

**LIEGE DA SILVA OLIVEIRA**

**ENXERTIA, MICROENXERTIA E DESCRIÇÃO DO TROPISMO EM  
*Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette.

CURITIBA

2010



Dedico este trabalho aos amores da minha vida,  
meu querido filho Mateus,  
meu marido Ricardo e  
aos meus pais Ailton e Regina.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Flávio Zanette por sua orientação, amizade e apoio durante os anos de trabalho e principalmente pela bela oportunidade de trabalhar com uma espécie tão apaixonante como é a *Araucaria angustifolia*.

À UFPR e ao Programa de Pós-Graduação-Produção vegetal pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Professora Francine Cuquel pelos ensinamentos, sua dedicação e paciência durante minha prática em docência.

Aos professores Luiz Antonio Biasi, João Bernal, Luciana Ribas, Claudine Bona pelos auxílios prestados durante as correções da qualificação e da tese.

A minha companheira de estudos Justina Inês Anselmini, pelos conselhos, sugestões e amparo nos momentos difíceis, porque sem eles não seria possível este trabalho.

Ao pesquisador Ivar Wendling da Embrapa Florestas, que sempre estava pronto para auxiliar e participar do estudo.

Ao Antonio Neto, a Luciana Corrêa, Paola Spandre, pelo companheirismo durante as disciplinas cursadas.

Aos estagiários e amigos, Daniel, Valilda e Daniele, que ajudaram em momentos de trabalho árduo.

Ao senhor Raineirio Ferrarini pelos serviços prestados durante o desenvolvimento da parte prática.

Aos colegas Sumar, Karime e Maria Elisângela pelo apoio e auxílio.

À minha amiga Maria da Graça pelo apoio na língua inglesa.

À família Stavis por sua compreensão da minha ausência.

Aos pais Ailton e Regina pela força e incentivo ao estudo, durante toda minha vida e principalmente por despertar em mim um olhar atento sobre o universo e a ciência.

Ao meu marido Ricardo que sempre está do meu lado, me apoiando com todo carinho e compreensão.

Ao meu querido filho Mateus pela sua presença, amor, carinho e tranquilidade.

Agradeço a todos pesquisadores que vieram antes de mim, e deixaram seus registros, pois somente desta forma se constrói a ciência.

"Somos a personificação local de um Cosmos que cresceu pelo autoconhecimento. Começamos a contemplar nossas origens: material estelar meditando sobre estrelas; assembléias organizadas de dezenas de bilhões de bilhões de bilhões de átomos considerando a evolução dos átomos, traçando a longa jornada através da qual, pelo menos aqui, a consciência surgiu. Nossas lealdades são para com a espécie e com o planeta. Nós respondemos pela Terra. Nossa obrigação quanto à sobrevivência é devida não somente a nós mesmos, mas também a esse Cosmos, antigo e vasto, do qual surgimos."

Carl Sagan

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT.) O. KTZE</b> .....	14
<b>2.2 REPRODUÇÃO SEXUADA</b> .....	15
2.2.1 Androstróbilo.....	16
2.2.2 Ginostróbilo.....	17
2.2.3 Mudanças de sementes.....	19
<b>2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA</b> .....	20
2.3.1 Macropropagação.....	21
2.3.1.1 Estaquia.....	22
2.3.1.2 Enxertia.....	22
2.3.2 Cultura de tecidos de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	23
2.3.2.1 Micropropagação.....	23
2.3.2.2 Microestaquia.....	24
2.3.2.3 Microenxertia.....	25
2.3.2.4 Estudos sobre a embriogênese somática.....	25
<b>2.4 REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>3 CAPÍTULO I ENXERTIA DE <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT.) O. KTZE NO INÍCIO DAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO</b> .....	32
<b>RESUMO</b> .....	32
<b>ABSTRACT</b> .....	33
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
3.3.1 Sobrevivência dos enxertos nas estações do ano.....	40
3.3.2 Primeira avaliação.....	43
3.3.3 Desenvolvimento do enxerto.....	43
3.3.4 Precocidade reprodutiva.....	45
3.3.5 Recuperação do porta-enxerto.....	45
<b>3.4 CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>3.5 REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>4 CAPÍTULO II MICROENXERTIA DE <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT.) O. KTZE</b> .....	51
<b>RESUMO</b> .....	51
<b>ABSTRACT</b> .....	52
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	53
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
4.3.1 Microenxertia de ápice caulinar.....	59
4.3.2 Microenxertia do segmento do caule.....	62
<b>4.4 CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>4.5 REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>5 CAPÍTULO III O TROPISMO EM <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT.) O. KTZE</b> .....	69
<b>RESUMO</b> .....	69
<b>ABSTRACT</b> .....	70
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	71
<b>5.2 MATERIAL E METODOS</b> .....	73
5.2.1 Experimento com ramos plagiotrópicos.....	73
5.2.1.1 Coleta de ramos para a estaquia e enxertia.....	73
5.2.1.2 Estaquia de ramos plagiotrópicos.....	73

5.2.1.3 Enxertos plagiotrópicos.....	74
5.2.2 Experimento com ramos ortotrópicos.....	74
5.2.2.1 Coleta de ramos ortotrópicos para enxertia.....	74
5.2.2.2 Enxertos ortotrópicos.....	75
<b>5.3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
5.3.1 Experimento com ramos plagiotrópicos.....	76
5.3.1.1 Crescimento das plantas provenientes de estaquia sem tutoramento.....	76
5.3.1.2 Crescimento das plantas provenientes de estaquia com tutoramento.....	77
5.3.1.3 Crescimento de ramo plagiotrópico enxertado em ramo ortotrópico.....	77
5.3.1.4 Crescimento de ramo plagiotrópico enxertado em ramo plagiotrópico.....	78
5.3.2 Experimento com ramos ortotrópicos.....	79
5.3.2.1 Crescimento de ramo ortotrópico enxertado em ramo ortotrópico.....	79
<b>5.4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>5.5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>88</b>
6.1 ENXERTIA .....	88
6.2 MICROENXERTIA.....	89
6.3 TROPISMO.....	90

