissue culture method affects *ex vitro* growth and development of loblolly pine. **New Forests**, v. 16, p. 125-138, 1998.

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

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**, 2 ed., v.2, Springer. 1361pp. 1996.

GLADFELTER, H. J.; PHILLIPS, G, C. De novo shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Mill. *in vitro* I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 163-166, 1987.

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

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. Jr.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and practices**, 7 ed., Prentice-Hall. 880p. 2002.

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

LAPP, M. S.; MALINEK, J.; COFFEY, M. Microculture of western white pine (*Pinus monticola*) by induction of shoots on bud explants from 1-to-7-year-old-trees. **Tree Physiology**, v. 16, p. 447-451, 1996.

LIN, Y.; WAGNER, M. R.; HEIDMANN, L. J. In vitro formation of axillary buds by immature shoots of Ponderosa pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 161-166, 1991.

McKELLAR, D. S.; HERMAN, B.; WATT, M. P. Towards a protocol for the micropropagation of *Pinus patula*. **South African Forestry Journal**, v. 171, p. 33-41, 1994.

MEHRA-PALTA, A.; SMELTZER, R. H.; MOTT, R. L. Hormonal control of induced organogenesis experiments with excised plant parts of loblolly pine. **Tappi Journal**, v. 61, n. 1, p. 37-40, 1978.

MENZIES, M. I.; AIMERS-HALLIDAY, J. A. Propagation options for clonal forestry with *Pinus radiata*. **IUFRO '97 Genetics of radiata pine**, New Zealand, p. 256-263, 1997.

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

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

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

NEWTON, R. J.; SEN, S.; FONG, F.; NEUMAN, P. Enhancement of shoot organogenesis in conifers. **20th Southern Forest Tree Improvement Conference**, p. 168-175, 1989.

RAHMAN, M. S.; MESSINA, M. G.; NEWTON, R. J. Performance of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seedlings and micropropagated plantlets on an east Texas site I. Above- and belowground growth. **Forest Ecology and Management**, v. 178, p. 245-255, 2003.

SCALTSOYIANNES, S.; PANETSOS, K.; ECONOMOU, A.; TSOULPHA, P. Micropropagation of the pine hybrid *Pinus brutia* (Ten) x *Pinus halepensis* (Mill) by culturing fascicle shoots. **Annals of Forest Science**, v. 51, p. 175-182, 1994.

SUL, III-W.; KORBAN, S. S. Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 197-205, 2004.

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

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

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

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

WATT, M. P.; RAMGAREEB, S.; HOPE, B.; BLAKEWAY, F. C.; DENISON, N. P. Micropropagation via axillary bud proliferation from seedlings and juvenile shoots of *Pinus patula* Schiede et Deppe. **Southern African Forestry Journal**, n. 181, p. 1-5, 1998.

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

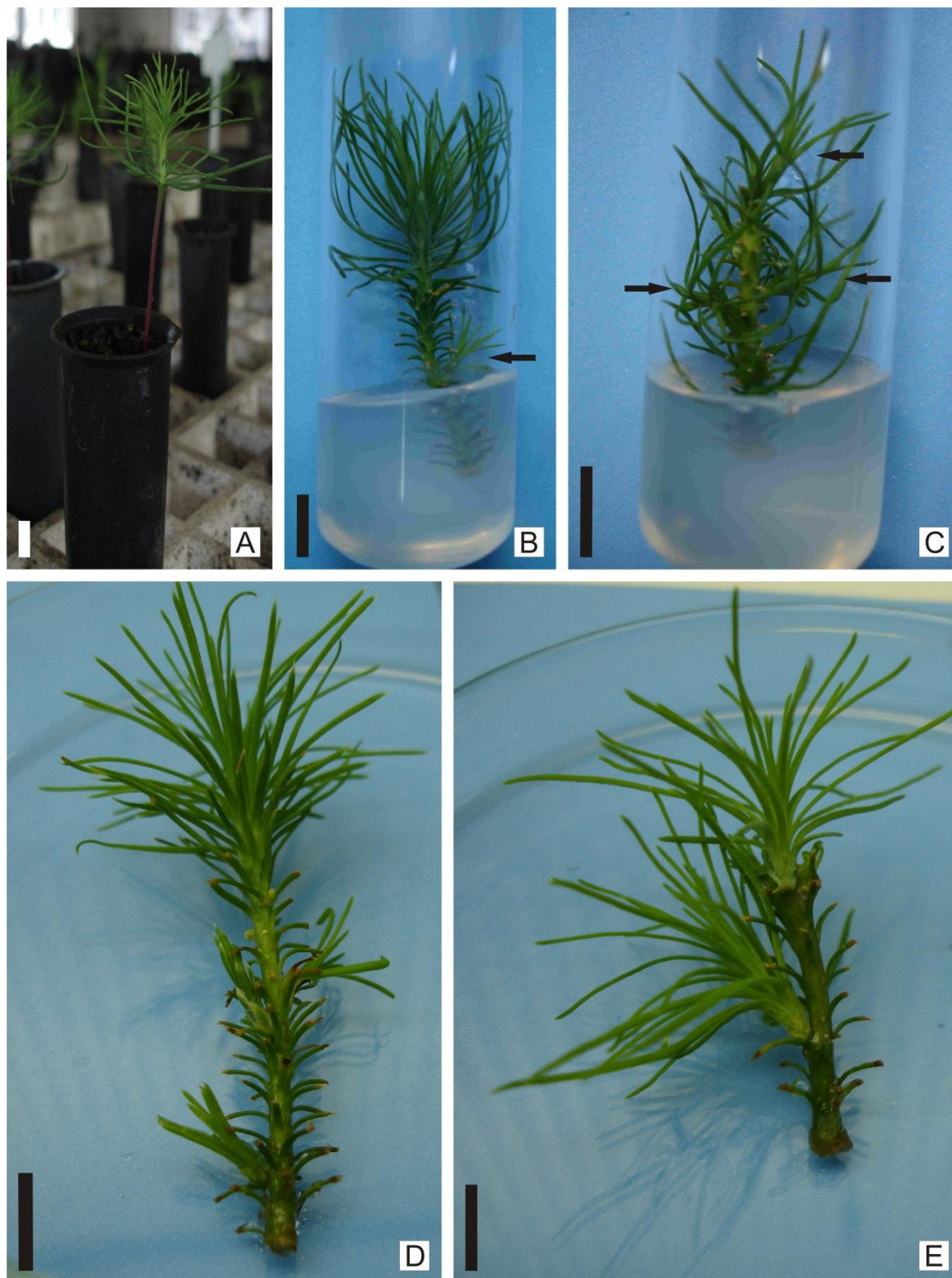


FIGURA 1 – MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda* L.: A – MUDAS DE DOIS MESES DE IDADE MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E UTILIZADAS COMO FONTE DE EXPLANTES; BROTAÇÃO APICAL (B) E SEGMENTO NODAL (C), INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA MS, APRESENTANDO A FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES (SETA) APÓS SEIS SEMANAS DE CULTIVO; D – BROTAÇÃO APICAL COM BROTAÇÕES AXILARES DENSENVOLVENDO AO LONGO DO CAULE, EM MEIO DE CULTURA WV3 SEM BAP, NO CULTIVO INICIAL; E – SEGMENTO NODAL COM BROTAÇÕES AXILARES DESENVOLVIDAS EM MEIO DE CULTURA WV3, ACRESCIDO DE $0,50 \mu\text{M}$ BAP, NO SEGUNDO SUBCULTIVO. BARRA: 1,0 cm.

CAPÍTULO 2
EFEITO DAS FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA NO
ESTABELECIMENTO *in vitro* E INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES
DE *Pinus taeda* L.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o melhor tipo de explante, formulação de meio de cultura, e concentração de BAP para as etapas de estabelecimento *in vitro* e multiplicação de gemas axilares de *Pinus taeda*. Brotações apicais e segmentos nodais de 3,0 cm de comprimento foram coletados de mudas de dois a quatro meses de idade e inoculados em meio de cultura MS, DCR, WV3 ou WV5, no estabelecimento *in vitro*. Os explantes foram transferidos para os meios DCR, WV3 e WV5 acrescidos de BAP (0 a 2,00 μM), visando a indução de brotações múltiplas. O meio WV5 promoveu a melhor taxa de sobrevivência (86%) e melhor porcentagem de alongamento (85,2%) no estabelecimento *in vitro*. Segmentos nodais obtiveram maiores porcentagens de explantes com brotações (100%) e maior número médio de brotações por explante (4,3 a 5,8). Na etapa de indução de brotações múltiplas, as respostas foram semelhantes em todos os meios de cultura e concentrações de BAP testadas. No entanto, o uso alternado de concentrações de BAP (2,00; 0,25 e 1,00 μM em cada subcultivo) em meio de cultura WV5, pode aumentar a produção de brotações sendo a estimativa de 7530 a partir de 100 explantes, em nove meses de cultivo. O alongamento aumentou com o número de subcultivos, sendo a maior porcentagem com o meio WV5, na ausência de BAP (155%) no segundo subcultivo. Com isso, concluiu-se que a multiplicação de gemas axilares de *Pinus taeda* foi eficiente sendo que o meio de cultura WV5 promoveu melhores respostas no estabelecimento *in vitro* e no alongamento das brotações, sendo recomendada a subdivisão das brotações em segmentos.

Palavras-chaves: micropropagação, gemas axilares, pinheiro, 6-benzilaminopurina.

CHAPTER 2
EFFECT OF CULTURE MEDIA FORMULATIONS FOR THE *in vitro*
ESTABLISHMENT AND AXILLARY SHOOTS INDUCTION IN *Pinus taeda* L.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the best explant type, formulation of culture medium and BAP concentration for *in vitro* establishment and multiplication of axillary buds of *Pinus taeda*. Apical shoots and nodal segments of 3 cm length were collected of two to four months old seedlings, from a commercial clonal orchard and inoculated in MS, DCR, WV3 or WV5 medium, for *in vitro* establishment. The explants were transferred to DCR, WV3 and WV5 media supplemented with BAP (0 to 2.00 mM) to induce multiple shoots. The WV5 medium provided better survival rate (86%) and the best elongation percentage (85.2%), for *in vitro* establishment. Nodal segments had higher percentages of explants with shoots (100%) and average number of shoots per explant (4.3 to 5.8) compared with apical shoots. For induction of multiple shoots, the responses were similar in all culture media and BAP concentrations tested. However, the alternated use of BAP (2.0, 0.25 and 1.0 μM in each subculture) in WV5 culture medium can increase the production of shoots being the estimated at 7530 from 100 explants, in nine months of cultivation. The shoot elongation increased with the number of subcultures, with higher elongation percentage on WV5 medium BAP-free (155%) in the second subculture. Thus, we concluded that the multiplication of axillary buds of *Pinus taeda* was efficient and that the WV5 culture medium promoted best responses for *in vitro* establishment and elongation of shoots and recommended the subdivision of shoots in segments.

Keywords: micropropagation, axillary buds, loblolly pine, BAP.

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação a partir de gemas axilares possui a vantagem de ser um método mais simples quando comparado aos outros, pois além de utilizar meristemas pré-formados também evita de usar elevadas concentrações de citocininas para o desenvolvimento das brotações axilares (BAXTER *et al.*, 1989). Outra vantagem é que plantas regeneradas de ápices caulinares ou gemas axilares são geneticamente estáveis e livres de variação somaclonal, o que não ocorre em plantas regeneradas por organogênese e embriogênese somática (ABDULLAH *et al.*, 1986).

A escolha dos sais e compostos orgânicos que compõem o meio de cultura pode influenciar o desenvolvimento *in vitro* e o sucesso da micropropagação. Diferentes espécies têm necessidades nutricionais específicas para seu desenvolvimento e morfogênese (SUL e KORBAN, 2004). Como o meio nutritivo é uma parte essencial do cultivo *in vitro*, várias formulações salinas têm sido desenvolvidas nas culturas de coníferas (COKE, 1996a). Alguns dos meios testados para *Pinus taeda* foram GD modificado (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978), LP (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977), SH (SCHENK e HILDEBRANDT, 1972) e DCR (GUPTA e DURZAN, 1985). As formulações GD e SH foram inicialmente desenvolvidas para outras espécies de Angiospermas, no entanto, também têm sido utilizadas com *Pinus caribaea* (WEBB e SANTIAGO, 1983) e *Pinus taeda* (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978) apresentando boas respostas. Os meios de cultura WV3 (COKE, 1996b) e WV5 (COKE, 1996a) foram desenvolvidos com combinações de sais e compostos orgânicos para otimizar as respostas *in vitro* de *Pinus taeda*.

Vários experimentos testando diferentes meios de cultura têm sido realizados para *Pinus* e as respostas têm variado dependendo da espécie. McKellar *et al.* (1994) verificaram que o meio de cultura DCR apresentou maior porcentagem de explantes com brotações de *Pinus patula*, quando comparado com os meios MS, SH e LP. O meio DCR também foi melhor para *Pinus monticola*, quando comparado com os meios LV, SH e GD (LAPP *et al.*, 1996). Watt *et al.* (1998), assim como McKellar *et al.* (1994) também encontraram melhores respostas de *Pinus patula* em meio de cultura DCR, quando comparado com o GD.

O meio de cultura MS foi superior ao LP e SH na indução de brotações de *Pinus kesiya* (NANDWANI *et al.*, 2001). Sul e Korban (2004) também obtiveram superioridade do meio de cultura MS com sais reduzidos pela metade para *Pinus pinea*, quando compararam com os meios SH, GD, WPM, MS e B5.

A multiplicação de culturas *in vitro* geralmente depende da concentração utilizada de citocinina, que promove a superação da dominância apical e estimula a formação e desenvolvimento de brotações axilares (LIN *et al.*, 1991; GEORGE, 1996; GEORGE *et al.*, 2008).

A 6-benzilaminopurina (BAP) é comumente usada na etapa de indução de brotações de *Pinus* apresentando boas respostas. Entretanto, respostas diferentes foram encontradas para várias espécies de *Pinus* quando testadas diferentes concentrações de BAP, variando de 0,44 μM a concentrações maiores que 10 μM (BAXTER *et al.*, 1989; JANG e TAINTER, 1991; McKELLAR *et al.*, 1994; TANG e GUO, 2001; SUL e KORBAN, 2004; ZHANG *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi determinar a melhor formulação de meio de cultura para a etapa de estabelecimento *in vitro*, o tipo de explante e a influência das concentrações de BAP na multiplicação de brotações a partir de gemas axilares de *Pinus taeda*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

As mudas de *Pinus taeda* com dois a quatro meses de idade, semeadas entre os meses de janeiro e março de 2009, foram fornecidas pela empresa Battistella Florestal e eram provenientes de pomar clonal comercial, situado em Rio Negrinho, Estado de Santa Catarina. As mudas foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Botânica – UFPR durante 30 dias, pulverizadas com 1 g L⁻¹ do fungicida Cercobin[®] a cada dois dias, totalizando 12 pulverizações, sendo que a última pulverização foi realizada 24 horas antes da coleta do material.

2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

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

Brotações apicais de 3,5 cm de comprimento foram coletadas, 90% das acículas foram cortadas e os explantes foram colocados em frascos contendo água destilada. Em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com imersão em solução de 0,05% de HgCl₂ (cloreto de mercúrio), seguido de 0,5% de NaOCl (hipoclorito de sódio) durante cinco minutos em agitação constante, respectivamente. As soluções desinfestantes foram acrescidas de 0,1% de Tween 20[®]. Após a imersão em cada solução desinfestante foram feitas três lavagens em água destilada esterilizada.

Brotações apicais e segmentos nodais de aproximadamente 3,0 cm de comprimento. Cada planta deu origem a um explante, sendo esse coletado da porção apical da muda. Os explantes foram inoculados na posição vertical em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), DCR (GUPTA e DURZAN, 1985), WV3 (COKE, 1996b) ou WV5 (COKE, 1996a) (Anexo 1), acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Himedia[®]. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e os meios esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os tubos de ensaio

possuíam 15,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, fechados com tampas de polipropileno.