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- *Araucaria angustifolia*; A- PORTA-ENXERTOS COM TRÊS ANOS DE IDADE; B, C, D E E- RAMOS ORTOTRÓPICOS DE ÁRVORES ADULTAS, UTILIZADOS PARA A ENXERTIA; F, G, H E I- RETIRADA DAS ACÍCULAS PARA A ENXERTIA; J- ENCAIXE DO ENXERTO COM O PORTA ENXERTO; K- FIXAÇÃO DA PLACA DE ENXERTIA; L- FIXAÇÃO DO FITILHO..... 38
- FIGURA 2- ENXERTIA DE *Araucaria angustifolia*; A E B- ENXERTOS SOBREVIVENTES REALIZADOS NO INÍCIO DO OUTONO, APÓS O TERCEIRO MÊS; C- ENXERTO NÃO SOBREVIVENTE, REALIZADO NA PRIMAVERA; D E E- ENXERTO REALIZADO NO OUTONO APÓS OITO MESES; F- BROTAÇÃO DO ENXERTO E DO PORTA ENXERTO, APÓS UM ANO E OITO MESES; G E H- ENXERTIA APÓS UM ANO E OITO MESES DOIS ANOS, RESPECTIVAMENTE; I E J- ENXERTIA APÓS DOIS ANOS E OITO MESES, MATERIAL TRANSPLANTADO PARA O CAMPO, COM A SETA INDICANDO O LOCAL DA ENXERTIA..... 39
- FIGURA 3- *Araucaria angustifolia* A- PINHÃO SEM O TEGUMENTO; B- EMBRIÃO; C- EMBRIÃO ISOLADO EM MEIO DE CULTURA; D- EMBRIÕES GERMINADOS *IN VITRO*; E- MICROPORTA-ENXERTO; F E G- ASPECTO GERAL DE RAMOS ORTOTRÓPICOS UTILIZADOS COMO MICROENXERTOS; H- ÁPICE CAULINAR APÓS A RETIRADA DE ALGUMAS ACÍCULAS; I- ÁPICE CAULINAR SECCIONADO UTILIZADO NA MICROENXERTIA; J E K- SEGMENTO CAULINAR UTILIZADA NA MICROENXERTIA; L- MICROENXERTIA DE ÁPICE CAULINAR; M- MICROENXERTIA DO SEGMENTO DO CAULE..... 58
- FIGURA 4- *Araucaria angustifolia*; A- ASPECTO GERAL DOS RAMOS COM CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO; B- ASPECTO GERAL DOS RAMOS COM CRESCIMENTO ORTOTRÓPICO, COM DIÂMETRO SUPERIOR; C E D- RAMOS ORTOTRÓPICOS PROVENIENTES DE BROTAÇÕES NATURAIS AO LONGO DO CAULE; E- BROTOS ORTOTRÓPICOS INDUZIDOS PELA PODA DO ÁPICE DA ÁRVORE; F- BROTAÇÕES INDUZIDAS APÓS A RETIRADA DA COPA..... 81
- FIGURA 5- *Araucaria angustifolia*; A- ASPECTO GERAL DA ESTACA PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO CRESCENDO RENTE AO CHÃO; B- ASPECTO GERAL DA ESTACA, PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO COM TUTOR PARA AUXILIAR A VERTICALIZAÇÃO DO RAMO DURANTE O CRESCIMENTO; C- DETALHE DO ÁPICE DO RAMO APÓS O SÉTIMO VERTICILLO; D E E- DETALHE DO DIÂMETRO DO CAULE NA BASE DA ESTACA E NA REGIÃO APICAL, RESPECTIVAMENTE..... 82
- FIGURA 6- *Araucaria angustifolia*; A E B- ASPECTO GERAL DO ENXERTO DO TIPO GARFAGEM DE TOPO, PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO; C- ASPECTO GERAL DO ENXERTO DO TIPO GARFAGEM DE TOPO, PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO QUE RECEBEU O AUXÍLIO DE TUTOR DE CONDUÇÃO, VERTICALIZANDO O CRESCIMENTO DA PLANTA; D E E- DETALHE DO CALO OBSERVADO EM ENXERTOS APÓS O PRIMEIRO E SEGUNDO ANO DA ENXERTIA, RESPECTIVAMENTE..... 83

FIGURA 7-*Araucaria angustifolia*; A, B E C- RAMO PLAGIOTRÓPICO ENXERTADO EM RAMOS PLAGIOTRÓPICO APÓS QUATRO, OITO E ONZE MESES DA ENXERTIA, RESPECTIVAMENTE; D- ASPECTO GERAL DA PLANTA ENXERTADA COM RAMO ORTOTRÓPICO PROVENIENTE DA GARFAGEM, APÓS UM ANO E SETE MESES; E- ASPECTO GERAL DA PLANTA ENXERTADA COM RAMO ORTOTRÓPICO PROVENIENTE DA PLACAGEM APÓS DOIS ANOS E OITO MESES DE ENXERTIA; F- ASPECTO GERAL DA PLANTA ENXERTADA COM RAMO ORTOTRÓPICO PROVENIENTE DA PLACAGEM APÓS TRÊS ANOS E OITO MESES DE ENXERTIA; G E H- DETALHE DO CALO DE ENXERTIA DOS RESPECTIVOS ENXERTOS.....

## LISTA DE TABELA

TABELA 2- PORCENTAGEM DA SOBREVIVÊNCIA DOS ENXERTOS DE <i>A. angustifolia</i> REALIZADOS NAS ESTAÇÕES DO ANO EM 2007, APÓS 80 E 120 DIAS.....	41
TABELA 2- PORCENTAGEM DA SOBREVIVÊNCIA DOS ENXERTOS DE <i>A. angustifolia</i> REALIZADOS NAS ESTAÇÕES DO ANO EM 2008, APÓS 80 E 120 DIAS .....	41
TABELA 3- PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE MICROENXERTOS REALIZADOS COM <i>Araucaria angustifolia</i> PELO MÉTODO DE MICROENXERTO DE ÁPICE CAULINAR E SEGMENTO DE CAULE.....	59

## RESUMO

A *Araucaria angustifolia* está ameaçada de extinção devido à extração predatória realizada pelo homem nas últimas décadas. Atualmente existem pequenos fragmentos da Floresta Atlântica, local onde a espécie está inserida. A *A. angustifolia* se destaca pela grande importância na conservação do ecossistema, pois além de servir como alimento para os animais no interior da floresta, cria condições de sombreamento para o crescimento de outras espécies vegetais como a erva-mate, imbuia e canela-sassafrás. É de fundamental importância incentivar o seu plantio visando a produção de pinhão, alimento altamente nutritivo. A produção de mudas com características desejáveis como a escolha do sexo, precocidade reprodutiva, alta produtividade de pinhão e diminuição do porte, podem ser realizadas por meio da clonagem. Esta pesquisa teve como objetivo estabelecer um protocolo para a produção de árvores clonadas, por meio da enxertia e da microenxertia e conhecer o tropismo dos ramos de *A. angustifolia*. A enxertia, do tipo placagem lenhosa, foi realizada em porta-enxertos com três anos de idade e com borbulhas provenientes de ramos ortotrópicos jovens de plantas adultas. Com o objetivo de determinar a melhor época do ano para se fazer a enxertia. Este procedimento foi realizado no início de cada estação do ano, com duas repetições, totalizando 160 enxertos. Os enxertos realizados no início do outono tiveram a taxa de sobrevivência média de 50%. Nas demais estações não foram obtidos resultados significativos. Conclui-se que a enxertia por placagem lenhosa é viável para a produção de mudas de araucária. Para a microenxertia, foram utilizados microporta-enxertos preparados a partir de embriões germinados *in vitro*. O material vegetal utilizado nas microenxertias foi retirado de ramos ortotrópicos jovens de indivíduos adultos pré-selecionados. A microenxertia foi realizada na região de epicótilo em microporta-enxertos de dois meses de idade, utilizando a garfagem de topo e da borbulha com corte horizontal, no local de contato dos tecidos. Os microenxertos realizados com o ápice caulinar apresentaram 54% de sobrevivência aos trinta dias, mas não ocorreu o crescimento dos propágulos. Os microenxertos realizados com as borbulhas oxidaram e não sobreviveram. A descrição do hábito de crescimento de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos permitiu conhecer os propágulos que poderão ser utilizados na clonagem da araucária.

**Palavras-chave:** Pinheiro do Paraná, propagação vegetativa, micropropagação

## Grafting, micrografting and tropism description in the *Araucaria angustifolia*

### ABSTRACT

The *Araucaria angustifolia* is an endangered species due to the predatory extraction performed by humans in the recent decades. Currently, there are small Atlantic Forest fragments where the species is inserted. The *Araucaria angustifolia* has an outstanding role in the conservation of the ecosystem: besides supplying with food the animals in the inner forest during winter, it creates shading conditions for the growth of other vegetable species such as Paraguay tea (*Ilex paraguariensis*), the imbuya phoebe (*P. porosa*) and sassafras-cinnamon, among others. It is fundamental to stimulate its plantation aiming pine seed production which is a highly nutritious food. The production of seedlings with desired characteristics such as sex determination, high production of pine seeds in female trees, precocious reproduction and low height may be carried out through cloning. This research aimed to establish a protocol for the production of cloned trees, through grafting and micrografting, besides describing the growth habit of *Araucaria angustifolia* branches. The grafting of the bark patch type was held in three-year-old rootstocks and with graftings from adult plants. The aim of the grafting was to determine the best season of the year to make the grafting. This procedure was carried out in the beginning of each season of the year, with two repetitions in the total of 160 graftings. The graftings carried out in the beginning of the fall had 50% of tissue union. During all the other seasons, winter, spring and summer, there were not meaningful results. There can be concluded that the grafting through bark patching is viable for the production of the *Araucaria angustifolia* seedlings. For the micrografting, micro-rootstocks from seeds germinated *in vitro* were used. The vegetable material used in the micrografting was withdrawn from young orthotropic branches of pre-selected adult individuals. The micrografting was held in the epicotyl region, in two-month-old micro-rootstocks through the grafting of top and horizontal cut bud technique where there was tissue contact. The micrografting hold with the caulinar apex had a good tissue union result with 54% but there was no growth of propagules. The micrografting performed with buds oxidized and did not survive. These results open new paths for future micrografting works. The description of the growth habit of the orthotropic and plagiotropic branches was important for the comprehension of the propagule induction mechanisms that may be used for the *Araucaria angustifolia* cloning.