Após 12 semanas de cultivo avaliou-se: porcentagem de contaminação bacteriana e fúngica, de necrose, de sobrevivência, porcentagem de explantes com brotações axilares, número médio de brotações por explante (número final de brotações / número inicial de explantes), aumento do comprimento médio (comprimento final – comprimento inicial), número médio de segmentos por brotação e porcentagem de alongamento obtida pela fórmula: $(f - i) / i \cdot 100$, onde f é o comprimento final da brotação e i é o comprimento inicial.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de dois tipos de explantes e quatro meios de cultura para as variáveis porcentagem de explantes com brotações axilares e número médio de brotações por explante. Para as demais variáveis foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada tratamento consistiu de cinco repetições e dez explantes por repetição.

2.3 EFEITO DE TRÊS FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA E DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Os explantes sobreviventes da fase de estabelecimento de culturas assépticas e isentos de contaminação microbiana foram utilizados na indução de brotações axilares. Os explantes foram subdivididos em segmentos de 1,0 a 1,5 cm de comprimento e inoculados em frascos contendo meio de cultura DCR, WV3 ou WV5, combinado ou não com 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,12; 0,25 e 0,50 μM . Os meios de cultura foram acrescidos de 30 g L^{-1} de sacarose e 5,6 g L^{-1} de ágar bacteriológico Himedia[®]. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e os meios esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. As brotações foram inoculadas em frascos medindo 12,5 cm de altura e 6,2 cm de diâmetro, com capacidade de 320 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e tampados com tampas de polipropileno.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em parcelas subdividas, constituído de quatro repetições com cinco frascos e três explantes em cada frasco. Nas parcelas foram aplicadas as quatro concentrações de BAP e nas subparcelas foram aplicados os dois tipos de subcultivo. O resultados

foram analisados separadamente para cada um dos três meios de cultura testados. Foi realizado um subcultivo após oito semanas para os mesmos meios de cultura e concentrações do regulador vegetal.

Ao final de cada subcultivo foram avaliados: porcentagem de explantes com brotações axilares; número médio de brotações por explante (número final de brotações / número inicial de explantes); e porcentagem de alongamento obtida pela fórmula: $(f - i) / i \cdot 100$, onde f é o comprimento final da brotação e i é o comprimento inicial.

2.4 EFEITO DO MEIO DE CULTURA WV5 ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

O meio de cultura com melhores respostas (WV5) foi utilizado com concentrações mais elevadas de BAP. Os tratamentos foram: controle (sem BAP); 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 μM de BAP. O meio de cultura foi acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose e 5,6 g L^{-1} de ágar bacteriológico Himedia[®]. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e o meio esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. As brotações foram inoculadas em frascos medindo 12,5 cm de altura e 6,2 cm de diâmetro, com capacidade de 320 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e tampados com tampas de polipropileno.

Foram realizados dois subcultivos após oito semanas, para o mesmo meio de cultura e mesmas concentrações de BAP. Ao final de cada subcultivo foi avaliada: porcentagem de explantes com brotações axilares; número médio de brotações por explante (número de brotações axilares / número de explantes sobreviventes no subcultivo) e porcentagem de alongamento obtida pela fórmula: $(f - i) / i \cdot 100$, onde f é o comprimento final da brotação e i é o comprimento inicial.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em parcelas subdividas, com quatro explantes por frasco, três frascos por repetição e sete repetições por tratamento. Nas parcelas foram aplicadas as quatro concentrações de BAP e nas subparcelas foram aplicados os três subcultivos.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico MSTATC[®].

2.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $19\pm 2^{\circ}\text{C}$ (noite) e $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ (dia), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40\ \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E DO MEIO DE CULTURA NO ESTABELECIMENTO *in vitro* DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Os resultados da análise de variância da porcentagem de sobrevivência de brotações apicais e segmentos nodais, comparando os diferentes meios de cultura, são apresentados no Anexo 5.

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) revelou que as brotações apicais cultivadas em meio de cultura WV5 apresentaram maior porcentagem de sobrevivência (86%) quando comparada com a dos meios DCR e MS. O meio de cultura WV5 também promoveu maior porcentagem de sobrevivência dos segmentos nodais quando comparada a dos meios WV3 e MS (Tabela 1).

Os explantes inoculados no meio de cultura MS apresentaram a menor porcentagem de sobrevivência para os dois tipos de explantes, devido à elevada porcentagem de contaminação fúngica (Tabela 1). Essa formulação não foi utilizada nas etapas posteriores porque em testes preliminares ocorriam elevadas porcentagens de necrose na indução de brotações.

A porcentagem de contaminação bacteriana e de necrose foi baixa tanto para as brotações apicais como para os segmentos nodais, em todos os meios de cultura testados (Tabela 1).

TABELA 1 – PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE EXPLANTES DE *Pinus taeda* INOCULADOS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, NO ESTABELECIMENTO *in vitro*, APÓS 90 DIAS DE CULTIVO.

Meios de cultura	Brotações apicais (%)			Segmentos nodais (%)				
	Sobrevivência	Contaminação		Necrose	Sobrevivência	Contaminação		Necrose
		fungo	bactéria			fungo	bactéria	
WV5	86,0 ± 5,5 a	8,0	4,0	2,0	76,0 ± 5,5 a	22,0	2,0	0,0
WV3	72,0 ± 13,0 ab	20,0	8,0	0,0	50,0 ± 12,3 b	42,0	6,0	2,0
DCR	52,0 ± 8,4 b	38,0	8,0	2,0	64,0 ± 11,4 ab	28,0	8,0	0,0
MS	50,0 ± 18,7 b	44,0	6,0	0,0	46,0 ± 11,4 b	50,0	4,0	0,0

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

Os resultados da análise de variância da porcentagem de explantes com brotações e do número médio de brotações por explante, comparando diferentes

meios de cultura e tipos de explantes, são apresentados no Anexo 6 e os resultados da porcentagem de alongamento, aumento do comprimento médio em centímetros e do número médio de segmentos por brotação no Anexo 7.

A análise de variância da porcentagem de explantes com brotações revelou que a interação dos fatores meio de cultura e tipo de explante não foi significativa, indicando que esses fatores são independentes. Nesse caso, os segmentos nodais apresentaram 100% de explantes com brotações axilares enquanto que as brotações apicais apresentaram em média 41,6% (Tabela 2). A comparação de médias da porcentagem de explantes com brotações, entre os meios de cultura testados, não apresentou diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Tabela 2).

Para a variável número médio de brotações por explante, a análise de variância mostrou que houve interação significativa entre os fatores meios de cultura e o tipo de explante, indicando que os fatores não são independentes.

O número médio de brotações por explante dos segmentos nodais foi significativamente superior ao das brotações apicais para todos os meios de cultura testados (Tabela 2).

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) revelou que os segmentos nodais inoculados em meio de cultura WV3, WV5 e MS apresentaram o número médio de brotações por explante estatisticamente superior ao do meio DCR (Figura 2B; Tabela 2).

Para as brotações apicais, o número médio de brotações dos meios de cultura WV3 e WV5 foram significativamente superiores ao do meio DCR (Tabela 2).

TABELA 2 – EFEITO DOS MEIOS DE CULTURA E DO TIPO DE EXPLANTE NA FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES EM *Pinus taeda*, NO ESTABELECIMENTO *in vitro*, APÓS 90 DIAS DE CULTIVO.

Meio de Cultura	Explantes com brotações axilares (%)			Número médio de brotações por explante	
	Brotações apicais	Segmentos nodais	Média dos meios	Brotações apicais	Segmentos nodais
WV5	55,6	100,0	77,8 ± 45,5 a	1,9 ± 0,4 a B	5,0 ± 0,5 b A
WV3	57,4	100,0	78,7 ± 42,5 a	2,0 ± 0,3 a B	5,8 ± 0,5 a A
DCR	14,7	100,0	57,4 ± 57,6 a	1,2 ± 0,3 b B	4,3 ± 0,3 c A
MS	38,7	100,0	69,4 ± 49,1 a	1,6 ± 0,4 ab B	5,5 ± 0,6 ab A
Média dos Explantes	41,6 ± 28,3 B	100,0 ± 45,9 A			

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre os meios de cultura e as maiúsculas na horizontal entre os tipos de explantes.

A melhor resposta de alongamento das brotações apicais ocorreu em meio de cultura WV5 (85,2%) com um aumento do comprimento médio de 3,0 cm, sendo significativamente superior ao dos demais meios de cultura testados (Tabela 3; Figura 2A). O meio de cultura MS foi o menos eficiente no alongamento de brotações apicais (26,8%) (Tabela 3).

As brotações alongadas foram seccionadas em segmentos, sendo que com o meio de cultura WV5 foi obtido maior número médio de subdivisões das brotações, em torno de seis segmentos por explante, sendo estatisticamente superior ao dos outros meios de cultura testados (Tabela 3).

TABELA 3 – EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO AUMENTO DE BROTAÇÕES APICAIS, DE *Pinus taeda*, APÓS 90 DIAS DE CULTIVO.

Meios de cultura	Alongamento (%)	Aumento do comprimento médio das brotações (cm)	Número médio de segmentos por brotação
WV5	85,2 ± 19,9 a	3,0 ± 0,8 a	5,8 ± 0,7 a
WV3	54,5 ± 7,8 b	1,8 ± 0,2 b	4,4 ± 0,6 b
DCR	45,3 ± 14,0 bc	1,5 ± 0,5 bc	3,6 ± 0,6 bc
MS	26,8 ± 7,9 c	0,9 ± 0,3 c	3,3 ± 0,3 c

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

3.2 EFEITO DE TRÊS FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA E DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Os resultados da análise de variância da porcentagem de explantes com brotações, do número médio de brotações por explante e da porcentagem de alongamento, para as diferentes concentrações de BAP e subcultivos testados, são apresentados nos Anexos 8, 9 e 10. A análise de variância da porcentagem de explantes com brotações revelou que a interação dos fatores concentração de BAP e subcultivos não foi significativa para todos os meios de cultura testados, indicando que são independentes.

Os resultados da comparação de médias da porcentagem de explantes com brotações obtida nos meios de cultura WV3 e DCR, indicaram que a presença de BAP não influenciou nas respostas, pois não ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Contudo, as brotações inoculadas em meio de cultura WV5,

acrescido de 0,50 μM de BAP, apresentaram porcentagem de explantes com brotações significativamente superior à do controle (Tabela 4).

Comparando os subcultivos, a porcentagem de explantes formando brotações axilares do meio de cultura WV5 obtida no do cultivo inicial, foi superior à do primeiro subcultivo, enquanto que não houve diferença significativa da porcentagem de explantes formando brotações nos meios de cultura WV3 e DCR, tanto para o cultivo inicial como para o primeiro subcultivo (Tabela 4).

De uma maneira geral, os explantes inoculados nos meios de cultura com 0,50 μM de BAP apresentaram os melhores resultados de formação de brotações axilares.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES AXILARES DE *Pinus taeda*, OBTIDA NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, ACRESCIDOS OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO.

Meios de cultura	BAP (μM)	Cultivo inicial	1º Subcultivo	Média Geral
WV5	0,00	59,2	46,7	53,0 \pm 11,8 b
	0,12	71,4	51,6	61,5 \pm 18,1 ab
	0,25	66,2	46,5	56,4 \pm 15,0 ab
	0,50	76,9	64,5	70,7 \pm 17,8 a
Média Geral		68,4 \pm 12,6 A	52,3 \pm 16,6 B	
WV3	0,00	59,9	34,8	47,4 \pm 33,1 a
	0,12	54,5	68,8	61,6 \pm 18,6 a
	0,25	49,2	57,5	53,4 \pm 21,5 a
	0,50	76,2	56,7	66,4 \pm 15,7 a
Média Geral		60,0 \pm 17,9 A	54,5 \pm 28,0 A	
DCR	0,00	59,4	61,6	60,5 \pm 11,4 a
	0,12	61,8	62,5	62,2 \pm 20,7 a
	0,25	61,1	62,5	61,8 \pm 14,4 a
	0,50	70,6	76,5	73,5 \pm 8,3 a
Média Geral		63,2 \pm 12,2 A	65,8 \pm 17,2 A	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

A análise de variância do número médio de brotações por explante revelou que a interação dos fatores concentração de BAP e subcultivos não foi significativa para os meios WV5 e DCR, indicando que são independentes. Contudo, para o meio WV3 houve interação entre esses dois fatores, indicando que não são independentes.

No cultivo inicial, o número médio de brotações obtido no meio de cultura WV3 acrescido de 0,50 μM de BAP, foi estatisticamente superior ao do controle e

das outras concentrações de BAP testadas (0,12 e 0,25 μM). No entanto, no primeiro subcultivo, não houve diferença significativa entre as concentrações de BAP e o controle (Tabela 5).

Na comparação entre o cultivo inicial e primeiro subcultivo, em meio de cultura WV3 acrescido de 0,50 μM de BAP, o número médio de brotações por explante do cultivo inicial foi superior ao do primeiro subcultivo e para demais concentrações e o controle não houve diferença significativa (Tabela 5).

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) revelou que o número médio de brotações axilares por explante obtidas no meio de cultura WV5, não diferiu significativamente entre os tratamentos. No entanto, para o meio de cultura DCR, o número médio de brotações obtido com 0,50 μM de BAP foi superior ao obtido no tratamento com 0,12 μM de BAP (Tabela 5).

Comparando os subcultivos, o número médio das brotações inoculadas nos meios WV5 e DCR não apresentou diferenças significativas entre um subcultivo e outro (Tabela 5).

TABELA 5 – NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DE *Pinus taeda*, OBTIDO EM DIFERENTES MEIO DE CULTURA, ACRESCIDOS OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO.

Meios de cultura	BAP (μM)	Cultivo inicial	1º Subcultivo	Média Geral
WV5	0,00	2,4	2,3	2,4 \pm 0,7 a
	0,12	2,5	2,0	2,3 \pm 0,6 a
	0,25	2,5	1,9	2,2 \pm 0,5 a
	0,50	2,4	2,2	2,3 \pm 0,5 a
Média Geral		2,5 \pm 0,6 A	2,1 \pm 0,5 A	
WV3	0,00	2,1 \pm 0,3 b A	1,7 \pm 0,9 a A	
	0,12	2,1 \pm 0,2 b A	2,0 \pm 0,3 a A	
	0,25	2,2 \pm 0,8 b A	2,3 \pm 1,0 a A	
	0,50	3,0 \pm 0,5 a A	1,9 \pm 0,3 a B	
DCR	0,00	2,3	2,5	2,4 \pm 0,3 ab
	0,12	2,1	2,2	2,2 \pm 0,6 b
	0,25	2,5	2,3	2,4 \pm 0,4 ab
	0,50	2,5	3,1	2,8 \pm 0,6 a
Média Geral		2,3 \pm 0,3 A	2,5 \pm 0,6 A	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

Quanto à porcentagem de alongamento, o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) não apresentou diferença significativa entre as concentrações de BAP e o controle e nem entre os subcultivos, para todos os meios de cultura testados. Do ponto de vista

prático, as brotações colocadas em meio de cultura WV5 mostraram maiores porcentagens de alongamento em relação às dos outros meios de cultura testados, tanto no cultivo inicial como também no primeiro subcultivo (Tabela 6).

TABELA 6 – PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES APICAIS DE *Pinus taeda* INOCULADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS DE PERMANÊNCIA EM CADA SUBCULTIVO.

Meios de cultura	BAP (μ M)	Cultivo inicial	1º Subcultivo	Média Geral
WV5	0,00	85,4	72,6	79,0 \pm 31,6 a
	0,12	84,7	70,3	77,5 \pm 21,0 a
	0,25	99,6	74,3	86,9 \pm 27,2 a
	0,50	60,5	72,1	66,3 \pm 34,0 a
Média Geral		82,5 \pm 29,4 A	72,3 \pm 27,8 A	
WV3	0,00	36,9	31,7	34,3 \pm 15,5 a
	0,12	44,6	41,7	43,2 \pm 11,3 a
	0,25	38,1	51,9	45,0 \pm 22,4 a
	0,50	34,9	39,8	37,3 \pm 9,9 a
Média Geral		38,6 \pm 15,3 A	41,3 \pm 15,9 A	
DCR	0,00	48,4	42,9	45,6 \pm 13,6 a
	0,12	42,6	40,5	41,6 \pm 26,0 a
	0,25	43,7	22,8	33,3 \pm 18,7 a
	0,50	31,0	11,7	21,3 \pm 13,2 a
Média Geral		41,4 \pm 15,1 A	29,5 \pm 22,9 A	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

3.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA WV5 ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP NA MULTIPLICAÇÃO *Pinus taeda*.

Os resultados da análise de variância para porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de alongamento, obtida nas diferentes concentrações de BAP e subcultivos testados são apresentados no Anexo 11.

A análise de variância da porcentagem de explantes com brotações mostrou que a interação dos fatores concentração de BAP e subcultivo foi significativa, indicando que não são independentes. Os resultados dos testes de comparação de médias da porcentagem de explantes com brotações, na ausência e para cada concentração de BAP, no cultivo inicial e primeiro e segundo subcultivo, são apresentados na Tabela 7.

No cultivo inicial, as maiores porcentagens de explantes com brotações foram obtidas com as concentrações de 1,00 e 2,00 μM de BAP, sendo que essas concentrações só diferiram significativamente da concentração de 0,25 μM de BAP (Tabela 7). No primeiro e segundo subcultivo, as respostas de porcentagem de explantes com brotações foram semelhantes para o controle e concentrações de BAP testadas (0,25 a 2,00 μM), não diferindo estatisticamente (Tabela 7).

A porcentagem de explantes com brotações axilares obtida em meio de cultura WV5, contendo 0,25 μM de BAP no cultivo inicial foi significativamente inferior à dos subcultivos posteriores. No entanto, com o controle e as demais concentrações testadas não ocorreram diferenças significativas da porcentagem de explantes com brotações no cultivo inicial e primeiro e segundo subcultivo.

Dentre todas as combinações testadas, as maiores porcentagens de explantes por brotações observadas foram com a concentração de 2,00 μM de BAP no cultivo inicial, de 0,25 μM de BAP no primeiro subcultivo e com a concentração de 0,50 μM de BAP no segundo subcultivo.

TABELA 7 – PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES AXILARES DE *Pinus taeda* EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO.

BAP (μM)	Cultivo inicial	1º Subcultivo	2º Subcultivo
0,00	43,5 \pm 24,1 ab A	61,5 \pm 13,6 a A	62,0 \pm 12,0 a A
0,25	30,3 \pm 22,8 b B	77,5 \pm 15,7 a A	71,7 \pm 15,9 a A
0,50	56,5 \pm 34,7 ab A	68,0 \pm 13,2 a A	72,6 \pm 19,5 a A
1,00	61,2 \pm 11,8 a A	58,8 \pm 14,1 a A	62,6 \pm 14,1 a A
2,00	72,7 \pm 13,5 a A	72,3 \pm 21,3 a A	64,3 \pm 26,2 a A

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

Para a variável número médio de brotações por explante, a análise de variância revelou não haver interação significativa entre os fatores concentração de BAP e subcultivos, sendo dessa forma fatores independentes.

O teste de comparação de médias não apresentou diferenças significativas do número médio de brotações por explante obtida entre as concentrações testadas e o controle (Tabela 8; Figura 2C). Entretanto, o número médio de brotações do primeiro e segundo subcultivo foi estatisticamente superior ao do cultivo inicial (Tabela 8; Figura 2C).

TABELA 8 – NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DE *Pinus taeda* INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO.

BAP (μM)	Cultivo inicial	1º Subcultivo	2º Subcultivo	Média Geral
0,00	2,0	2,8	2,6	2,4 \pm 0,6 a
0,25	1,6	3,0	3,0	2,5 \pm 0,9 a
0,50	2,2	2,9	3,1	2,7 \pm 0,9 a
1,00	2,3	2,4	3,2	2,6 \pm 0,7 a
2,00	2,8	3,0	3,2	3,0 \pm 0,9 a
Média Geral	2,2 \pm 0,7 B	2,8 \pm 0,6 A	3,0 \pm 0,8 A	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

A análise de variância da porcentagem de alongamento revelou que a interação dos fatores concentração de BAP e subcultivo foi significativa, indicando que esses fatores não são independentes. Os resultados dos testes de comparação de médias da porcentagem de alongamento, para cada concentração de BAP e subcultivos são apresentados na Tabela 9.

Quando considerado o cultivo inicial e primeiro subcultivo, o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) não apresentou diferenças significativas das porcentagens de alongamento obtidas com as concentrações de BAP e o controle. No entanto, no segundo subcultivo, o controle e as concentrações de 0,25; 0,50 e 1,00 μM de BAP apresentaram porcentagens de alongamento superiores à obtida na concentração de 2,00 μM de BAP.

Quando comparadas as médias da porcentagem de alongamento do controle e das concentrações de BAP (0,25 a 1,00 μM) entre os subcultivos, as médias obtidas no segundo subcultivo foram significativamente superiores às do cultivo inicial e primeiro subcultivo. A maior porcentagem de alongamento foi obtida no tratamento controle (sem BAP) e no segundo subcultivo (Tabela 9; Figura 2D).

TABELA 9 – PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES APICAIS DE *Pinus taeda* INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, APÓS OITO SEMANAS EM CADA SUBCULTIVO.

BAP (μM)	Cultivo inicial	1º Subcultivo	2º Subcultivo
0,00	47,8 \pm 27,2 a B	48,3 \pm 19,3 a B	155,3 \pm 41,6 a A
0,25	51,8 \pm 21,3 a B	49,7 \pm 33,7 a B	121,7 \pm 28,2 a A
0,50	54,7 \pm 16,4 a B	43,1 \pm 27,7 a B	133,7 \pm 26,4 a A
1,00	44,5 \pm 18,9 a B	48,0 \pm 17,6 a B	120,6 \pm 24,9 a A
2,00	45,7 \pm 13,5 a AB	37,1 \pm 11,9 a B	74,7 \pm 23,6 b A

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre as concentrações de BAP e as maiúsculas na horizontal entre os subcultivos.

3.4 ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE BROTAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE EXPLANTES CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WV5, COM OU SEM BAP.

Considerando as melhores respostas obtidas na etapa de estabelecimento *in vitro* e de multiplicação, fez-se uma estimativa da produção de brotações após um período de nove meses. Se forem isolados 100 segmentos nodais na etapa de estabelecimento *in vitro*, considerando 76% de sobrevivência com um número médio de 5,0 brotações por explante, após três meses serão obtidas 380 brotações.

Na etapa de multiplicação, se essas brotações forem cultivadas no meio de cultura WV5, variando as concentrações de BAP (2,00; 0,25 e 1,00 μM para o cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos, respectivamente), o número médio de brotações axilares em cada subcultivo será de 2,8; 3,0 e 3,2, com 89,2; 88,1 e 93,8% de sobrevivência e após seis meses de cultivo, o número final de brotações será de 7530.

Da mesma forma, se na etapa de multiplicação essas brotações forem inoculadas no meio de cultura WV5 sem BAP, o número médio de brotações axilares em cada subcultivo será de 2,0; 2,8 e 2,6, com 76,9; 92,9 e 92,2% de sobrevivência, resultando em 3645 brotações nesse mesmo período. A estimativa de produção de brotações comparando as duas situações pode ser observada na Figura 1.

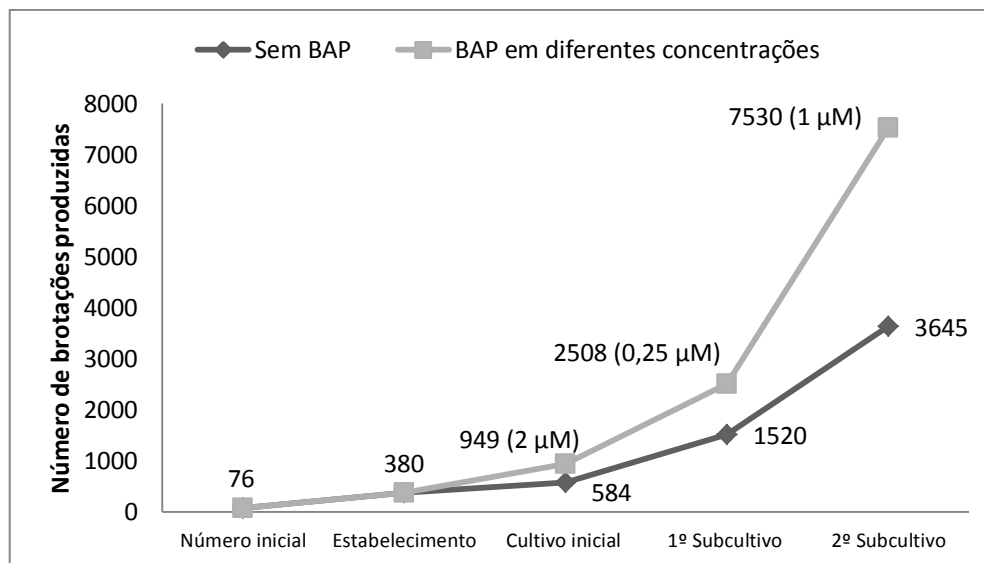


FIGURA 1 – NÚMERO DE BROTAÇÕES DE *Pinus taeda* PRODUZIDAS AO FINAL DE NOVE MESES DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WV5, NA ETAPA DE ESTABELECIMENTO E DE MULTIPLICAÇÃO, COM OU SEM BAP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

4 DISCUSSÃO

No estabelecimento de culturas assépticas, explantes inoculados em meio de cultura WV5 tiveram maior porcentagem de sobrevivência, tanto para brotações apicais como também para os segmentos nodais. Melhores resultados de explantes cultivados em meio WV5 também foram encontrados para *Pinus uncinata*, quando comparado aos meios WPM e MS (VEJSADOVÁ e LUKÁŠOVÁ, 2010).

Segundo Coke (1996b), o balanço dos sais dos meios de cultura WV5 e WV3 favorece um ótimo desenvolvimento de culturas *in vitro* de *Pinus taeda*. Os meios de cultura WV3 e WV5 possuem maiores quantidades de B, Ca, Mg, S, Cl e P quando comparados aos meios DCR e MS, além de menores quantidade de Mn em relação a esses meios e menor quantidade de N em relação ao meio MS (Anexo 1). Os explantes inoculados em meio de cultura MS apresentaram a menor porcentagem de sobrevivência para os dois tipos de explantes. Altas concentrações de N podem ocasionar um efeito tóxico, geralmente devido ao amônio. O meio WV5 contém 700 mg L⁻¹ de nitrato de amônio, enquanto que o meio MS possui 1650 mg L⁻¹. Melhores respostas podem ser obtidas reduzindo a concentração desse elemento no meio de cultura (SUL e KORBAN, 2004).

Além de apresentar maior taxa de sobrevivência, as brotações cultivadas em meio de cultura WV5 tiveram maior taxa de alongamento (85,2%) quando comparada à dos outros meios testados (WV3, DCR e MS). Isso possibilitou o seccionamento em vários segmentos (1,0 a 1,5 cm de comprimento), resultando em torno de seis segmentos por brotação e conseqüentemente uma quantidade maior de material vegetal disponível para a etapa de multiplicação. Em alguns casos, as brotações foram subdivididas em até nove segmentos. Essa estratégia de seccionar as brotações mostrou-se eficiente e foi também descrita por Baxter *et al.* (1989), que conseguiram o alongamento das brotações por seis semanas, seguido de subdivisão em um ou mais segmentos nodais de 1,5 cm.

O alongamento das brotações apicais na etapa de indução de brotações múltiplas tornou-se uma vantagem, uma vez que esses são subdivididos em vários segmentos nodais. O segmento em que a gema apical é mantida pode ser alongado novamente, mantendo-se um ciclo de indução de brotações axilares e ao mesmo

tempo obtendo novos segmentos a cada subcultivo permitindo a manutenção de um minijardim clonal *in vitro*.

Os meios de cultura WV5 e WV3 só apresentam a tiamina como fonte de vitamina e a L-glutamina é presente no meio WV3. Os meios WV3 e WV5 contêm concentrações maiores de tiamina ($0,40 \text{ mg L}^{-1}$) do que a dos meios MS e DCR ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$). A tiamina é um cofator no metabolismo de carboidratos e está diretamente envolvida na biossíntese de aminoácidos, sendo a vitamina básica requerida por todos os tecidos vegetais cultivados (RAZDAN, 2003; GEORGE *et al.*, 2008). A necessidade da tiamina é particularmente evidente em baixos níveis de citocininas (DODDS e ROBERTS, 1995). O inositol, além de ser uma fonte de carboidrato, também estimula o crescimento de brotações (GEORGE *et al.*, 2008). Nos meios WV3 e WV5 ele é suplementado em concentrações dez vezes maiores em relação ao meio MS. Provavelmente as maiores concentrações desses componentes são os responsáveis por um maior alongamento das brotações de *Pinus taeda*.

Os segmentos nodais apresentaram melhores respostas do que brotações apicais no estabelecimento *in vitro*. Resultado semelhante também foi obtido por McKellar *et al.* (1994), quando comparou segmentos nodais e brotações apicais de *Pinus patula*. Isso sugere que *Pinus taeda* pode conter certo nível endógeno de citocinina que em decorrência da superação da dominância apical induziu a organogênese de brotações a partir de gemas pré-formadas sem aplicação de reguladores. Com isso, os dois tipos de explantes foram selecionados e combinados para a etapa de indução de brotações axilares, sendo que as brotações apicais foram alongadas e seccionadas em segmentos nodais.

Na etapa de indução de brotações axilares, de um modo geral, os meios de cultura WV5, WV3 e DCR responderam de forma semelhante quanto à porcentagem de explantes com brotações axilares, com média de 70% nas concentrações de $0,50 \mu\text{M}$ de BAP. Em trabalhos com outras espécies de *Pinus*, respostas semelhantes foram obtidas, porém, com concentrações de BAP maiores que as utilizadas nesse trabalho (até $50 \mu\text{M}$) (GUPTA e DURZAN, 1985; WATT *et al.*, 1998; McKELLAR *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 1991; ŽEL *et al.*, 1988; LAPP *et al.*, 1996; NANDWANI *et al.*, 2001).

No tratamento controle foi obtido de 40 a 60% de explantes de *Pinus taeda* formando brotações ao longo dos subcultivos em meio de cultura WV5. Isso ressalta

a presença de um nível endógeno de citocinina em *Pinus taeda* suficiente para promover a indução de brotações e segundo Vejsadová e Lukášová (2010), respostas semelhantes só foram obtidas com acréscimo de 22,19 μM BAP no mesmo meio de cultura, para explantes de *Pinus uncinata*.

O número de subcultivos influenciou o alongamento das brotações. O segundo subcultivo promoveu as maiores porcentagem de alongamento. Contudo, observou-se que pode haver uma influência de BAP quando se comparou a concentração de 2,00 μM às outras concentrações (0,25 a 1,00 μM) e o controle, onde ocorreu uma redução do alongamento. Segundo Žel *et al.* (1988), as concentrações mais altas de BAP promovem maior desenvolvimento de gemas, porém essas não alongam. A exposição por longos períodos ao BAP ou a altas concentrações, também pode inibir o crescimento das brotações ou o desenvolvimento delas (AMERSON *et al.*, 1985; HALOS e GO, 1993; GARCÍA-FÉRRIZ *et al.*, 1994).

Apesar de não haver diferenças significativas no número médio de brotações por explante entre as concentrações de BAP e o controle, do ponto de vista prático observou-se que o uso de BAP com essas concentrações alternadas entre os subcultivos, pode aumentar a produção de brotos. Por esse sistema, pode ser obtido o dobro de brotações quando comparado com o número obtido em meio de cultura WV5 sem regulador vegetal, em um período de nove meses. Esses resultados são maiores que os encontrado por Baxter *et al.* (1989) que, em um ano, produziram até 1000 explantes a partir de 13 clones de *Pinus oocarpa*.