**Key-words:** Parana-pine, vegetative propagation, micropropagation.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente a Floresta Ombrófila Mista ou Floresta com Araucária forma um importante depósito da biodiversidade do planeta. A intensa exploração desta floresta gerou grande devastação sem precedentes, restando apenas 1 a 2% de sua área original, sendo considerado o bioma mais ameaçado de extinção do mundo (KOCH e CORRÊA, 2002). A *Araucaria angustifolia* chegou a representar mais de 40% das árvores existentes na Floresta e cobriu 200.000 km<sup>2</sup> do território brasileiro, principalmente nos Estados do Sul e Sudeste (RMA, 2005). Um dos grandes desafios do século XXI é reverter o processo de degradação ambiental que ocorreu após a revolução industrial, quando o processo extrativista tomou grandes proporções.

Atualmente, a *A. angustifolia* integra a lista das espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 2009). Trata-se de uma espécie chave na conservação do ecossistema (SOLÓRZANO-FILHO, 2001), estando ligada culturalmente à população por apresentar grande valor social e econômico, além de ser a árvore símbolo do estado do Paraná.

A formação de mudas provenientes de sementes se restringe a poucos meses do ano (CARVALHO, 1994), devido à perda de 45% da sua capacidade germinativa após 120 dias de armazenamento (SUITER FILHO<sup>1</sup>, 1966 *apud* CARVALHO, MEDRADO e HOEFLICH, 2003). Somando-se a essa característica, as árvores normalmente produzem sementes após quinze a vinte anos de idade (BANDEL e GURGEL, 1967). Visando trabalhos de preservação, é fundamental conhecer a morfologia (HERTEL, 1980), fenologia (SHIMOYA, 1962; MANTOVANI, MORELLATO e REIS, 2004; ANSELMINI, 2005; ANSELMINI, ZANETTE e BONA, 2006) e a fisiologia dos processos de propagação vegetativa.

As técnicas de propagação por estaquia (IRITANI, SOARES e GOMES, 1986), por enxertia (KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) e por micropropagação (ZANETTE, IRITANI e PAULA, 1987; IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992, 1993; IRITANI, 1997; ASTERITA e GUERRA, 1998; GUERRA et al., 2000; SANTOS et al., 2002; ANSELMINI e ZANETTE, 2008a; STEINER, SILVEIRA e GUERRA, 2007) tem

---

<sup>1</sup> Suiter Filho, W. **Conservação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Piracicaba: ESALQ, p. 15, 1966. Mimeografado

sido utilizadas na tentativa de desenvolver um protocolo eficiente para a produção de mudas de *A. angustifolia*, mas sem resultados satisfatórios para a produção em grande escala. Estas pesquisas visaram o melhoramento genético, bancos de germoplasma, pomares clonais e pomares com a maximização da produção do pinhão, alimento altamente nutritivo.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de multiplicação vegetativa da *A. angustifolia* visando produção de árvores clonadas para a produção de pinhão, explorando a técnica da enxertia e microenxertia, incluindo o estudo do tropismo no crescimento dos ramos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE

A espécie representa um fóssil vivo, que evoluiu da era mesozoica, há aproximadamente 250 milhões de anos. Sobreviveu a grandes transformações geológicas, teve momentos favoráveis e se expandiu. Quando as mudanças climáticas e as alterações no ambiente foram hostis, diminuiu o território ocupado. É por este motivo que fósseis de *A. angustifolia* são encontrados no nordeste do país (IBGE, 1992).

Após milhões de anos de seleção natural, a *A. angustifolia* representa grande sucesso ecológico, entretanto, apenas meio século de extrativismo predatório levou a espécie ao risco de extinção (IBAMA, 2009). A distribuição geográfica da *A. angustifolia* limita-se às latitudes de 19° e 30° S e longitudes de 40° e 57° W, concentrando-se nos estados do Sul do país. Normalmente é encontrada em altitudes que variam entre 500 a 1500 m, podendo chegar até 2300 m (HUECK, 1972; REITZ, KLEIN e REIS, 1979; KOCH e CORRÊA, 2002).

A *A. angustifolia* é uma espécie dioica (raramente monoica), perenifólia, heliófita pioneira, típica de região de altitude, possui tronco reto, cilíndrico, com altura média variando entre 20 a 25 m, com diâmetro na altura do peito de 1,30 m a 2,5 m (LORENZI, 2002; FRANCO e DILLENBURG, 2007; SOUSA et al., 2008). Inicialmente as plantas jovens apresentam copa cônica, os ramos primários são cilíndricos e curvados para cima, sendo os inferiores maiores. As folhas ou acículas são presas diretamente aos ramos da planta, são simples, alternadas, espiraladas, lineares a lanceoladas, coriáceas, com até 60 mm de comprimento por 10 mm de largura.

Até o terceiro ano ocorre um crescimento lento das mudas de araucária (AQUINO, 2005), embora este fator esteja relacionado com a disponibilidade de nutrientes (HOPPE, 1980), umidade, temperatura, genótipo da planta, luminosidade e espaçamento entre as árvores a medida em que a planta cresce (OLIVEIRA, PILLAR e ROIG, 2007). Aos três anos de idade já existe uma diferença morfológica nítida entre os ramos com crescimento plagiotrópico e o tronco principal, ortotrópico.

As árvores adultas apresentam ramos dispostos em 8 a 15 verticilos, cada verticilo com 6 a 10 ramos espiralados, os verticilos encontram-se mais próximos em direção ao ápice. Nesta fase a árvore apresenta a forma de um candelabro. Raramente ocorrem brotações ao longo do caule (HERTEL, 1980; SOLÓRZANO-FILHO, 2001).

A árvore é longeva atingindo em média 200 a 300 anos, existindo exemplares com 386 anos de idade, que foram identificados de acordo com a contagem dos anéis de crescimento (GOLFARI, 1971; MATTOS<sup>2</sup> *apud* CARVALHO, 2003; KOCH e CORRÊA, 2002; OLIVEIRA, PILLAR e ROIG, 2007).

A idade em que ocorre a primeira floração das árvores ou a produção de pinhão varia individualmente. Em plantas isoladas, observou-se produção de sementes com dez e quinze anos, podendo ocorrer após vinte a vinte seis anos em povoamentos com árvores plantadas próximas. Uma árvore pode produzir pinhão por mais de 200 anos, em média produz 40 pinhas por ano, chegando a atingir até 398 pinhas (MATTOS<sup>2</sup>, *apud* CARVALHO, 2003; KAYUVÁ, 2009). A extração de pinhões pelo homem é uma atividade predatória, mas, se manejada adequadamente, pode ser usada como aliada para a preservação da espécie. Estudos apontam que o produto não madeireiro como o pinhão contribui para preservação da floresta, mas é preciso avançar na direção de critérios de acesso sustentável, utilizando a agricultura familiar como parceira na conservação da floresta (SOLÓRZANO-FILHO, 2001; FLORIANI, 2007).