5 CONCLUSÕES

A multiplicação de *Pinus taeda* via gemas axilares foi viável.

O meio de cultura WV5 foi o melhor para o estabelecimento *in vitro* e multiplicação, tanto para brotações apicais como segmentos nodais e permitiu a multiplicação por subdivisão em segmentos.

O alongamento foi maior em meio WV5 do que nos outros meios de cultura testados (WV3 e DCR) e aumentou com o número de subcultivos. Não é recomendado adicionar a concentração de 2,00 μM de BAP no segundo subcultivo, que apresentou efeito inibidor.

As concentrações alternadas de BAP nos subcultivos (2,00; 0,25 e 1,00 μM , respectivamente) podem aumentar a produção de brotações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. A.; GRACE, J.; YEOMAN, M. M. Rapid micropropagation of Calabrian pine from primary and secondary buds on shoot explants. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 16, p. 637-641, 1986.

AMERSON, H. V.; FRAMPTON, L. J. Jr.; McKEAND, S. E.; MOTT, R. L.; WEIR, R. J. Loblolly pine tissue culture: laboratory, greenhouse and field studies. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A.; WILSON, C. M. **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, p. 271-287, 1985.

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

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines**. USA Patent 5.534.433, 1996a.

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines**. USA Patent 5.534.434, 1996b.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in Plant Tissue Culture**, 3 ed., Cambridge University Press. 256pp. 1995.

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

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

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**, 2 ed., v.2, Springer. 1361pp. 1996.

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

HALOS, S. C.; GO, N. E. Micropropagation of *Pinus caribaea* Morelet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p. 47-53, 1993.

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

LAPP, M. S.; MALINEK, J.; COFFEY, M. Microculture of western white pine (*Pinus monticola*) by induction of shoots on bud explants from 1-to-7-year-old-trees. **Tree Physiology**, v. 16, p. 447-451, 1996.

LIN, Y.; WAGNER, M. R.; HEIDMANN, L. J. *In vitro* formation of axillary buds by immature shoots of Ponderosa pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 161-166, 1991.

McKELLAR, D. S.; HERMAN, B.; WATT, M. P. Towards a protocol for the micropropagation of *Pinus patula*. **South African Forestry Journal**, v. 171, p. 33-41, 1994.

MEHRA-PALTA, A.; SMELTZER, R. H.; MOTT, R. L. Hormonal control of induced organogenesis experiments with excised plant parts of loblolly pine. **Tappi Journal**, v. 61, n. 1, p. 37-40, 1978.

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

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

RAZDAN, M. K. **Introduction to Plant Tissue Culture**, 2 ed., Science Publishers. 375pp. 2003.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etudes de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.

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

SUL, III-W.; KORBAN, S. S. Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 197-205, 2004.

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

VEJSADOVÁ, H.; LUKÁŠOVÁ, M. Shoot organogenesis induction from genetically verified individuals of endangered bog pine (*Pinus uncinata* subsp. *Uliginosa*). **Journal of Forest Science**, v. 56, p. 341-347, 2010.

WATT, M. P.; RAMGAREEB, S.; HOPE, B.; BLAKEWAY, F. C.; DENISON, N. P. Micropropagation via axillary bud proliferation from seedlings and juvenile shoots of *Pinus patula* Schiede et Deppe. **Southern African Forestry Journal**, n. 181, p. 1-5, 1998.

WEBB, D. T.; SANTIAGO, O. D. Cytokinin induced bud formation on Caribbean pine (*Pinus caribaea* Morlet) embryos *in vitro*. **Plant Science Letters**, v. 32, p. 17-21, 1983.

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

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

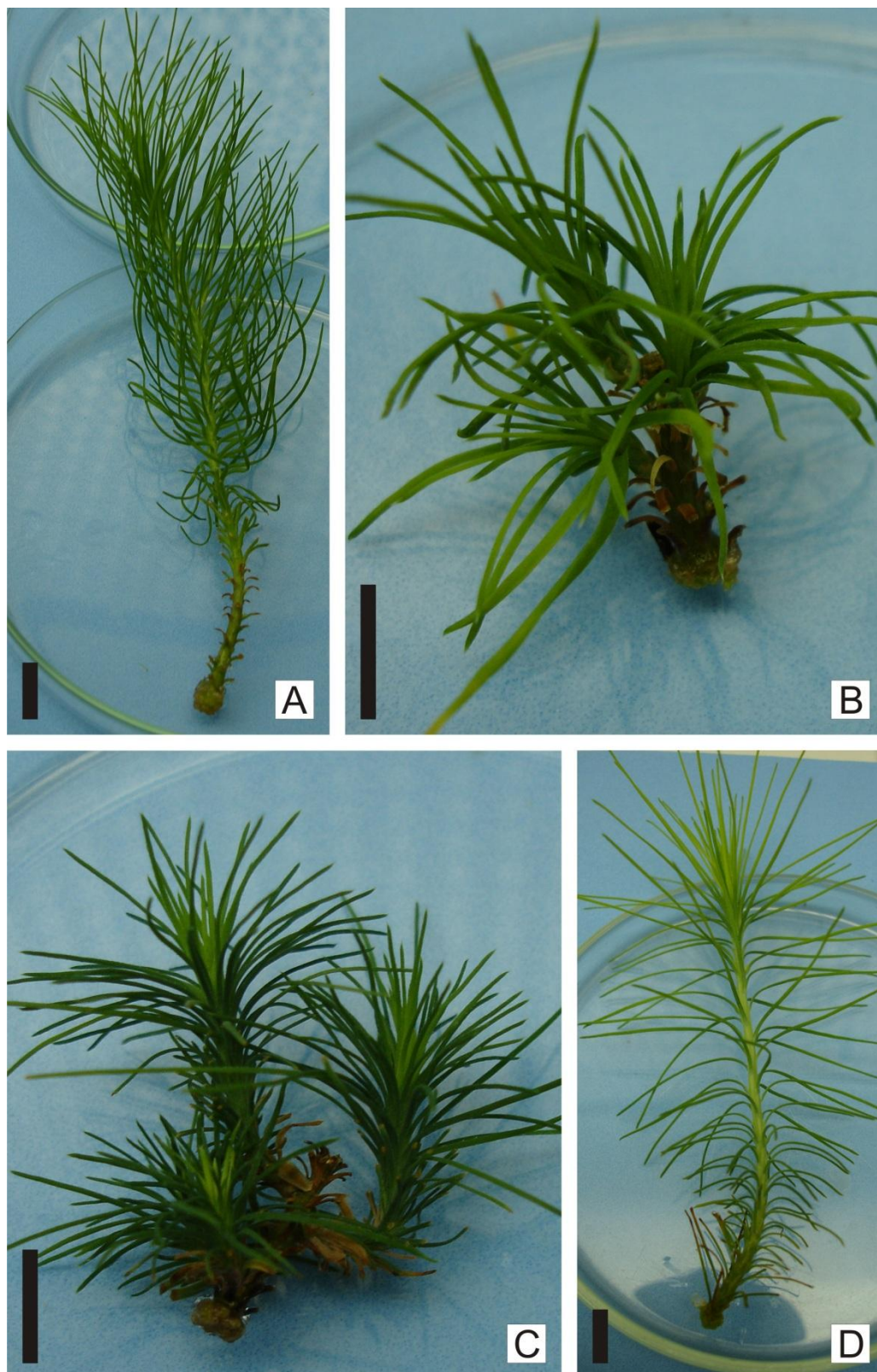


FIGURA 2 – MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus taeda* L.: BROTAÇÃO APICAL INOCULADA EM MEIO DE CULTURA WV5 (A) E SEGMENTO NODAL INOCULADO EM MEIO DE CULTURA WV3 (B), APÓS 90 DIAS DE CULTIVO. C – SEGMENTO NODAL INOCULADO EM MEIO DE CULTURA WV5 ACRESCIDO DE 2 μ M BAP, APÓS OITO SEMANAS DE CULTIVO; D – BROTAÇÃO INOCULADA EM MEIO WV5 SEM BAP, APÓS OITO SEMANAS DE CULTIVO. BARRA: 1,0 cm.

CAPÍTULO 3

ENRAIZAMENTO *in vitro*, TRANSPLANTIO, ACLIMATIZAÇÃO E ESTUDO ANATÔMICO DE RAÍZES DE *Pinus taeda* L.

RESUMO

Pinus taeda é uma espécie difícil de enraizar e muitas pesquisas são realizadas na tentativa de otimizar essa etapa. Esse trabalho teve como objetivo induzir o enraizamento *in vitro* de *Pinus taeda*, estabelecer metodologia de transplântio e aclimatização de mudas e realizar estudo anatômico das raízes formadas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas. Para o enraizamento *in vitro* foram testados os meios GDm/2, GDm/4 e o meio composto por água e ágar. Foram testadas combinações de ANA (0,54 a 2,69 μM) e BAP (0,04 a 0,44 μM). Períodos de indução variaram entre 7, 9 e 12 dias ou permanecendo no mesmo meio por dez semanas. Também foi testado o meio dupla fase, com os sais do meio GDm/2 presentes na fase semissólida ou fase líquida, ambas suplementadas com reguladores. As mudas enraizadas foram plantadas em substrato comercial Plantmax[®] Florestas e aclimatizadas em casa de vegetação. O estudo anatômico foi realizado em raízes formadas a partir de calo. A melhor porcentagem de enraizamento (47,5%) foi obtida em brotações submetidas ao tratamento com 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP por 12 dias no meio de cultura composto por água e ágar, seguido de transferência para o meio GDm/2 sem reguladores. O meio dupla fase não aumentou a porcentagem de enraizamento. O comprimento mínimo de raízes originadas do calo recomendado para o transplântio é de 0,6 cm, uma vez que a conexão vascular já foi estabelecida entre caule e raiz. As traqueídes que formam a conexão vascular são diferenciadas a partir de células parenquimáticas. As plantas transplântadas apresentaram 90% de sobrevivência após 90 dias de permanência em casa de vegetação.

Palavras-chave: raízes adventícias, auxina, traqueídes, conexão vascular.

CHAPTER 3
ROOTING *in vitro*, TRANSPLANTATION, ACCLIMATIZATION AND
ANATOMICAL STUDY OF ROOTS OF *Pinus taeda* L.

ABSTRACT

Pinus taeda it is a difficult species to root and many researches are conducted in an attempt to optimize this step. This study aimed to induce *in vitro* rooting of *Pinus taeda* shoots, to establish a method of transplanting and acclimatization and to carry out the anatomical study of the roots formed *in vitro* and subsequently acclimatized. For the *in vitro* rooting the GDm/2, GDm/4 media and a culture medium composed of water and agar were compared. Combinations of NAA (0.54 to 2.69 μM) and BAP (0.04 to 0.44 μM) were tested. Induction periods ranged from 7, 9 and 12 days, or remaining in the same medium for 10 weeks. The double-layer medium, with GDm/2 present in the semisolid phase or liquid phase, supplemented with regulators during nine days of induction, was also tested. The rooted plants were transplanted in Plantmax[®] Forestry substrate and acclimatized in a greenhouse. The anatomical study was performed on roots formed from callus. The best rooting percentage (47.5%) was obtained in shoots treated with 2.69 μM NAA and 0.44 μM BAP for 12 days in culture medium composed of water and agar, followed by transfer to growth regulator-free GDm/2 medium. The double-layer medium did not increase the rooting percentage. When the roots were derived from callus, longer than 0.6 cm, the vascular connection was established so that minimum size was recommended for transplanting. The tracheids that form the vascular connection between root and callus were differentiated from parenchymal cells. The transplanted plants in commercial substrate showed 90% survival after 90 days.

Keywords: adventitious root, auxin, tracheid, vascular connection

1 INTRODUÇÃO

Para se obter sucesso na micropropagação de plantas, é necessário que todas as fases do protocolo estejam otimizadas. O enraizamento de brotações cultivadas *in vitro* constitui um passo fundamental para a obtenção de um sistema de produção economicamente eficiente que um reflorestamento clonal exige (HICKS, 1987; FOSTER, 1990; GEORGE *et al.*, 2008).

O enraizamento é geralmente uma etapa conhecida pelos problemas encontrados, principalmente com as espécies de *Pinus*, que são difíceis de enraizar (MOTT *et al.*, 1977; MEHRA-PALTA *et al.*, 1978; HANDLEY *et al.*, 1995; HAMANN, 1998). Segundo Bergmann e Stomp (1994), o sucesso de enraizamento em *Pinus* pode depender da espécie, família e clones. Além desses fatores, também pode haver influência das formulações salinas e dos reguladores vegetais.

O uso de auxina exógena é geralmente necessário para a indução de raízes adventícias em espécies difíceis de enraizar. A escolha da auxina é importante, uma vez que as brotações podem responder de forma diferente para cada tipo de regulador, sendo que algumas auxinas são potencialmente melhores do que outras para determinadas espécies. Em Gimnospermas, o ácido naftalenoacético (ANA) é geralmente o mais utilizado (ABDULLAH *et al.*, 1989).

Para *Pinus* é comum a combinação de auxina com citocinina, principalmente a 6-benzilaminopurina (BAP), para promover o enraizamento. Mehra-Palta *et al.* (1978) conseguiram maiores porcentagens de enraizamento (50%) em *Pinus taeda* combinando 0,54 μM de ANA e 0,22 ou 0,04 μM de BAP em meio de cultura GDM (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978). Tang e Ouyang (1999) relataram que o enraizamento (46%) em *Pinus taeda* só foi possível com a combinação de 0,49 μM de AIB (ácido indolbutírico), 1,44 μM de GA₃ (ácido giberélico) e 4,44 μM de BAP, em meio de cultura TE (TANG *et al.*, 1998). Mott e Amerson (1981) obtiveram sucesso de enraizamento de *Pinus taeda* com a combinação de 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP adicionado ao meio de cultura GD modificado.

A adição de um meio líquido sobre o meio semissólido pode aumentar a porcentagem de enraizamento para algumas espécies (GEORGE, 1996). Não há trabalhos reportando o efeito do meio dupla-fase em *Pinus taeda*.

O tempo de enraizamento também é um fator importante quando se pretende aplicar a técnica de micropropagação em escala comercial, pois quanto menor for o tempo de produção, melhor economicamente será a técnica. Muitos trabalhos indicaram a emergência das raízes de *Pinus taeda* entre quatro e doze semanas de cultivo (MOTT e AMERSON, 1981; JANG e TAINTER, 1991; MEHRA-PALTA *et al.*, 1978).

O transplântio e aclimatização são um dos fatores limitantes para a produção de mudas por meio da micropropagação em escala comercial. A planta passa pela transição de um estado heterotrófico e sem estresse abiótico para um estado autotrófico e está sujeita às condições adversas do novo meio em que ela se encontra (HARTMANN *et al.*, 2002; GEORGE *et al.*, 2008). Segundo Leach (1979) a sobrevivência depende não apenas do grau de desenvolvimento das plantas micropropagadas, mas também de cuidados na aclimatização tais como controle de temperatura, umidade adequada e condições de crescimento.

Raízes formadas *in vitro*, muitas vezes, não são funcionais e morrem após o transplântio. A conexão vascular entre raiz e caule é de grande importância para o funcionamento do sistema vascular e da sobrevivência das plantas após o transplântio (GEORGE *et al.*, 2008). Algumas plantas podem retomar essa conexão depois de certo tempo, outras, porém, podem sofrer com essa falta de conexão durante a aclimatização das mudas. Um estudo anatômico é necessário para acompanhar o desenvolvimento dessas conexões vasculares entre raízes e caule de brotações no momento do transplântio.

Na aclimatização, o crescimento lento das plantas pode ser devido à baixa qualidade das raízes ou devido às mesmas apresentarem deficiência na absorção de nutrientes (MCKEAND e ALLEN, 1984; ABDULLAH *et al.*, 1989; LEACH, 1979; ANDERSON *et al.*, 1992).

Esse trabalho tem como objetivo induzir o enraizamento *in vitro* de brotações de *Pinus taeda*, estabelecer metodologia de transplântio e aclimatização de mudas e realizar estudo anatômico das raízes originadas a partir de calo e posteriormente aclimatizadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ENRAIZAMENTO *in vitro*

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

Foram utilizadas brotações de 1,5 a 2,0 cm de altura com corte em bisel duplo na base, provenientes de culturas previamente estabelecidas e multiplicadas *in vitro*, em meio de cultura WV5 (COKE, 1996). Essas brotações foram cultivadas em meio de cultura WV5, acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado e sem reguladores por 20 dias antes de serem inoculadas em meio de enraizamento.

Para a indução de raízes foi testado um meio composto por água e ágar (AA) e o meio de cultura Gresshoff e Doy modificado segundo Mehra-Palta (1978), com as concentrações de sais reduzidas pela metade (GDm/2) ou a um quarto (GDm/4). Os meios GDm/2 e GDm/4 continham 20 g L⁻¹ de sacarose e 5,6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Himedia[®].

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e os meios esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. As brotações foram inoculadas em frascos que possuíam 12,5 cm de altura e 6,2 cm de diâmetro, com capacidade de 320 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e tampados com tampas de polipropileno.

2.1.1 Efeito das combinações de ANA e BAP na indução e expressão de raízes *in vitro*

As brotações foram inoculadas em meio de cultura GDm/2, semissólido, acrescido ou não de reguladores vegetais nas seguintes combinações: controle (sem reguladores); 0,54 µM ANA e 0,04 µM BAP; 0,54 µM ANA e 0,22 µM BAP; 0,54 µM ANA e 0,44 µM BAP; 2,69 µM ANA e 0,44 µM BA; 2,69 µM ANA e 0,44 µM BAP em frasco contendo apenas água e ágar. Os dois últimos tratamentos citados foram submetidos a um período de indução de nove dias e depois as brotações foram transferidas para meio GDm/2 sem reguladores por dez semanas.

Nos demais tratamentos, as brotações permaneceram no mesmo meio de indução por dez semanas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro explantes por frasco, dois frascos por repetição e seis repetições por tratamento.

Após dez semanas de cultivo, foi avaliada a porcentagem de brotações enraizadas, o número médio de raízes por brotação e a porcentagem de raízes formadas a partir do calo ou diretamente do caule.

2.1.2 Efeito do meio dupla fase na indução de raízes *in vitro*

Foram realizadas combinações do meio de cultura, com ou sem uma fase líquida sobre a fase semissólida e com a presença ou ausência de sais em cada fase. O meio de enraizamento foi dividido em duas etapas: uma etapa de indução por nove dias no meio contendo 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP, em ambas as fases; e uma etapa de desenvolvimento das raízes, com as brotações transferidas em meio semissólido contendo sais reduzidos pela metade (GDm/2) e sem reguladores, durante quinze semanas, conforme a Tabela 1.

TABELA 1 – COMBINAÇÕES DOS MEIOS UTILIZADOS PARA INDUÇÃO DE RAÍZES DE *Pinus taeda*, CONTENDO 2,69 μM DE ANA E 0,44 μM DE BAP, POR NOVE DIAS, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA MEIO GDm/2 SEMISSÓLIDO.

MEIO DE INDUÇÃO (9 dias)		MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO
Fase semissólida ¹	Fase líquida ¹	Semissólido ³
Água e ágar	–	GDm/2 ²
Água e ágar	Água	GDm/2
Água e ágar	GDm/2 ²	GDm/2
GDm/2 ²	Água	GDm/2

¹ Todos os tratamentos, tanto a fase semissólida como a fase líquida, foram acrescidos de reguladores.

² GDm/2 – Meio Gresshoff e Doy modificado segundo Mehra-Palta (1978) com sais reduzidos pela metade.

³ Sem reguladores.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro explantes por frasco, dois frascos por repetição e seis repetições por tratamento.

Após quinze semanas de cultivo, foi avaliada a porcentagem de brotações enraizadas, o número médio de raízes por brotação e a porcentagem de raízes formadas a partir do calo ou diretamente do caule.

2.1.3 Efeito do tempo de indução e da ausência ou redução de sais no meio de expressão e desenvolvimento das raízes *in vitro*

Brotações apicais foram colocadas em meio de indução composto por água e ágar, acrescido da combinação de 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP, por período de 7, 9 e 12 dias. Após o período de indução, os explantes foram transferidos para os meios de expressão e desenvolvimento de raízes: AA (água e ágar), GDm/2 ou GDm/4, por dez semanas. O tratamento controle não foi submetido ao meio de indução e as brotações foram inoculadas diretamente nos meios de expressão e desenvolvimento de raízes citados. As combinações entre os tratamentos de indução e os meios de expressão e desenvolvimento foram indicadas na Tabela 2.

TABELA 2 – COMBINAÇÕES ENTRE DIFERENTES PERÍODOS DE INDUÇÃO, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA O MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES *in vitro* DE *Pinus taeda*.

Meio de indução	Período de indução	Meio de expressão e desenvolvimento das raízes ³		
		AA	GDm/2	GDm/4
	Controle ²	AA	GDm/2	GDm/4
AA ¹ e reguladores	7 dias	AA	GDm/2	GDm/4
AA e reguladores	9 dias	AA	GDm/2	GDm/4
AA e reguladores	12 dias	AA	GDm/2	GDm/4

¹AA: meio contendo água e ágar acrescido de 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP.

²O controle não teve tratamento com reguladores, as brotações foram inoculadas nos meios de expressão e permanecendo neste por 10 semanas.

³Sem reguladores

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial de dois meios de expressão (o meio de expressão composto por água e ágar não foi submetido à análise estatística) e três períodos de indução e o controle, com quatro explantes em cada frasco, dois frascos por repetição e cinco repetições por tratamento.

Após dez semanas de cultivo, foi avaliada a porcentagem de brotações enraizadas, o número médio de raízes por brotação e a porcentagem de raízes formadas a partir do calo ou diretamente do caule.

2.1.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico MSTATC[®].

2.2 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

Brotações medindo entre 1,5 e 2,5 cm, com raízes maiores que 0,6 cm de comprimento, foram utilizadas para o transplântio e aclimatização. As raízes foram lavadas em água corrente e plantadas em bandejas de isopor para semeadura por 60 dias. Em seguida as mudas foram transplantadas para sacos plásticos com novo substrato. Foi utilizado como substrato o composto comercial Plantmax[®] Florestas.

Após 90 dias, as plantas foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência, comprimento médio inicial e final da parte aérea e da maior raiz e porcentagem de alongamento da parte aérea e da maior raiz, obtida pela fórmula: $(f - i) / i \cdot 100$, onde f é o comprimento final e i é o comprimento inicial.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Na etapa de enraizamento *in vitro*, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de $19 \pm 2^\circ\text{C}$ (noite) e $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (dia), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Para o transplântio e aclimatização, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob sombrite, com temperaturas variando entre $20 \pm 7^\circ\text{C}$ no mês de outubro/2010 e $26 \pm 8^\circ\text{C}$ nos meses de novembro e dezembro/2010. As plantas foram irrigadas manualmente de 4 a 5 vezes ao dia durante os 20 primeiros dias. Após esse período, as irrigações foram diminuídas para três vezes ao dia.

2.4 ESTUDO ANATÔMICO DAS RAÍZES DE PLANTAS *in vitro* E ACLIMATIZADAS

Foram coletadas amostras provenientes de calo com raízes em diferentes estádios de desenvolvimento *in vitro* (60 dias de cultivo com raízes de 0,2 e 0,6 cm de comprimento) e aclimatizadas, após 60 dias em casa de vegetação.

O material foi fixado em FAA (BERLYN e MIKSCHE, 1976), desidratado em série alcoólica, posteriormente infiltrado e incluído em Historresina[®] seguindo as instruções do fabricante (Leica Microsystem, Alemanha).

Cortes longitudinais seriados foram realizados em micrótomo de rotação RM2145 (Leica Microsystem, Alemanha), com espessura de 7 μm e corados com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1965). As características mais representativas do material foram registradas em equipamento digital acoplado ao microscópio Zeiss[®].

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DAS COMBINAÇÕES DE REGULADORES NA INDUÇÃO, EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES *in vitro*

Os resultados da análise de variância da porcentagem de enraizamento dos tratamentos sem reguladores ou com diferentes concentrações de ANA e BAP, e os valores de qui-quadrado (χ^2), referentes ao teste de Bartlett, são apresentados no Anexo 12.

As brotações apresentaram a maior porcentagem de enraizamento (40%) no meio de indução contendo apenas água e ágar, acrescido de 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP por nove dias, seguido de transferência para o meio GDm/2, por dez semanas. No entanto, o teste de Tukey revelou que essa média não diferiu significativamente das demais combinações de reguladores (Tabela 3).

Para a variável número médio de raízes por brotação, as respostas foram semelhantes para todos os tratamentos, em torno de 1,5 (Tabela 3).

TABELA 3 – EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DAS CONCENTRAÇÕES DE ANA E BAP NO ENRAIZAMENTO *in vitro* DE BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*, APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO.

Tratamento	% Enraizamento	Número médio de raízes por brotação
GDm/2 – sem reguladores	16,7 \pm 15,1 a	1,3
GDm/2 – 0,54 μM ANA e 0,04 μM BAP	18,8 \pm 17,2 a	1,5
GDm/2 – 0,54 μM ANA e 0,22 μM BAP	14,6 \pm 9,4 a	1,4
GDm/2 – 0,54 μM ANA e 0,44 μM BAP	22,9 \pm 16,6 a	1,7
GDm/2 – 2,69 μM ANA e 0,44 μM BAP ¹	10,4 \pm 12,3 a	1,3
Água e Agar – 2,69 μM ANA e 0,44 μM BAP ¹	40,0 \pm 22,9 a	1,6

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

¹ Tempo de indução de nove dias com reguladores, seguido de transferência para o meio GDm/2 sem reguladores.

A porcentagem de raízes formadas a partir do calo foi menos frequente no meio de indução composto por água, ágar e acrescido de 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP (41,7%) e no meio GDm/2 sem reguladores (44,5%) (Figura 1).

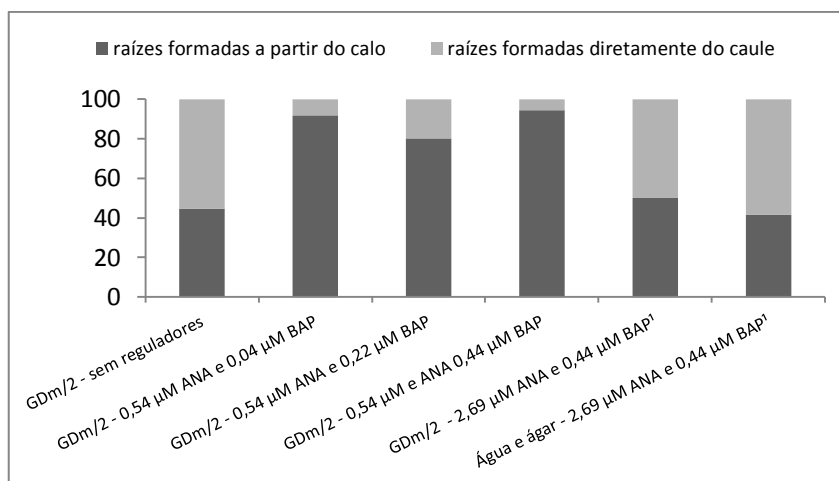


FIGURA 1 – PORCENTAGEM DE RAÍZES FORMADAS A PARTIR DE CALO OU DIRETAMENTE DO CAULE, EM BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*. AS BROTAÇÕES FORAM INOCULADAS EM MEIO Gdm/2, EXCETO O ÚLTIMO TRATAMENTO QUE FOI INOCULADO EM MEIO DE INDUÇÃO CONTENDO ÁGUA, ÁGAR E REGULADORES. ¹PERÍODO DE INDUÇÃO DE NOVE DIAS E DEPOIS TRANSFERIDAS PARA O MEIO Gdm/2 SEM REGULADORES, POR DEZ SEMANAS.

Em todos os tratamentos foi observado que as raízes emergiram na quinta semana de cultivo (Figura 2). No meio de indução contendo apenas água e ágar, acrescido de reguladores (2,69 µM de ANA e 0,44 µM de BAP), as brotações continuaram formando raízes até dez semanas de cultivo.

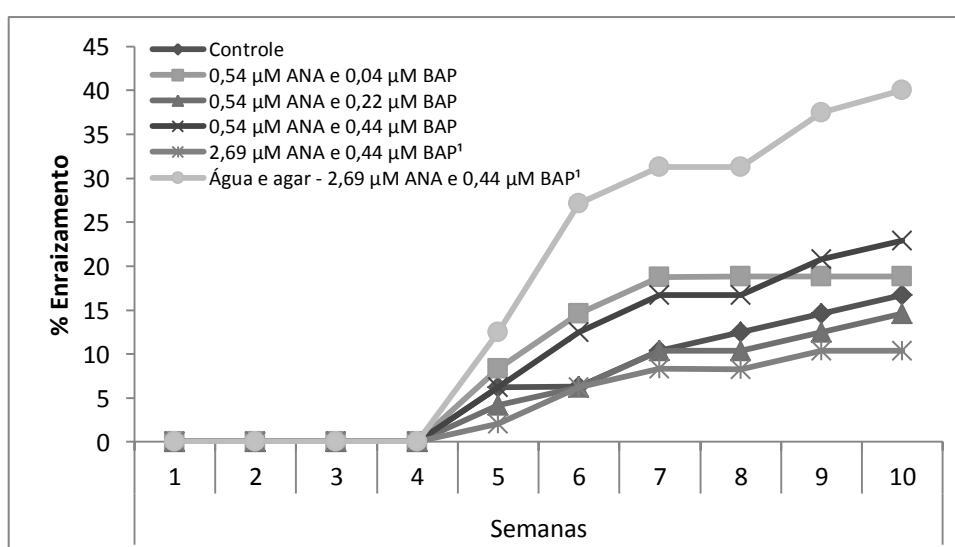


FIGURA 2 – EFEITO DO MEIO DE CULTURA E DOS REGULADORES VEGETAIS NO ENRAIZAMENTO *in vitro* DE BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*. AS BROTAÇÕES FORAM INOCULADAS EM MEIO Gdm/2, EXCETO O ÚLTIMO TRATAMENTO QUE FOI INOCULADO EM MEIO DE INDUÇÃO CONTENDO ÁGUA, ÁGAR E REGULADORES. ¹PERÍODO DE INDUÇÃO DE NOVE DIAS E DEPOIS TRANSFERIDAS PARA O MEIO Gdm/2 SEM REGULADORES, POR DEZ SEMANAS.

3.2 EFEITO DO MEIO DUPLA FASE NA INDUÇÃO DE RAÍZES *in vitro*

Os resultados da análise de variância da porcentagem de enraizamento, nas diferentes combinações de meio de cultura com meio dupla fase, e os valores de qui-quadrado (χ^2), referentes ao teste de Bartlett, são apresentados no Anexo 13.

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) revelou que as brotações inoculadas em meio semissólido, contendo água e ágar, sem fase líquida, com a combinação de 2,69 μM ANA e 0,44 μM BAP por nove dias, seguido de transferência para o meio de cultura GDm/2, apresentaram maiores respostas com 37,5% de enraizamento ao final de quinze semanas de cultivo (Tabela 4).

As brotações inoculadas em meio semissólido GDm/2 e fase líquida sem sais, acrescido da combinação de 2,69 μM ANA e 0,44 μM BAP por nove dias, seguido de transferência para o meio de cultura GDm/2, apresentaram a menor porcentagem de enraizamento (6,3%), diferindo significativamente da fase semissólida sem sais e sem fase líquida (37,5%), pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Tabela 4).

Para a variável número médio de raízes por brotação, as brotações responderam de forma semelhante, variando em torno de 2,0 raízes por brotação (Tabela 4). Todos os tratamentos apresentaram emergência de raízes na quarta semana de cultivo.