## 2.2 REPRODUÇÃO SEXUADA

O primeiro trabalho sobre a reprodução da *A. angustifolia* ocorreu quando a espécie tinha o nome de *Araucaria brasiliensis*, tendo o autor feito uma descrição taxonômica, dando enfoque às estruturas reprodutivas por meio de ilustrações detalhadas (LAMB, 1863). Na sequência, Burligame (1913, 1914 e 1915) publicou três artigos referentes à reprodução da *Araucaria brasiliensis*, descrevendo o processo de formação dos androstróbilos, ginostrobilos e fertilização.

---

<sup>2</sup> Mattos, J. R. **O pinheiro brasileiro**. São Paulo: Grêmio Politécnico, 1972. 620 p.

### 2.2.1 Androstróbilo

O ciclo do androstróbilo na *A. angustifolia* é simples quando comparado com o do ginostrobilo. Todos os androstróbilos presentes na planta encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento, ao contrário do que acontece com os ginostróbilos, podendo-se em uma mesma árvore observar ginostróbilos no 1º, 2º e 3º ano de desenvolvimento (ANSELMINI, 2005; ANSELMINI e ZANETTEb, 2008).

Para Mantovani, Morellato e Reis (2004), o crescimento do androstróbilo ocorre em um período de sete meses, desde o início da formação em fevereiro até a liberação do pólen a partir de agosto. Entretanto, para Anselmini e Zanette (2006), o ciclo inicia-se em novembro e dezembro, totalizando dez a onze meses de desenvolvimento até a maturação. Esta diferença de três meses provavelmente se deve ao fato do trabalho realizado por Anselmini e Zanette (2006) ter contado com ajuda de uma plataforma elevatória de 18 m de altura, com observações feitas no topo da árvore. Desta forma, o início da formação dos androstróbilos foi registrado precocemente com estruturas visíveis a partir de 4 mm. No início do desenvolvimento, o androstróbilo é protegido pelas folhas terminais e é de difícil visualização. Num estágio mais avançado de desenvolvimento, mede aproximadamente 10 cm, apresenta coloração verde e um eixo longitudinal retilíneo; posteriormente, durante a maturação, observa-se mudança na cor para marrom e um curvamento no eixo longitudinal. Na fase da polinização, aproximadamente em setembro, observa-se um afrouxamento dos microsporófilos dando acesso ao vento para a liberação do pólen (HERTEL, 1980).

Vários autores citam que a liberação do pólen ocorre em setembro, porém as condições ambientais como pluviosidade e temperatura podem antecipar ou retardar o amadurecimento do pólen (SOUSA, 2000; MANTOVANI, MORELLATO e REIS, 2004; ANSELMINI e ZANETTE, 2006). Em anos mais secos, a dispersão do pólen é rápida, enquanto em anos com alta umidade do ar, a dispersão do pólen pode levar até 3 meses (SOUSA, 2000). Desta forma, a liberação do pólen pode ocorrer entre agosto e setembro (MANTOVANI, MORELLATO e REIS, 2004), ou entre agosto e outubro (ANSELMINI e ZANETTE, 2006).

Internamente ao androstróbilo, são observados pequenos agrupamentos, os microesporófilos. Burlingame (1913) observou 1000 microesporófilos dispostos em espiral, enquanto Hertel (1980) observou 1300 microesporófilos por

androstróbilos. Cada microesporófilo contém aproximadamente 10 a 15 microesporângios, com deiscência longitudinal. Em cada microesporângio aproximadamente entre 500 a 1000 grãos de pólen que são produzidos (BURLINGAME, 1913) a partir do armazenamento dos micrósporos (GIFFORD e FOSTER, 1989). Desta forma, cada androstróbilo produz facilmente um milhão de grãos de pólen.

Para Burlingame (1913), os microsporângios são formados a partir das divisões periclinais das células da hipoderme. Na sequência do desenvolvimento, a célula mãe do grão de pólen aumenta seu volume (citoplasma, vacúolos, núcleos) e mudanças químicas são realizadas internamente no esporângio, principalmente com relação às estruturas mucilaginosas.

O grão de pólen de *A. angustifolia* apresenta uma estrutura esferoidal com diâmetro entre 60-90 µm. A exina apresenta cerca de 3 µm de espessura, sendo finamente granulada e um tanto frágil e se rompe no processo de acetólise (ERDTMA, 1952). No grão de pólen, numerosos núcleos foram encontrados (BURLINGAME, 1913), fato esse não encontrado em *Podocarpus*, *Dacrydium*, *Phyllocladus* e *Saxegotha* (GIFFORD e FOSTER, 1989).

Estudos sobre a germinação do grão de pólen de *A. angustifolia* foram realizados, tendo mostrado que diferentes tipos de açúcares e concentrações não influenciaram sua germinação. Os resultados de germinação foram inferiores a 3%, porém, novas pesquisas, utilizando concentrações inferiores de 25% de açúcar, sugeriram que açúcares poderiam provocar um efeito estimulante na germinação do pólen (SOUSA-LANG e PINTO, 1997).

### 2.2.2 Ginostróbilo

O desenvolvimento do ginostróbilo ou estróbilo feminino da *A. angustifolia* traz algumas discussões estruturais, morfológicas e fenológicas. As fases precoces do desenvolvimento do ginostróbilo são de difícil detecção (SHIMOYA, 1962; HERTEL, 1980; ANSELMINI, 2005). Inicialmente, as estruturas estão escondidas nos monófilos terminais; posteriormente, os ginostróbilos são expostos ao ambiente. Essa observação precoce do ginostróbilo só foi possível graças às observações realizadas na altura da copa (ANSELMINI e ZANETTE, 2006).

Desta forma, fica fácil compreender os diferentes resultados do ciclo reprodutivo da *A. angustifolia*. Burlingame (1914) e Mantovani, Morellato e Reis (2004) observaram um ciclo reprodutivo visível de até 24 meses. Shimoya (1962) determinou o período de 46 a 48 meses e Hertel (1980) descreveu a necessidade de 36 a 48 meses para a maturação dos pinhões. Anselmini, Zanette e Bona (2006) relataram um período de 29 a 34 meses para o ciclo completo de reprodução nas condições ambientais da região de Curitiba. Além da difícil visualização das estruturas reprodutivas no início do desenvolvimento, fatores genéticos e climáticos também interferem nos processos do desenvolvimento do pinhão, tornando difícil afirmar o período exato do início até o final da formação do pinhão.

Shimoya (1962) classificou os estróbilos em três grupos. O primeiro grupo foi formado por ginostrobilos com 3 ou 4 cm de diâmetro, que não apresentaram nenhuma formação ovular, apenas tegumento e massa nucelar simples. O segundo grupo foi formado por ginostrobilos com 4 cm até 6 cm, observando-se tubos polínicos no ápice nucelar e formação de câmeras de tubos. O terceiro grupo foi formado por ginostrobilos de 7 a 8 cm, que apresentaram oosferas já fecundadas. Anselmini e Zanette (2008b) observaram que, entre o mês de novembro a junho, pode-se constatar a presença de ginostrobilos com três estádios de desenvolvimento em uma mesma árvore, porém estádios diferentes daqueles descritos por Shimoya (1962). O primeiro estádio do ginostrobilo, não é visível, pois está protegido por acículas e somente após nove meses é exposto. No segundo estádio, os ginostrobilos estão prontos para receber o pólen. No terceiro estádio de desenvolvimento, os ginostrobilos já foram polinizados. Entretanto, o trabalho realizado por Anselmini, Zanette e Bona (2006) merece uma atenção especial, pois contou com equipamento especial para pesquisar no topo da árvore, diminuindo o erro durante a observação dos ginostrobilos.

Na ocasião da polinização, que se inicia em setembro (MANTOVANI, MORELLATO e REIS, 2004; ANSELMINI, 2005) ou em outubro (SHIMOYA, 1962), os megasporângios não completaram seu desenvolvimento. Entre a polinização e a fertilização, foi registrada uma variação entre doze a quatorze meses (BURLINGAME, 1913, 1915; SHIMOYA, 1962). Nesse tempo, entre a polinização e a fertilização, os gametófitos femininos e masculinos terminam seu desenvolvimento.

O pólen cai a uma distância considerável do óvulo (BURLINGAME, 1913). Hertel (1980) cita que não há estrutura especificamente captadora do pólen, mas,

segundo Shimoya (1962), foram encontradas glândulas que secretam uma substância adesiva para reter o pólen e promover o desenvolvimento do tubo polínico na região de união dos megasporângios, o que facilita o processo.

A polinização dirigida está sendo usada como ferramenta para cruzamento com populações distantes, abrindo novas expectativas para a produção de mudas selecionadas (ANSELMINI, ZANETTE e BONA, 2006; ZANETTE, 2007a; 2007b).

O desenvolvimento do tubo polínico ocorre em duas fases, uma externa e outra interna. Na fase externa, os grãos de pólen levam aproximadamente dois meses para germinar entre os megasporângios, formando uma delicada teia. Na fase interna, após a penetração do tubo polínico na nucela apical, as células da nucela tornam-se ricas em amido. E esse amido é assimilado pelo tubo polínico no seu desenvolvimento, formando a primeira câmara do tubo (SHIMOYA, 1962). Os tubos só crescem onde há células ricas em amido. A destruição do tecido nucelar pela penetração dos tubos polínicos estimula a formação de numerosos arquegônios (SHIMOYA, 1962; GIFFORD e FOSTER, 1989).

O início da formação do pró-embrião é muito rápida, sendo o embrião formado por radícula, região do suspensor, hipocótilo e dois cotilédones. Foram observados três ou até quatro pró-embriões por semente. As células pró-embriônicas podem ser numerosas, mas a maioria fica nas cavidades arquegonais primitivas e apenas uma se desenvolve até o final. O tecido endospermico primário desenvolve-se paralelamente ao pró-embrião, contém dez ou mais núcleos por célula como consequência de muitas mitoses. Quando cessam as mitoses, ocorre a formação do amido, passando então a endosperma secundário, tecido nutritivo do pró-embrião. O endosperma secundário se forma somente na região aonde o pró-embrião ou pró-embriões irão se desenvolver. Nem todos os arquegônios fecundados irão formar o embrião, pois se houver uma diferença de maturidade dos gametas ou algum defeito, ocorrerá sua degeneração, sem que haja o desenvolvimento do embrião, formando pinhão chocho (SHIMOYA, 1962).

### 2.2.3 Mudas de sementes

A produção de mudas a partir de semente da *A. angustifolia* é simples, mas se restringe a alguns meses no ano. A maturação das sementes ocorre de entre

abril a setembro (ANSELMINI, 2005). No entanto, as sementes são do tipo recalcitrante (TOMPSETT, 1984), não toleram a perda de umidade abaixo de 37% e nem o armazenamento a baixa temperatura. Existe uma queda de germinação com o aumento do período de armazenamento das sementes (FONTES, DAVIDE e DAVIDE, 2001).

A seleção das sementes é importante para a produção de árvores com qualidade. Antes da semeadura é aconselhável colocar as sementes em um recipiente com água, as que boiarem devem ser eliminadas, pois dificilmente irão germinar. Para acelerar a germinação as sementes devem permanecer na água por 24 horas. Vários recipientes podem ser usados para a produção de mudas, entretanto, o uso de tubetes é aconselhável, pois não enovelam as raízes, facilitam o manejo e o plantio a campo. O uso de substrato deve ser adaptado à disponibilidade de material que cada produtor possui, mas tem que ter boa drenagem, boa homogeneidade, baixa densidade e ser livre de pragas (WENDLING e DELGADO, 2008). A germinação início dá-se entre 20 a 110 dias (KUNIYOSHI, 1983). As mudas devem passar por uma rustificação antes de serem levadas para o campo, os demais cuidados são os mesmos as demais espécies florestais.

### **2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA**

A propagação vegetativa é uma importante ferramenta na cadeia do melhoramento genético, maximizando ganhos em uma única geração, mantendo as características favoráveis, evitando a variabilidade encontrada em árvores obtidas de semente. A propagação clonal de pinus e eucaliptos evoluiu muito nas últimas três décadas (HIGASHI, SILVEIRA e GONÇALVES, 2000), mas poucos trabalhos com *A. angustifolia* foram desenvolvidos em macropropagação (GURGEL, GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975; BETTIO, WENDING e DUTRA, 2008) e micropropagação (ZANETTE, IRITANI e PAULA 1987; IRITANI, 1981; IRITANI, SOARES e GOMES, 1986; IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992, 1993; IRITANI, 1997; ANSELMINI e ZANETTE, 2008a).

A propagação vegetativa da *A. angustifolia* pode contornar duas barreiras existentes quando se tem como objetivo a produção de pinhão: antecipar a produção da semente, que ocorre naturalmente após aproximadamente quinze anos de idade (BANDEL e GURGEL, 1967), e determinar o sexo da árvore. Além disso, a clonagem leva à seleção de matrizes com alta produção de pinhão, seleção de árvores de menor estatura (facilitando a coleta de pinhões), uniformidade no crescimento e disponibilidade imediata de mudas de alta qualidade para o plantio comercial.

### 2.3.1 Macropropagação de *Araucaria angustifolia*

Não existe um protocolo eficiente para propagar *A. angustifolia* em grande escala por estaquia (IRITANI, SOARES e GOMES, 1986) ou enxertia (GURGEL e GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975). O hábito de crescimento dos ramos é uma barreira para a propagação vegetativa, pois apresentam crescimento plagiotrópico ou ortotrópico.

Os ramos ortotrópicos crescem no ápice da árvore ou em brotações laterais do tronco, na maioria das vezes com diâmetro avantajado para se fazer enxertia (KAGEYAMA e FERREIRA, 1975). Os ramos plagiotrópicos apresentam crescimento lateral, simetria bilateral, crescimento e tempo de vida limitado (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992). Esses ramos, quando utilizados para enxertia (KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) ou estaquia (IRITANI, 1981), não formam indivíduos normais, pois desenvolvem indivíduos com crescimento lateralizado (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992). Entretanto, em *Araucaria excelsa* ocorreu uma reversão parcial do plagiotropismo após quatro enxertias sucessivas em mudas muito jovens, mas ainda com simetria bilateral (MAENE e DEBERGH, 1987). Este resultado abre uma perspectiva para futuros trabalhos com *A. angustifolia*.

Não se conhecem os mecanismos que levam o meristema apical do caule a formar gema axilar ortotrópica ou plagiotrópica. Sabe-se que as células meristemáticas encontradas nas axilas das folhas ao longo do caule são capazes de produzir brotações ortotrópicas. As mudanças ambientais, nutricionais e hormonais podem causar mudanças fisiológicas e morfológicas, temporárias ou permanentes (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992).

É fundamental, para desenvolver a macropropagação da *A. angustifolia*, a indução de brotações epicórmicas. Wendling et al. (2009) induziram quatro regiões distintas da árvore a produzir brotações ortotrópicas. Os ramos laterais de árvores adultas emitiram o maior número de brotos, incluindo brotações ortotrópicas, plagiotrópicas e brotações sem definição quanto ao tropismo. As brotações resultantes do corte raso da árvore apresentaram um índice 90% de brotos com crescimento ortotrópico, com aproximadamente 40 brotações por planta.

#### 2.3.1.1 Estaquia

A estaquia de *A. angustifolia* foi realizada com os ramos que apresentavam crescimento plagiotrópico, de planta com quatro anos de idade. As estacas foram retiradas de segmentos com 17 a 20 cm, e após a assepsia, o material botânico foi tratado com duas auxinas: ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indol-3-butírico (AIB). Uma boa taxa de sobrevivência e formação de calo foi observada, mas a formação de raízes ocorreu em 19,44% do material. Secções transversais feitas nas raízes mostraram sua origem nos meristemas formados pela dediferenciação de células parenquimáticas do calo. Foram observados em média 4-5 primórdios radiciais, mas somente um ou dois emergiram da estaca formando a raiz, que era funcional e com conexões vasculares (IRITANI, SOARES e GOMES, 1986).