TABELA 4 – EFEITO DO MEIO DUPLA FASE NA INDUÇÃO DE RAÍZES EM BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*, APÓS 15 SEMANAS DE CULTIVO.

Meio de cultura	% Enraizamento	Número médio de raízes por brotação
Fase semissólida sem sais e sem fase líquida	37,5 \pm 20,9 a	1,7
Fase semissólida sem sais e líquida sem sais	27,1 \pm 14,6 ab	2,2
Fase semissólida sem sais e líquida com sais	14,6 \pm 14,6 ab	2,0
Fase semissólida com sais e líquida sem sais	6,3 \pm 10,5 b	2,0

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

Nota: todos os tratamentos, tanto na fase semissólida quanto na fase líquida, foram acrescidos de 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP, com período de indução de nove dias e depois transferidos para o meio GDm/2 semissólido sem reguladores.

Raízes formadas a partir do calo foram menos frequentes em meio semissólido contendo água, ágar e fase líquida sem sais, acrescido de 2,69 μM ANA e 0,44 μM BAP por nove dias, seguido de transferência para o meio de cultura

GDm/2, com 48,6%. Nos demais tratamentos, a porcentagem de raízes formadas a partir de calo foi entre 80 e 100% (Figura 3).

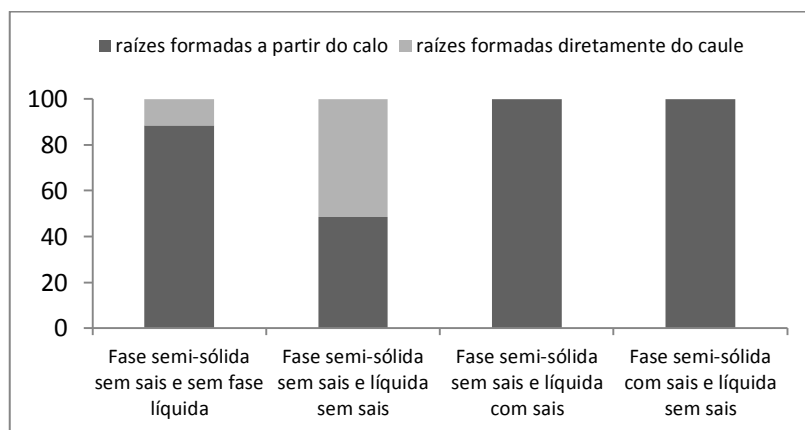


FIGURA 3 – EFEITO DO MEIO DUPLA FASE NA PORCENTAGEM DE RAÍZES FORMADAS A PARTIR DE CALO OU DIRETAMENTE DO CAULE, EM BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*, APÓS 15 SEMANAS DE CULTIVO.

3.3 EFEITO DO TEMPO DE INDUÇÃO E DA AUSÊNCIA OU REDUÇÃO DE SAIS NO MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES *in vitro*

Os resultados da análise de variância para a porcentagem de enraizamento, nos diferentes tempos de indução e meios de expressão e desenvolvimento testados, são apresentados no Anexo 14. A análise de variância da porcentagem de enraizamento revelou que a interação entre os fatores meio de expressão e tempo de indução não foi significativa, indicando que os fatores são independentes.

A comparação das médias da porcentagem de enraizamento nos meios de expressão e desenvolvimento das raízes GDm/2 e GDm/4 não apresentou diferença significativa. Quando comparadas as médias da porcentagem de enraizamento nos diferentes tempos de indução, o período de 12 dias (37,5%) mostrou ser superior ao controle (10%) (Tabela 5).

A maior porcentagem de enraizamento obtida (47,5%) foi com brotações submetidas ao tratamento com 2,69 μM ANA e 0,44 μM BAP por 12 dias, em meio composto por água e ágar, seguido de transferência para o meio GDm/2 (Tabela 5).

A emergência das raízes iniciou-se após a quinta semana de cultivo em algumas brotações, porém a taxa de 47,5% de enraizamento só foi alcançada após 10 semanas de cultivo.

Brotações inoculadas em meio de expressão composto por água e ágar sem tratamento com reguladores e aquelas submetidas ao tratamento com ANA e BAP por 7, 9 e 12 dias, seguido de transferência para o meio de expressão e desenvolvimento composto por água e ágar não enraizaram, portanto não foram submetidas à análise estatística. Nos tratamentos controles, onde não foi utilizada a combinação de reguladores, ocorreram 5 e 15% de enraizamento nos meios GDm/2 e GDm/4, respectivamente (Tabela 5).

TABELA 5 – PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO *in vitro* DE BROTAÇÕES DE *Pinus taeda* SUBMETIDAS A DIFERENTES PERÍODOS DE INDUÇÃO E DIFERENTES MEIOS DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES, APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO.

Meio de expressão das raízes ³	Controle ¹ (%)	Períodos de indução ²			Média Geral (%)
		7 dias (%)	9 dias (%)	12 dias (%)	
GDm/2	5,0	20,0	27,5	47,5	25,0 ± 21,8 a
GDm/4	15,0	30,0	22,5	27,5	23,8 ± 16,2 a
Média Geral (%)	10,0 ± 9,9 B	25,0 ± 15,6 AB	25,0 ± 14,4 AB	37,5 ± 24,3 A	

¹ Controle: tratamento sem reguladores.

² Tratamento com 2,69 µM de ANA e 0,44 µM de BAP em meio de indução com água e ágar (sem sais).

³ Após o período de indução, os explantes foram transferidos para o meio de expressão e desenvolvimento, exceto o tratamento controle.

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na vertical indicam a comparação de médias entre os meios de expressão e as maiúsculas na horizontal entre os períodos de indução.

Para a variável número médio de raízes por brotação, as brotações enraizadas após o período de 12 dias em água e ágar contendo 2,69 µM de ANA e 0,44 µM de BAP, seguido de transferência para o meio com GDm/4, tiveram maior número médio com 2,6 raízes por brotação (Figura 5C; Tabela 6).

TABELA 6 – NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES POR BROTAÇÃO DE *Pinus taeda*, APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE INDUÇÃO, SEGUIDO DE TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES, APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO.

Meio de expressão das raízes ³	Controle ¹	Períodos de indução ²			Média Geral
		7 dias	9 dias	12 dias	
GDm/2	1,5	1,4	1,8	1,6	1,6
GDm/4	1,0	1,9	1,2	2,6	1,7
Média Geral	1,3	1,7	1,5	2,1	

¹ Controle: tratamento sem reguladores.

² Pulso com 2,69 µM de ANA e 0,44 µM de BAP em meio com água e ágar (sem sais).

³ Após o período de indução, os explantes foram transferidos para o meio de expressão e desenvolvimento, exceto o tratamento controle.

As brotações enraizadas com período de indução de 12 dias em água e ágar contendo 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP, seguido de transferência para o meio GDm/2 (Figura 4A) e aquelas enraizadas com período de indução de nove dias em água e ágar contendo 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP, seguido de transferência para o meio GDm/4 (Figura 4B), apresentaram 86,0 e 93,8% de raízes formadas a partir do calo na base das brotações, respectivamente (Figura 5B). Nos tratamentos controles, as brotações enraizadas em meio GDm/2 e GDm/4 sem reguladores, as raízes se formaram diretamente do caule e nenhum calo foi observado na base das brotações (Figura 5A).

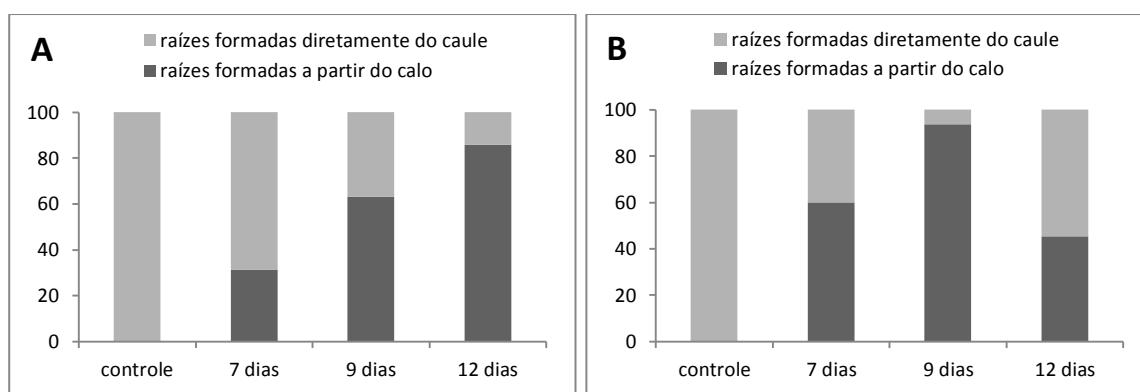


FIGURA 4 – EFEITO DO TEMPO DE INDUÇÃO E DO MEIO DE DESENVOLVIMENTO NA PORCENTAGEM DE RAÍZES FORMADAS A PARTIR DO CALO OU DIRETAMENTE DO CAULE, EM BROTAÇÕES DE *Pinus taeda*. APÓS O PERÍODO DE INDUÇÃO EM MEIO COMPOSTO POR ÁGUA, ÁGAR E 2,69 μM ANA E 0,44 μM BAP, AS BROTAÇÕES FORAM INOCULADAS EM MEIO DE EXPRESSÃO E DESENVOLVIMENTO GDm/2 (A) OU GDm/4 (B), POR DEZ SEMANAS.

3.4 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

As mudas apresentaram sintomas de clorose nos 15 primeiros dias após o transplântio, recuperando a coloração verde-escuro após duas semanas em casa de vegetação. Após 90 dias ocorreu 90% de sobrevivência em um total de 100 plantas aclimatizadas (Figura 5D).

As raízes se desenvolveram bem e após 90 dias apresentaram em média 17,0 cm de comprimento, com um número médio de 4,6 raízes (raízes maiores que 1,5 cm) por planta (Tabela 7; Figura 5F e 5G). A parte aérea da planta só se desenvolveu após esse período de 90 dias com altura média de 6,0 cm e presença

de braquiblastos, coincidindo com o aumento de temperatura da casa de vegetação para $26\pm 8^{\circ}\text{C}$ nos meses de novembro e dezembro/2010 (Figura 5E).

TABELA 7 – REPOSTAS NA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Pinus taeda*, APÓS 90 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

	Comprimento médio inicial (cm)	Comprimento médio final (cm)	Porcentagem de alongamento (%)
Parte aérea	1,6	6,0	275,0
Raiz ¹	1,6	16,7	943,8

¹ Comprimento da maior raiz.

3.5 ESTUDO ANATÔMICO DAS RAÍZES DE PLANTAS *in vitro* E ACLIMATIZADAS

As raízes desenvolvidas *in vitro*, quando formadas a partir do calo, têm origem em células periféricas. Na figura 3A foi possível observar uma raiz no início do desenvolvimento, com meristema apical composto de células isodiamétricas, com paredes celulósicas finas, citoplasma denso, núcleo proeminente, vacúolos de tamanho reduzido. O procâmbio ocupa a porção central e possuem células alongadas.

Nesse estágio de desenvolvimento (raiz com 0,2 cm de comprimento) não foi possível observar conexão vascular da raiz recém-formada com o sistema vascular do calo (Figura 6B). No estágio posterior, a raiz com 0,6 cm de comprimento já possui elementos condutores diferenciados a partir de células procambiais (Figura 6C).

Entre o sistema vascular do calo e o sistema vascular da raiz foram encontradas células parenquimáticas em diferenciação e diferenciadas em elementos traqueais isoladamente ou em conjuntos de células longitudinais e laterais (Figura 6D e 6E). As traqueídes diferenciadas a partir de células parenquimáticas são curtas e, em secção longitudinal, apresentam vários formatos podendo ser de arredondadas a retangulares, possuem a deposição da parede secundária espiralada e pontoadada e ausência de protoplasma (Figura 6E). As traqueídes de origem procambial são bastante alongadas de pequeno diâmetro, possuem a deposição da parede secundária pontoadada (Figura 6F).

A coifa de raiz *in vitro* apresenta um formato mais agudo com camadas de células mais frouxas e maior número de células, sendo mais longa (Figura 6G),

enquanto que a coifa de raiz de planta aclimatizada apresenta a coifa menos aguda e menor número de células e mais densas (Figura 6H).

4 DISCUSSÃO

Enraizamento in vitro

A indução de raízes em *Pinus taeda* apresentou variações nas respostas fisiológicas com as combinações de ANA e BAP, meio de cultura e tempo de indução das raízes. A formação de raízes adventícias foi observada em todos os tratamentos, com ou sem reguladores, exceto aqueles em que as brotações foram inoculadas em meio de expressão e desenvolvimento sem sais (água e ágar).

O enraizamento *in vitro* de *Pinus taeda* consistiu de duas etapas realizadas com dois meios de cultura: meio de indução de raízes e meio de expressão e desenvolvimento das raízes. A indução de raízes em meio contendo água, ágar e reguladores foi melhor do que com o meio GDm/2. Žel *et al.* (1988) também recomendaram água e ágar para indução, em tratamento pulso de 53,8 μM de ANA por 24h, para *Pinus sylvestris*.

O tratamento de indução por 12 dias em meio composto por água e ágar, acrescido de 2,69 μM ANA e 0,44 μM BAP seguido de transferência para o meio GDm/2, foi o mais eficiente com 47,5% das brotações enraizadas ao final de dez semanas de cultivo. Esse resultado foi semelhante ao de outros trabalhos de *Pinus taeda*, que tem variado entre 30 a 50%, sendo que alguns autores só obtiveram enraizamento com o acréscimo de mais reguladores no meio, como o GA₃ e AIB, além de BAP (MEHRA-PALTA *et al.*, 1978; TANG *et al.*, 1998; TANG e OUYANG, 1999; TANG, 2000, TANG e GUO, 2001). Chang *et al.* (1991) obtiveram resultado inferior ao do presente trabalho utilizando a mesma combinação de reguladores vegetais para *Pinus virginiana* (29,2%).

A indução de raízes em meio de cultura GDm/2, com 0,54 μM de ANA e 0,04 a 0,44 μM de BAP, não foi eficiente (14 a 23%). Entretanto, Mehra-Palta *et al.* (1978) obtiveram 50% de enraizamento com essa combinação. É possível que essa diferença tenha ocorrido pelo fato de se utilizar diferentes famílias ou diferentes genótipos, sendo que, no presente trabalho, foram utilizadas como fontes de explantes mudas do pomar clonal comercial. Alguns genótipos tendem a ter melhores respostas do que outros e, nas espécies florestais, geralmente há uma grande variabilidade no enraizamento em diferentes famílias selecionadas

(FOSTER, 1990; SCALTSOYIANNES *et al.*, 1994; TANG e OUYANG, 1999; CUESTA *et al.*, 2008).

Para a expressão e desenvolvimento de raízes de *Pinus taeda*, os sais do meio GDm foram necessários, pois na presença de água e ágar nessa etapa não ocorreu enraizamento. As porcentagens de enraizamento obtidas nos meios GDm/2 e GDm/4 foram semelhantes. Quando transferidas para o meio de expressão e desenvolvimento GDm/4, as brotações apresentaram em média 2,6 raízes por planta. Esse resultado foi melhor do que os encontrados em alguns trabalhos com *Pinus taeda* e outras espécies de *Pinus*, que apresentaram a média de uma raiz por brotação (TANG *et al.*, 1998; TANG e OUYANG, 1999; TANG, 2000; SCHESTIBRATOV *et al.*, 2003).

Após cinco semanas de cultivo, observou-se que as raízes emergiram em algumas brotações e outras enraizaram na décima semana de cultivo. Essa taxa de enraizamento nesse intervalo de tempo é relativamente boa, comparado a outros trabalhos com *Pinus* que apresentaram porcentagem de 5 a 40% nesse mesmo intervalo (CUESTA *et al.*, 2008; STOJIČIĆ *et al.*, 1999; WATT *et al.*, 1998; GLADFELTER e PHILLIPS, 1987; SCALTSOYIANNES *et al.*, 1994; STIFF *et al.*, 1989). A redução do tempo de permanência das culturas *in vitro*, torna-se economicamente favorável para a utilização da micropropagação em escala comercial.

O meio dupla fase não foi eficiente, provavelmente devido aos reguladores estarem em ambas as fases do meio. As concentrações ficaram mais elevadas e a fase líquida pode promover uma absorção mais rápida pelo explante. Devido a esses fatores, as combinações com o meio dupla fase testadas no presente trabalho, apresentaram efeito inibidor. Testes com concentrações menores ou alternadas em cada fase do meio são necessários para elucidar essas respostas.

A formação de raízes ocorreu de maneira direta e indireta, com a formação de calos precedendo a emergência das raízes. O tempo de indução das raízes, ou tratamentos longos com auxinas pode aumentar o enraizamento bem como inibi-lo, formando às vezes estruturas com aparência intumescida ou calos nas bases das brotações (GLADFELTER e PHILLIPS, 1987; LIN *et al.*, 1991).

Mott e Amerson (1981) utilizando as mesmas concentrações de reguladores, durante 10 a 12 dias em meio GDm/2, também verificaram uma dilatação na base dos explantes de *Pinus taeda*. Esses autores relataram que a epiderme sofre um

rompimento e é formado um calo antes da emergência das raízes. A formação desse calo parece comum para espécies de *Pinus*. Stiff *et al.* (1989) relataram que após 30 dias de tratamento com ANA, protuberâncias menores de 0,5 cm sem uma coifa definida emergiram de calos brancos translúcidos, que se formaram nas bases das brotações de *Pinus monticola* e isso ocorreu em 33% dos explantes. Álvarez *et al.* (2009) também descreveram que o enraizamento foi indireto, com a formação de calo na base das brotações de *Pinus pinaster*, assim como também para *Pinus pinea* (CUESTA *et al.*, 2008).

No presente trabalho, esse tipo de calo foi observado, porém, essa aparência translúcida ocorreu apenas no início de sua formação. Esses calos escureceram após algumas semanas, mas não impediram a formação de raízes. Esse resultado não corrobora com os de Zhang *et al.* (2006), que relataram que os calos formados na base das brotações diminuíram a taxa de enraizamento e também resultou na formação de raízes anormais de *Pinus massoniana*.

Transplântio e aclimatização

As plantas de *Pinus taeda* tiveram 90% de sobrevivência após 90 dias de permanência em casa de vegetação. Resposta semelhante foi relatada por Horgan e Holland (1989) para *Pinus radiata*. Isso demonstrou que *Pinus taeda* se adaptou bem ao transplântio e aclimatização nas condições utilizadas no presente trabalho, quando comparada às outras espécies de *Pinus*, cuja sobrevivência nem sempre é alta (STOJIČIĆ *et al.* 1999). Leach (1979) relatou que 38% de plantas *in vitro* de *Pinus taeda* morreram e que essa mortalidade ocorreu geralmente após três a cinco semanas depois de transplantadas. Isso porque as plantas produzidas *in vitro* são transferidas de um ambiente com condições controladas para um ambiente sujeito a variações de luz, temperatura e umidade. Elas também mudam de um estado heterotrófico para o estado autotrófico (LEACH, 1979).

As plantas aclimatizadas apresentaram um número médio de raízes por planta satisfatório (4,6 raízes, maiores que 1,5 cm). Esse resultado é um fator essencial para a sobrevivência da planta na aclimatização, pois plantas com raízes finas ou pouco ramificadas podem não ser bem adaptadas para a absorção de nutrientes (ANDERSON *et al.* 1992). Os resultados obtidos foram superiores ao encontrado por Abdullah *et al.* (1989) para *Pinus brutia* que apresentou aproximadamente 2 a 2,5 raízes por planta. Esses autores relataram que o baixo

número de raízes obtido por planta, pode ser devido ao efeito residual de altas concentrações de BAP, o que não foi observado no presente trabalho com *Pinus taeda*.

Em plantas micropropagadas de *Pinus taeda* foi observado que as conexões vasculares do caule e raiz não são formadas no estágio inicial de desenvolvimento das raízes formadas a partir de calo. Wagley *et al.* (1987) relataram que uma conexão contínua do sistema vascular da raiz com a parte aérea foi fundamental para a sobrevivência de plantas micropropagadas de *Pinus eldarica*. Segundo Cuesta *et al.* (2008), as brotações de *Pinus pinea* enraizadas *in vitro* apresentaram morfologia normal, com sistema radicial bem desenvolvido e uma conexão vascular entre caule e raiz.

A conexão vascular entre a raiz e o calo ocorreu em um estágio mais avançado de desenvolvimento das raízes *in vitro*, onde células parenquimáticas se diferenciaram em traqueídes e não interferiu na sobrevivência das plantas aclimatizadas, as quais apresentaram 90% de sobrevivência. Esse tipo de diferenciação de células parenquimáticas em traqueídes foi observado em *Pinus pinea*, sob ação de auxina na diferenciação de células do hipocótilo (KALEV e ALONI, 1998). As traqueídes diferenciadas de parênquima apresentavam tamanho reduzido e paredes com espessamento espiralado a pontoadado, como observado por Kalev e Aloni (1998). Elas podem aparecer isoladamente e não necessariamente em um padrão contínuo, podendo se desenvolver lateralmente, como observado no presente trabalho.

5 CONCLUSÕES

Foi estabelecida uma metodologia de enraizamento *in vitro* de *Pinus taeda* a partir de brotações juvenis.

O tempo de indução, o meio de cultura e a combinação de ANA e BAP influenciaram o enraizamento. O meio dupla fase não aumentou o enraizamento.

Os sais do meio GDm não são necessários para indução, porém são para a expressão e desenvolvimento das raízes.

O enraizamento de *Pinus taeda* pode ser obtido em dois estádios: etapa de indução de raízes em meio composto por água, ágar e acrescido da combinação de 2,69 μM de ANA e 0,44 μM de BAP por 12 dias, seguido de transferência para o meio de expressão e desenvolvimento das raízes, composto pelo meio GDm/2 sem reguladores.

A formação de calos na base das brotações foi dependente da combinação de reguladores vegetais, do tempo de indução e do meio de cultura. A conexão entre o sistema vascular da raiz e do calo é presente em raízes maiores que 0,6 cm, sendo recomendado esse tamanho mínimo para o transplântio, uma vez que as plantas aclimatizadas permitiram uma alta porcentagem de sobrevivência.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. A.; GRACE, J.; YEOMAN, M. M. Rooting and establishment of Calabrian pine plantlets propagated *in vitro*: influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. **New Phytologist**, v. 113, p. 193-202, 1989.

ÁLVAREZ, J. M.; MAJADA, J.; ORDÁS, J. An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) isolated cotyledons. **Forestry**, v. 82, p. 175-184, 2009.

ANDERSON, A. B.; FRAMPTON, L. J. Jr.; McKEAND, S. E.; HODGES, J. F. Tissue-culture shoot and root system effects on field performance of loblolly pine. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 22, p. 56-61, 1992.

BERGMANN, B. A.; STOMP, A. M. Effect of genotype on rooting of hypocotyls and *in vitro*-produced shoots of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 195-202, 1994.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University Press; 1976.

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

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines**. USA Patent 5.534.433, 1996.

CUESTA, C.; ORDÁS, R. J.; FERNÁNDEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Clonal micropropagation of six selected half-sibling families of *Pinus pinea* and somaclonal variation analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 125-130, 2008.

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

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

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**, 2 ed., v.2, Springer. 1361pp. 1996.

GLADFELTER, H. J.; PHILLIPS, G, C. De novo shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Mill. *in vitro* I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 163-166, 1987.

HAMANN, A. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.): developmental sequence and effects of maturation. **Trees**, v. 12, p. 175-180, 1998.

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

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. Jr.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and practices**, 7 ed., Prentice-Hall. 880p. 2002.

HICKS, G. S. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 1913-1920, 1987.

HORGAN, K.; HOLLAND, L. Rooting micropropagated shoots from mature radiata pine. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 19, p. 1309-1315, 1989.

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

KALEV, N.; ALONI, R. Role of auxin and gibberellin in regenerative differentiation of tracheids in *Pinus pinea* seedlings. **New Phytologist**, v. 138, p. 461-468, 1998.

LEACH, G. N. Growth in soil of plantlets produced by tissue culture. **Tappi Journal**, v. 62, n. 4, p. 59-61, 1979.

LIN, Y.; WAGNER, M. R.; HEIDMANN, L. J. *In vitro* formation of axillary buds by immature shoots of Ponderosa pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 161-166, 1991.

McKEAND, S. E.; ALLEN, H. L. Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. **Physiologia Plantarum**, v. 61, p. 523-528, 1984.

MEHRA-PALTA, A.; SMELTZER, R. H.; MOTT, R. L. Hormonal control of induced organogenesis experiments with excised plant parts of loblolly pine. **Tappi Journal**, v. 61, n. 1, p. 37-40, 1978.

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

MOTT, R. L.; SMELTZER, R. H.; MEHRA-PALTA, A.; ZOBEL, B. J. Production of forest trees by tissue culture. **Tappi Journal**, v. 60, n. 6, p. 62-64, 1977.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1965.

SCALTSOYIANNES, S.; PANETSOS, K.; ECONOMOU, A.; TSOULPHA, P. Micropropagation of the pine hybrid *Pinus brutia* (Ten) x *Pinus halepensis* (Mill) by culturing fascicle shoots. **Annals of Forest Science**, v. 51, p. 175-182, 1994.

SCHESTIBRATOV, K. A.; MIKHAILOV, R. V.; DOLGOV, S. V. Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 139-146, 2003.

STIFF, C. M.; WENNY, D. L.; DUMROESE, R. K. Establishment of western white pine shoots *in vitro* using needle fascicles. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 19, p. 1330-1333, 1989.

STOJIČIĆ, D.; BUDIMIR, S.; ČULAFIĆ, L. Micropropagation of *Pinus heldreichii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 147-150, 1999.

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

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

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

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

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

WATT, M. P.; RAMGAREEB, S.; HOPE, B.; BLAKEWAY, F. C.; DENISON, N. P. Micropropagation via axillary bud proliferation from seedlings and juvenile shoots of *Pinus patula* Schiede et Deppe. **Southern African Forestry Journal**, n. 181, p. 1-5, 1998.

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

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

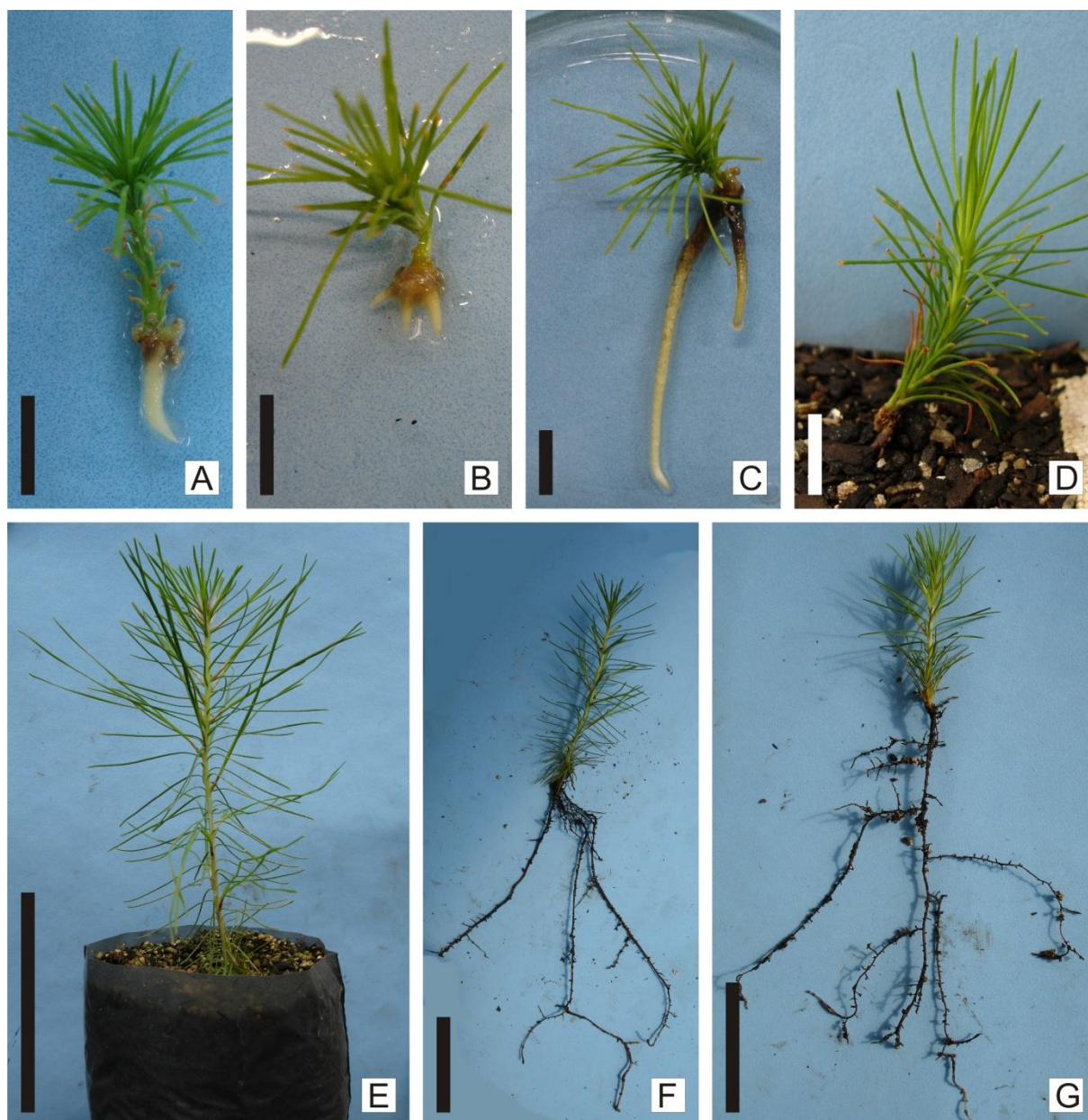


FIGURA 5 – ENRAIZAMENTO *in vitro* DE *Pinus taeda* L. A – RAÍZES *in vitro* FORMADAS DIRETAMENTE DO CAULE; B – RAÍZES *in vitro* FORMADAS A PARTIR DE CALOS NA BASE DAS BROTAÇÕES; C – RAÍZES DESENVOLVIDAS *in vitro* EM MEIO DE CULTURA COMPOSTO POR ÁGUA E ÁGAR ACRESCIDO DE 2,69 μM ANA E 0,44 μM BAP POR 12 DIAS, DEPOIS TRANSFERIDAS PARA MEIO GDM/2; D – PLANTA TRANSPLANTADA EM BANDEJA DE SEMEADURA CONTENDO SUBSTRATO PLANTMAX® FLORESTAS EM CASA DE VEGETAÇÃO; E – PLANTA CRESCENDO EM SACO PLÁSTICO COM SUBSTRATO, DEPOIS DE TRANSPLANTADAS NAS BANDEJAS; F, G – CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO, APÓS 90 DIAS. BARRA: A – D, 1,0 cm; E, 10,0 cm; F – G, 5,0 cm.