Em outro trabalho, foi realizada a estaquia de ramos provenientes da brotação após o corte raso das árvores, com bons resultados. Após 120 dias, as estacas apresentaram 96,6% de sobrevivência, com raízes de 3 mm em média, sendo que a aplicação do ácido indol-3-butírico (AIB) até 6000 mg L<sup>-1</sup> não apresentou efeito (BETTIO, WENDLING e DUTRA, 2008).

#### 2.3.1.2 Enxertia

Poucos trabalhos foram realizados com a enxertia de *A. angustifolia*, não tendo havido continuidade nas pesquisas. Alguns tipos de garfagem foram testados (GURGEL e GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975), mas existem dois problemas que impedem o êxito da enxertia. Os ramos ortotrópicos possuem diâmetro incompatível com os do porta-enxerto, e os ramos plagiotrópicos apresentam o diâmetro compatível, mas com crescimento lateralizado do enxerto, característica indesejável.

A precocidade reprodutiva após três anos da enxertia foi descrita em *Araucaria cunninghamii*. A produção de estróbilos provenientes de enxertos de ramos plagiotrópicos ocorreu antes dos enxertos provenientes de ramos ortotrópicos (NIKLES, 1961). Dessa forma, abrem-se questões importantes a serem pesquisadas, principalmente com relação ao tropismo dos ramos e à produção de pinhões antecipadamente.

### 2.3.2 Cultura de tecidos de *Araucaria angustifolia*

#### 2.3.2.1 Micropropagação

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores. A micropropagação pode ser realizada via gemas pré-existentes ou cultura de calos derivados de diferentes tecidos, visando à regeneração pela organogênese direta ou indireta (TEIXEIRA, 2001). Entre os problemas existentes na micropropagação de espécies lenhosas, está a perda parcial ou total da capacidade de regeneração conforme a idade (IRITANI, 1997), oxidação fenólica e contaminação (TEIXEIRA, 2001).

A micropropagação de *A. angustifolia* foi pesquisada por Zanette, Iritani e Paula (1986), Iritani, Zanette e Cislinski (1992 e 1993) e Anselmini e Zanette (2008a). Um protocolo eficiente para se micropropagar *A. angustifolia* em grande escala ainda não foi estabelecido, pois os mesmos problemas descritos na macropropagação são encontrados na micropropagação.

Com o objetivo de estabelecer um protocolo de multiplicação *in vitro* de genótipos superiores da espécie, Zanette, Iritani e Paula (1987) pesquisaram a capacidade morfogênica de segmentos caulinares de mudas de *A. angustifolia* com 50 a 60 dias de vida. Foram coletados segmentos de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm de comprimento do eixo principal na região basal, mediana, subapicais contendo as regiões meristemas. Testaram-se diferentes concentrações de mioinositol e glicina em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). O melhor resultado obtido ocorreu em segmentos basais, que formaram o maior número de brotos a partir de meristemas de folhas. O meio de cultura que melhor respondeu foi o MS/2 + glicina a 4 mg/L e 250 mg/L de mioinositol. Concluiu-se que segmentos de material juvenil do caule da

*A. angustifolia* têm alta capacidade de regeneração, não requerendo o fornecimento exógeno de reguladores vegetais, quando cultivados *in vitro*. Com esse experimento, ficou evidente que as regiões basais do caule apresentaram maior capacidade morfogênica de formação de brotos do que as regiões superiores do caule, provavelmente ocorreu influência positiva da citocinina na base do caule e maior distância do ápice (auxina).

Dando continuidade aos trabalhos com segmentos caulinares com plantas jovens de 2 a 3 meses de idade, foram realizados dois trabalhos (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992; IRITANI, 1997).

No primeiro, os segmentos caulinares foram cultivados em meio MS/2, sem reguladores vegetais. As células meristemáticas axilares ortotrópicas romperam o córtex e ocorreu desenvolvimento normal de ápices caulinares após 13<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia de cultivo *in vitro*. Porém, foi observado que existiu uma forte correlação de dominância (ramo ortotrópico), um broto se desenvolvendo mais e impedindo o crescimento dos outros. Possivelmente uma série de fatores como o teor endógeno de hormônios, estações do ano e fatores ambientais de cultivo exerceram influência nas respostas dos meristemas (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992).

No segundo trabalho, foram testados vários tratamentos a partir de ramos axilares. O maior número de brotos ocorreu sob a influência da zeatina em meio MCM "Medium for conifer morphogenesis" (BORNMAN, 1983). O alongamento de gemas apicais ocorreu melhor em MS/2, com contribuição significativa do carvão ativado. O enraizamento de gemas apicais (plagiotrópicos) de brotos dominados ocorreu em meio MS/2 com carvão ativado. O enraizamento dos brotos dominantes (ortotrópicos) ocorreu em meio MS contendo AIB. Porém os índices de enraizamento não foram satisfatórios, tendo ocorrido variações de 0% a 50%, mostrando uma dependência quase que total da capacidade de enraizamento conforme a capacidade individual da planta matriz (IRITANI, 1997).

#### 2.3.2.2 Microestaquia

Microestacas de *A. angustifolia* de brotos ortotrópicos de material jovem foram cultivadas em meio básico, acrescido de ácido indo-3-butírico (AIB), tendo apresentado uma porcentagem muito baixa de enraizamento (0-50%). Fatores como condições do cultivo, estações do ano, capacidade individual de enraizamento, procedência e idade dos indivíduos podem estar envolvidos no resultado do índice

de enraizamento. No material que enraizou foi observado a desdiferenciação de células parenquimáticas, formando células do câmbio isoladas que originam ninhos de traqueídes e células parenquimáticas calosas. No decorrer do desenvolvimento, foi possível verificar a conexão direta do sistema vascular da microestaca com o ninho de traqueídes muito próximo ao sistema vascular da raiz formada. As raízes formadas apresentaram-se morfológica e fisiologicamente funcionais, permitindo uma boa sobrevivência das microestacas (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1993).

### 2.3.2.3 Microenxertia

A microenxertia é utilizada quando a gema obtida de uma cultura de meristemas não regenera uma planta inteira e as partes aéreas regeneradas apresentam dificuldade para enraizar. Esta técnica é extremamente importante para espécies lenhosas, principalmente quando se deseja a manutenção das características adultas no propágulo vegetativo (PIERIK, 1987; TORRES, CALDAS e BUSO, 1999), como é caso da *A. angustifolia*. O primeiro trabalho de microenxertia da espécie foi publicado por Anselmini e Zanette (2008b), e teve como principal objetivo determinar a melhor técnica utilizada para automicroenxertia e microenxertia de ramos plagiotrópicos. Em plantas germinadas *in vitro*, com 2, 3, e 12 meses idade, foram testados dois locais de enxertia no porta-enxerto, epicótilo e hipocótilo, e dois tipos de enxertia, garfagem de topo com e sem fenda. O melhor resultado foi o de microenxertias realizada no epicótilo em mudas de 2 meses de idade com garfagem de topo sem fenda. A alta taxa de sucesso e o crescimento dos enxertos comprovou a capacidade organogênica dos tecidos, com o reestabelecimento da conexão cambial entre os tecidos, aclimatização das plantas, comprovando que a técnica é eficiente e factível. Esses excelentes resultados abriram boas expectativas para se trabalhar com a micropropagação de ramos com crescimento ortotrópico de plantas adultas.

### 2.3.2.4 Estudos sobre a embriogênese somática

A embriogênese somática em *A. angustifolia* foi estudada com a utilização e estabelecimento de embriões imaturos em culturas embriogênicas. Ocorreu a formação de massas suspensoras-embriônicas, dependente do estágio de

desenvolvimento do explante e da utilização de auxinas como 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e citocininas como BAP (6-benzilaminopurina) e cinetina (ASTARITA e GUERRA, 1998), em meio de cultura LP (VONARNOLD e ERIKSSON, 1981). Posteriormente, em meio LP suplementado com 1% de polietileno glicol (PEG) 8000, não ocorreu progressão dos pró-embriões somáticos para estádios subsequentes, independentemente dos tratamentos para maturação utilizados. Guerra et al. (2000), com a utilização de meio de cultivo suplementado com PEG 4000 (3, 6 e 9%) associado a maltose (3, 6 e 9%) e albumina, conseguiram formação de embriões somáticos no estágio de torpedo. No entanto, novamente a maturação dos embriões não foi obtida. Meios de cultura LP líquido suplementados com PEG 3350 (6 e 9%), maltose (6 e 9%), BAP e cinetina foram efetivos para o desenvolvimento de embriões somáticos nos estádios globular e torpedo a partir de culturas embriogênicas (SANTOS et al., 2002).

## 2.4 REFERÊNCIAS

ANSELMINI, J. I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia*, na região de Curitiba - PR.** 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Produção Vegetal) Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F.; BONA C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – Pr. **Floresta e Ambiente**, v.13, n.1, p.44-52, 2006.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.967-973, 2008a.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Development and Growth Curve of the Pine Cones of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, in the Region of Curitiba – PR. **Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal**, v.51, n.4, p.465-469, 2008b.

AQUINO, F. M. **Cultivo da *Araucaria angustifolia*, viabilidade econômico-financeira e alternativas de incentivo do Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul, agência de Florianópolis**, 53p. Santa Catarina gerência de planejamento, 2005, Relatório técnico.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, P. G. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* - induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.113-118, 1998.

BANDEL, G.; GURGEL, J. A. A. Proporção do sexo em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvicultura em São Paulo**, v. 6, p.209-220, 1967.

BETTIO, G. P.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia***. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 7p., 2008, Anais... Colombo: Embrapa Florestas, 2008. Resumo. 1 CD-ROM.

BORNMAN, C. Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.5-16, 1983.

BURLINGAME, L. L. The morphology of *Araucaria brasiliensis*. I. The staminate cone and male gametophyte. **Botanical Gazette**, v.55, p.97-112, 1913.

BURLINGAME, L. L. The morphology of *Araucaria brasiliensis*. II. The ovulate cone and female gametophyte. **Botanical Gazette**, v.57, p.490-507, 1914.

BURLINGAME, L. L. The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. The fertilization, the embryo, and the seed. **Botanical Gazette**, v.59, p.1- 40, 1915.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994, 640p.

CARVALHO, R. E. P.; MEDRADO, M. J. S.; HOEFLICH, V. A. **O cultivo do pinheiro do Paraná**. Embrapa Florestas. Sistema de Produção, 7, 2003. Disponível em: <[www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-Parana/CultivodoPinheirodoParana/index.htm](http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-Parana/CultivodoPinheirodoParana/index.htm)>. Acesso em: 11/12/2009.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy – Angiosperms**. Editora: Almqvist e Wiksell, 535p., 1952.

FLORIANI, S. G. Debulhando pinha, semeando o pinhão: Proposta de uso e conservação para a araucária. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, p.1803-1806, 2007.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.2, p.346-355, 2001.

FRANCO, S. M. A.; DILLENBURG, R. L. Ajustes morfológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea**, v.34, n.2, p.135-144, 2007.

GIFFORD, E. M.; FOSTER, A. S. **Morphology and evolution of vascular plants**. New York: W. H. Freeman and Company, 626 p., 1989.

GOLFARI, L. Coníferas aptas para reflorestamento nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Brasil Florestal: **Boletim Técnico**, Brasília, n.1, p.1-71, 1971.

GUERRA, P. G.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A. L. W.; ASTARITA, L. V.; NODARI, R. O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze. **Forestry Sciences**, v.6, p.458-479, 2000.

GURGEL, J. T. A.; GURGEL-FILHO, C. A. Métodos de enxertia para o pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze., visando à formação de pomares de sementes. **Silvicultura**, v.6, p.153-155, 1967.

HERTEL, R. J. G. **Interpretação morfológica da *Araucaria angustifolia***. Curitiba, 143f. Tese (Concurso para professor titular na área de Morfologia Vegetal) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1980.

HIGASHI, N. E.; SILVEIRA, A. R.; GONÇALVES, N. A. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução na Brasil. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, n.192, p.1-12, 2000.

HOPPE, J. M. **Relações entre os dados analíticos do solo, análise foliar e dados de incremento de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., na flora de Passo**

**Fundo.** 90f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1980.

HUECK, K. **As Florestas da América do Sul.** São Paulo. Editora Polígono, p.206-239, 1972.

IBGE, FUNDAÇÃO (IBGE) - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Geociências. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, **Manual Técnico da Vegetação Brasileira.** Rio de Janeiro, 92p., 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE (IBAMA). **Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção.** Disponível em: <[www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm](http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm)>. Acesso em: 27/10/2009.

IRITANI, C. **Ação de reguladores de crescimento na propagação vegetativa por estaquia de *Ilex paraguariensis* Saint Hilare e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** 163f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1981.

IRITANI, C.; SOARES, V. R.; GOMES, A. V. Aspectos morfológicos da ação de reguladores de crescimento em estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Acta Biologica Paranaense**, v.15, p.1-20, 1986.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biologica Paranaense**, v.21, n.1, 2, 3, 4, p.57-76, 1992.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. II. O enraizamento dos brotos axilares. **Acta Biologica Paranaense**, v.22, n.1, 2, 3, 4, p.1-13, 1993.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze.** 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA M. Propagação vegetativa por enxertia *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais.** n.12, p.95-102, 1975.

KAYUVÁ. Projeto: família sustentável, **Kayuvá.** Disponível em: <[www.pinhao.org.br/portal/](http://www.pinhao.org.br/portal/)>. Acesso em: 12/11/2009.

KOCH Z.; CORRÊA M. C. **Araucária: a floresta do Brasil Meridional.** Curitiba: Olhar Brasileiro, 148p., 2002.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária.** 233f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

- LAMB, R. A., *Araucaria brasiliana*. **Flora Brasiliensis**, v.9, n.34, p.425-426, 1864.
- LORENZE, H. **Árvores Brasileiras**: manual e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 351p., 2002.
- MAENE, L., DEBERGH, P. C. In: *Araucaria*. BONGA J. M.; DURZAN. **Cell and tissue culture in forest**, Martinus Nijhoff Publ, v.3, p.176-184, 1987.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. L. C.; REIS M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.787-796, 2004.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NIKLES, D. G. The development of a new method for grafting hoop an kauri pines. **Queensland forest service**, p.1-31, 1961.
- OLIVEIRA, J. M.; PILLAR, V. D.; ROIG, F. A. **Padrões de idade e crescimento de *A. angustifolia*: Reconstruindo históricos de distúrbio e dinâmica vegetacional**. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, n. 8, p.1-2, 2007, Caxambu. Anais. Caxambu, 2007.
- PIERIK, R. L. M. **In Vitro Culture of Higher Plants**. Springer: New York, 334p., 1987.
- RMA - REDE DE MATA ATÂNTICA NO BRASIL. Disponível em: <[www.unidades20005.rma.org.br/sosaraucarias/ucsaraucariasja.pdf](http://www.unidades20005.rma.org.br/sosaraucarias/ucsaraucariasja.pdf)>. Acesso em: 25/10/2005.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil**: Santa Catarina. Florianópolis: Editora Lunardelli, 320p., 1979.
- SANTOS, A. L.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in Parana pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, n.1, p.97-104, 2002.
- SHIMOYA, C. Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Ktze. **Experientiae**, v.2, n.2, p.519-540, 1962.
- SOLÓRZANO-FILHO, J. A. **Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kutze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP**. 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SOUSA-LANG, V. A.; PINTO, J. E. Efeito da concentração de ágar na germinação *in vitro* do pólen de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.34, p.55-63, 1997.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** 161f. Dissertação (Doutorado em Silvicultura), Universidade de Gottingen, Gottingen, 2000.