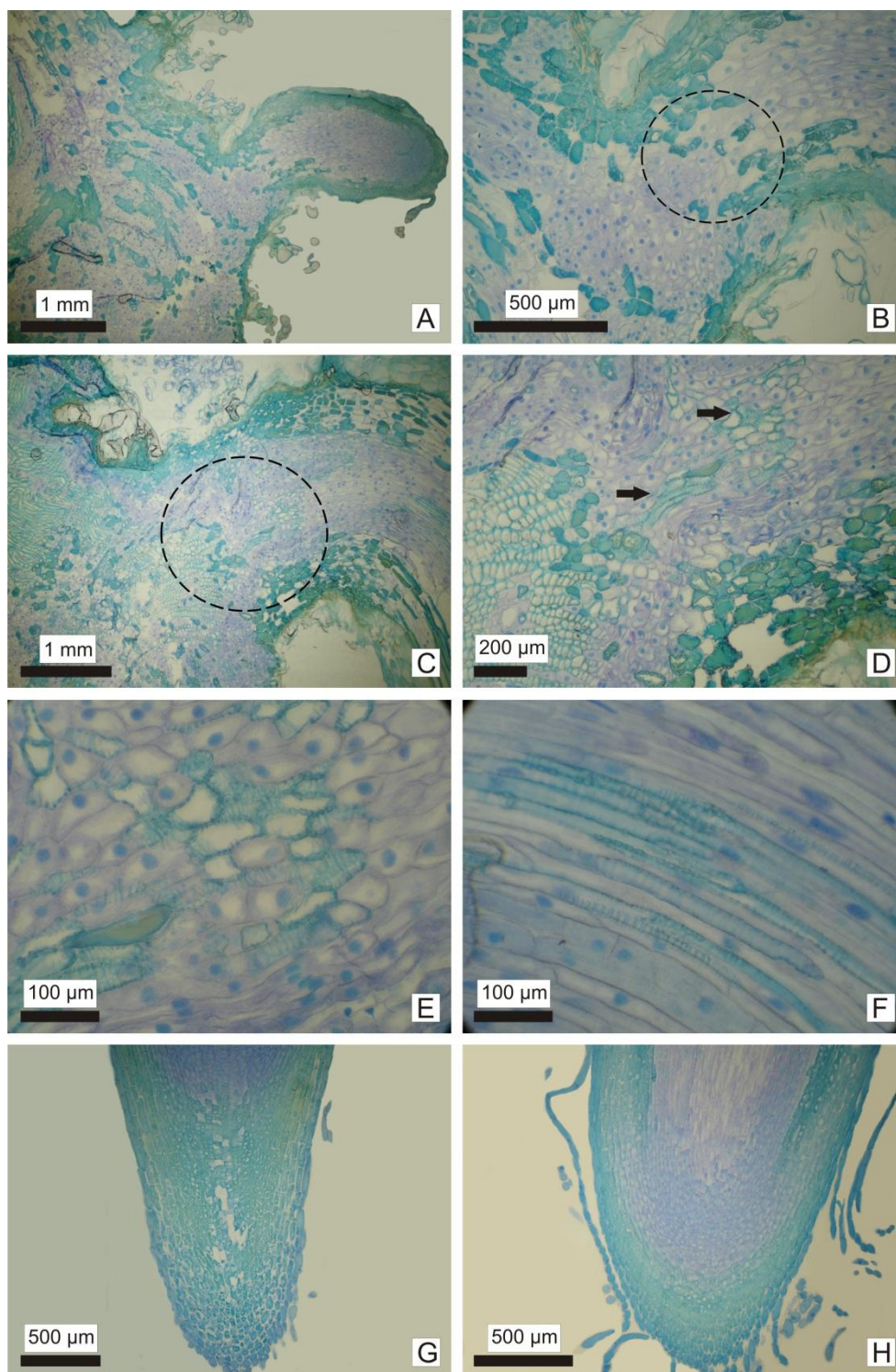


FIGURA 6 – CORTES LONGITUDINAIS DE RAÍZES *in vitro* E ACLIMATIZADAS DE *Pinus taeda* L.: A – PRIMÓRDIO DE RAÍZES *in vitro* EMERGINDO DE CÉLULAS PERIFÉRICAS DO CALO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO E 0,2 CM DE COMPRIMENTO; B – CONEXÃO ENTRE O SISTEMA VASCULAR DA RAIZ E DO CALO AUSENTE; C – RAIZ *in vitro* EM ESTÁGIO MAIS AVANÇADO DE DESENVOLVIDO COM CONEXÃO ENTRE O SISTEMA VASCULAR DA RAIZ E DO CALO, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO E 0,6 CM DE COMPRIMENTO; D, E – DETALHE DAS TRAQUEÍDES DIFERENCIADAS A PARTIR DE CÉLULAS PARENQUIMÁTICAS FORMANDO A CONEXÃO VASCULAR (SETA); F – TRAQUEÍDES FORMADAS A PARTIR DO PROCÂMBIO; G – COIFA DE RAIZ DENSENVOLVIDA *in vitro*, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO E 0,6 CM DE COMPRIMENTO; H – COIFA DE RAÍZ *in vitro* APÓS 60 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de mudas de dois a quatro meses de idade do pomar clonal comercial se mostrou viável. Contudo, seria interessante utilizar famílias selecionadas de *Pinus taeda* para otimizar as respostas *in vitro* ou para obter resultados mais homogêneos, sem muita influência da variabilidade genética.

O meio de cultura WV5 influenciou as respostas de alongamento. Isso possibilitou usar a alternativa de subdivisão das brotações apicais em segmentos. Além disso, com a adição de concentrações alternadas de BAP, a estimativa mostrou que é possível aumentar a produção de brotações.

As melhores respostas foram obtidas, em média, após oito semanas de cultivo em cada etapa ou subcultivo. Isso se torna uma vantagem, uma vez que isso reduz o gasto com meios de cultura. Em testes preliminares, foi evidenciado que culturas permaneceram até mais do que quatro meses no mesmo meio sem apresentar sintomas de necrose, possibilitando a manutenção de um minijardim clonal *in vitro*.

A maior porcentagem de enraizamento alcançada no presente trabalho foi de 47,5%, com tempo de indução de 12 dias. Com isso, é necessário realizar novos testes com tempo de indução maior ou com novas formulações de meios de cultura e reguladores vegetais para aumentar essa porcentagem de enraizamento. O meio dupla fase, não melhorou a porcentagem de enraizamento, por isso recomenda-se testar outras combinações, com concentrações de reguladores pela metade em cada fase do meio, ou utilizar as concentrações em apenas uma fase.

O transplântio e aclimatização foram eficientes. As plantas aclimatizadas se desenvolveram melhor quando as temperaturas foram mais altas, nos meses de novembro e dezembro/2010, sendo necessário realizar estudos comparando a influência das estações do ano.

Mais estudos anatômicos comparando raízes *in vitro*, *in vivo* e aclimatizadas, bem como a formação de raízes diretamente do caule são necessários para entender melhor as diferenças morfológicas e se elas podem afetar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas micropropagadas.

O protocolo de micropropagação de *Pinus taeda* foi estabelecido, porém é necessário mais estudos para otimizar o enraizamento *in vitro* e posteriormente *ex vitro*.

ANEXOS

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DOS SAIS E DAS VITAMINAS DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA TESTADOS PARA O ESTABELECIMENTO *in vitro* E INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES DE *Pinus taeda*.

Macronutrientes (mM)	Meio de cultura			
	MS	DCR	WV3	WV5
NH ₄	20,61	5,0	-	11,3
NO ₃	39,40	10,48	9,0	16,9
Total N	60,01	15,48	9,0	28,2
K	20,05	4,7	19,8	19,8
Ca	2,99	3,0	4,08	4,08
Mg	1,50	1,5	7,75	7,75
S	1,73	1,08	7,87	7,87
Cl	5,98	1,2	17,0	20,4
Na	0,22	0,22	0,22	0,22
P	1,25	1,3	2,0	
Micronutrientes (µM)				
Mn	100	132	90	90
Zn	30	30	30	30
B	100,3	100	500	500
I	5	5	0,48	0,48
Cu	0,1	1	1	1
Mo	1,03	1,03	1,03	1,03
Co	0,105	0,105	0,105	0,105
Fe	100	100	100	100
Ni	-	0,11	-	-
Vitaminas (µM)				
Tiamina	0,296	0,296	1,19	1,19
Ácido nicotínico	4,06	4,06	-	-
Piridoxina	2,43	2,43	-	-
Inositol (µM)	555,06	5550	5550	5550
Aminoácidos (µM)				
Glicina	26,64	26,7	-	-
L-Glutamina	-	-	15700	-
EDTA (µM)		111	111	111

ANEXO 2 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES E NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE, EM DOIS TIPOS DE EXPLANTES (BROTAÇÕES APICAIS E SEGMENTOS NODAIS) INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA MS, NO ESTABELECIMENTO *in vitro*, APÓS SEIS SEMANAS DE CULTIVO.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	
		PE	NB
Tipo de explante	1	43137,291**	73,704**
Erro experimental	58	253,074	0,104
Total	59		
Qui-quadrado (χ^2)	3,244 ^{n.s.}	3,244 ^{n.s.}	1,552 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		24,42	12,33

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES, NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO, EM BROTAÇÕES APICAIS INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV3 ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES, NO CULTIVO INICIAL E NOS DOIS SUBCULTIVOS POSTERIORES.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		PE	NB	AL
Tratamentos	3	745,359*	1,546*	86,822 ^{n.s.}
Erro experimental	16	185,211	0,449	39,777
Subcultivo	2	1039,531*	8,168**	556,265**
Tratamento x Subcultivo	6	164,938 ^{n.s.}	0,167 ^{n.s.}	28,911 ^{n.s.}
Erro experimental	32	249,375	0,220	31,073
Total	59			
Qui-quadrado (χ^2)		18,155 ^{n.s.}	16,763 ^{n.s.}	13,535 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		24,20	17,47	19,39

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante; AL: porcentagem de alongamento.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 4 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES E NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE, EM SEGMENTOS NODAIS INOCULADOS EM MEIO DE CULTURA WV3, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES, NO CULTIVO INICIAL E NOS DOIS SUBCULTIVOS POSTERIORES.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	
		PE	NB
Tratamentos	3	80,069 ^{n.s.}	0,007 ^{n.s.}
Erro experimental	16	651,247	0,028
Subcultivo	2	22239,7**	0,269**
Tratamento x Subcultivo	6	55,091 ^{n.s.}	0,038 ^{n.s.}
Erro experimental	32	726,512	0,050
Total	59		
Qui-quadrado (χ^2)		17,167 ^{n.s.}	16,582 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		33,82	17,24

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 5 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA EM BROTAÇÕES APICAIS E SEGMENTOS NODAIS INOCULADOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, NO ESTABELECIMENTO *in vitro*, APÓS 90 DIAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	
		BA	SN
Meio de cultura	3	1473,333**	940,000
Erro experimental	16	155,000	110,000
Total	19		
Qui-quadrado (χ^2)		5,544 ^{n.s.}	2,373 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		19,15	17,78

BA: brotações apicais; SN: segmentos nodais

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 6 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES, NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, NO ESTABELECIMENTO *in vitro*, APÓS 90 DIAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	
		PE	NB
Meio de cultura	3	981,191 ^{n.s.}	2,379**
Tipo de explante	1	34140,649**	123,201**
Meio de cultura x tipo de explante	3	981,191 ^{n.s.}	0,462*
Erro experimental	32	1541,679	0,152
Total	39		
Qui-quadrado (χ^2)		7,940 ^{n.s.}	4,956 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		55,47	11,42

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO, AUMENTO MÉDIO EM CENTÍMETROS E NÚMERO DE SEGMENTOS POR BROTAÇÃO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, NO ESTABELECIMENTO *in vitro*, APÓS 90 DIAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		AL	CM	SB
Meio de cultura	3	2969,561**	3,923	6,043**
Erro experimental	16	178,117	0,242	0,310
Total	19			
Qui-quadrado (χ^2)		4,532 ^{n.s.}	6,858 ^{n.s.}	1,895 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		25,21	27,16	13,01

AL: porcentagem de alongamento; CM: aumento médio em centímetros; SB: segmentos por brotação.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 8 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES, NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES, NO CULTIVO INICIAL E NO SUBCULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		PE	NB	AL
Tratamentos	3	595,703*	0,050 ^{n.s.}	719,878 ^{n.s.}
Erro experimental	16	173,106	0,190	661,970
Subcultivo	1	2588,881**	1,521 ^{n.s.}	1045,506 ^{n.s.}
Tratamento x Subcultivo	3	43,935 ^{n.s.}	0,182 ^{n.s.}	608,819 ^{n.s.}
Erro experimental	16	224,786	0,447	1032,829
Total	39			
Qui-quadrado (χ^2)		7,603 ^{n.s.}	4,143 ^{n.s.}	6,614 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		24,83	29,52	41,51

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante; AL: porcentagem de alongamento.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES, NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV3, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES, NO CULTIVO INICIAL E NO SUBCULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		PE	NB	AL
Tratamentos	3	577,658 ^{n.s.}	0,541 ^{n.s.}	200,196 ^{n.s.}
Erro experimental	12	592,293	0,652	165,948
Subcultivo	1	242,550 ^{n.s.}	1,240**	55,388 ^{n.s.}
Tratamento x Subcultivo	3	773,853 ^{n.s.}	0,621**	147,834 ^{n.s.}
Erro experimental	12	449,006	0,100	356,616
Total	31			
Qui-quadrado (χ^2)		14,033 ^{n.s.}	12,215 ^{n.s.}	8,345 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		37,05	14,53	47,29

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante; AL: porcentagem de alongamento.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES, NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA DCR, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES, NO CULTIVO INICIAL E NO SUBCULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		PE	NB	AL
Tratamentos	3	294,191 ^{n.s.}	0,595*	920,934 ^{n.s.}
Erro experimental	12	274,349	0,117	297,362
Subcultivo	1	52,275 ^{n.s.}	0,195 ^{n.s.}	1136,453 ^{n.s.}
Tratamento x Subcultivo	3	10,768 ^{n.s.}	0,224 ^{n.s.}	181,991 ^{n.s.}
Erro experimental	12	203,986	0,312	367,651
Total	31			
Qui-quadrado (χ^2)		8,367 ^{n.s.}	10,049 ^{n.s.}	10,851 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		22,14	23,05	54,10

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante; AL: porcentagem de alongamento.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 11 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES, NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE ALONGAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA WV5, ACRESCIDO OU NÃO DE BAP, NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES AXILARES, NO CULTIVO INICIAL E NO SUBCULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		PE	NB	AL
Tratamentos	4	626,264 ^{n.s.}	0,910 ^{n.s.}	2892,479*
Erro experimental	30	317,455	0,526	799,420
Subcultivo	2	2392,924**	6,929**	64229,642**
Tratamento x Subcultivo	8	921,512*	0,625 ^{n.s.}	1752,353**
Erro experimental	60	395,979	0,503	511,377
Total	104			
Qui-quadrado (χ^2)		18,575 ^{n.s.}	18,416 ^{n.s.}	17,256 ^{n.s.}
Coefficiente de variação (%)		31,91	26,58	31,50

PE: porcentagem de explantes com brotações; NB: número médio de brotações por explante; AL: porcentagem de alongamento.

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

^{n.s.} Não significativo

ANEXO 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA COM OU SEM SAIS, ACRESCIDOS DE REGULADORES, APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Meio de cultura	5	629,340 ^{n.s.}
Erro experimental	30	261,285
Total	35	
Qui-quadrado (χ^2)		4,078 ^{n.s.}
Coeficiente de variação (%)		78,90

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

n.s. Não significativo

ANEXO 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA, COMBINADO OU NÃO COM MEIO DUPLA-FASE, ACRESCIDO DE REGULADORES, APÓS QUINZE SEMANAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Meio de cultura	3	1134,983*
Erro experimental	20	243,490
Total	23	
Qui-quadrado (χ^2)		2,200 ^{n.s.}
Coeficiente de variação (%)		73,07

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

n.s. Não significativo

ANEXO 14 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, EM BROTAÇÕES INOCULADAS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO ÁGUA E ÁGAR ACRESCIDO DE REGULADORES, SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE INDUÇÃO E DEPOIS TRANFERIDAS PARA DIFERENTES MEIOS DE DESENVOLVIMENTO, APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Meio de desenvolvimento	1	15,625 ^{n.s.}
Tempo de indução	3	1265,625**
Meio de desenvolvimento x tempo de indução	3	515,625 ^{n.s.}
Erro experimental	32	271,484
Total	39	
Qui-quadrado (χ^2)		9,023 ^{n.s.}
Coeficiente de variação (%)		67,60

* Significativo a 0,05 de probabilidade

** Significativo a 0,01 de probabilidade

n.s. Não significativo