SOUZA, A. F.; SILVA, C. F.; LONGHI, S.J.; BRENA, D. A. Regeneration patterns of a long-lived dominant conifer and the effects of logging in southern South America. **Acta Oecologica**, v.4, p.221-232, 2008.

STEINER, N.; SILVEIRA, E. V.; GUERRA, M. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.89, p.55-62, 2007.

TEIXEIRA, B. J. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL. Goiás, 2001.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, Webesbourne, v.105, n.3, p.581-586, 1984.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, Embrapa, v.1, 509p., 1999.

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

WENDLING, I.; DELGADO, E. **Produção de Mudas de Araucária em Tubetes** Colombo: Embrapa, p.1-8, 2008. Comunicado Técnico.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; HOFFMANN, H. A.; BETTIO, G.; HANSEL, F. Indução de brotações epicórmicas para a propagação vegetativa de árvores de *A. angustifolia*. **Agronomia Costarricense**, v. 33, n. 2, p. 309-319, 2009.

ZANETTE, F.; IRITANI, C.; PAULA, S. R. Aspectos básicos da cultura *in vitro* de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.9, p.7-13, 1987.

ZANETTE, F. **Cruzamento a distância.** 2007a. Disponível em: <[www.agencia.fapesp.br/boletim\\_dentro.php?id=7172](http://www.agencia.fapesp.br/boletim_dentro.php?id=7172)>. Acesso em: 3/10/ 2007.

ZANETTE, F. **Araucária: melhor em pé do que deitada.** 2007b. Disponível em: <[www.jornalcomunicacao.ufpr.br/redacao3/node/79?from=60&comments\\_per\\_page=10](http://www.jornalcomunicacao.ufpr.br/redacao3/node/79?from=60&comments_per_page=10)>. Acesso em: 10/11/2009.

### 3 CAPÍTULO I

## ENXERTIA DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE NO INÍCIO DAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

### RESUMO

É fundamental incentivar o plantio da *Araucaria angustifolia*, pois a espécie desempenha um papel chave na conservação do ecossistema e integra a lista de espécies ameaçadas de extinção. Produzir mudas com características que incentivem o plantio é importante para a preservação da espécie. A enxertia pode propiciar a escolha de árvores fêmeas, precocidade reprodutiva e produção de pinhões com alta qualidade. O objetivo deste trabalho foi determinar a melhor época do ano para se fazer a enxertia. Foram utilizadas mudas de três anos de idade como porta-enxerto e ramos ortotrópicos jovens de plantas adultas para os enxertos. A técnica usada para a enxertia foi a placagem lenhosa. Este procedimento foi realizado no início de cada estação do ano, com duas repetições, totalizando 160 enxertos. Os enxertos realizados no início do outono tiveram em média 50% de sobrevivência. Nas demais estações, os resultados foram inferiores. Conclui-se que a enxertia por placagem é tecnicamente viável para a produção de mudas com o desenvolvimento normal das plantas de *A. angustifolia*. Novas pesquisas devem ser realizadas para produção em maior escala de mudas enxertadas.

**Palavras-chave:** Pinheiro do Paraná, propagação vegetativa, placagem

## GRAFTING OF *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE IN THE FOUR SEASONS OF THE YEAR

### ABSTRACT

It is fundamental to stimulate *Araucaria angustifolia* plantation because the species performs a key role in the conservation of the ecosystem and integrates the list of endangered species. Producing seedlings with characteristics that stimulate the plantation is important for the preservation of the species. The grafting provides the choice of female trees, precocity reproduction and the production of high quality pine seeds. The aim of this paper was to determine the best season of the year to graft. Three-year-old seedlings were used as rootstock and orthotropic branches of young plants were used for the grafting. The technique used for the grafting was the bark patch. This procedure was carried out in the beginning of each season of the year, with two repetitions, with the total of 160 graftings. The graftings carried out in the beginning of the fall had 50% of tissue union. During all the other seasons, there were not meaningful results. It can be concluded that the grafting through bark patching is viable for the production of the *A. angustifolia* seedlings. New researches should be carried out to produce grafted seedlings in large-scale.

**Key-words:** Parana-pine, vegetative propagation, bark patch

### 3.1 INTRODUÇÃO

A *A. angustifolia* propaga-se naturalmente por meio de suas sementes, que são produzidas após quinze a vinte anos de idade (BANDEL e GURGEL, 1967), e somente após esse período tem-se a certeza se a árvore é fêmea ou macho. A produção tardia de pinhão e a indeterminação do sexo levaram muitos pesquisadores a buscar formas de propagar a *A. angustifolia* assexuadamente (GURGEL e GURGEL-FILHO, 1967; GURGEL-FILHO, 1980; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975; ZANETTE, IRITANI e PAULA, 1987; ANSELMINI, 2008; ANSELMINI e ZANETTE, 2008). Além de eliminar esses dois problemas, a propagação vegetativa leva à clonagem de genótipos superiores (HARTMANN et al., 2002), formação de pomares clonais (ZANETTE, IRITANI e PAULA, 1987) e bancos clonais, visando à regeneração genética de material superior para a utilização em programas de melhoramento genético (KAGEYAMA e FERREIRA, 1975). A produção comercial em larga escala de pinus e eucaliptos enxertados já ocorre há muitas décadas no Brasil (BERTOLLOTTI et al., 1979; MORA et al., 1980; GOMES e PACHECO, 1994), o que não acontece com *A. angustifolia*.

A precocidade na produção de pinhão proveniente de árvores enxertadas ocorre a partir do primeiro ano para *Pinus pinea* e de três anos para *Araucaria cunninghamii* (NIKLES, 1961). O pinhão de *P. pinea* é utilizado na indústria alimentar em Portugal, apresentando boa rentabilidade, movendo a economia local. Cada árvore produz pinhas com peso médio de 300 a 350 g (CARNEIRO, 2007). A *A. angustifolia*, por sua vez, apresenta pinhas com 1500 g em média. Entretanto, o pinhão é um recurso pouco explorado no Brasil e ainda não recebeu a devida importância, apesar do seu alto valor nutritivo (GAMA, 2006).

Entretanto, a *A. angustifolia* é difícil de ser propagada por estaquia (IRITANI, 1981; IRITANI, SOARES e GOMES, 1986; DELGADO, WENDLING e BRONDANI, 2007; BETTIO, WENDLING e DUTRA, 2008), enxertia (GURGEL e GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) ou por micropropagação (ZANETTE, IRITANI e PAULA, 1987; IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1993; IRITANI, 1997; ANSELMINI e ZANETTE, 2008). Existem poucos trabalhos com a enxertia da *A. angustifolia*, este fato ocorre por se tratar de uma espécie endêmica e com ciclo de vida muito longo, cujas respostas das pesquisas levam anos para

serem concluídas. Além disso, existe uma barreira técnica que dificulta a enxertia. Os ramos da planta apresentam dimorfismo, que se caracteriza pela diferença no hábito de crescimento, formando ramos com crescimento ortotrópico e plagiotrópico.

Os ramos ortotrópicos crescem no ápice da árvore ou em brotações laterais do tronco, o que não é muito frequente. Na maioria das vezes, possuem diâmetro avantajado sendo incompatível com o porta-enxerto, dificultando a propagação (GURGEL e GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975). Os ramos plagiotrópicos apresentam crescimento horizontalizado e tempo de vida limitado (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992). Quando utilizados para a enxertia (GURGEL e GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) ou estaquia (IRITANI, 1981) não formam indivíduos normais, e sim indivíduos com crescimento plagiotrópico (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992).

Não se conhecem os mecanismos que levam o meristema apical do caule a formar gema axilar ortotrópica ou plagiotrópica. Sabe-se que esse fenômeno se caracteriza por uma diferenciação somática, que na maioria dos casos é permanente, podendo, por meio da multiplicação vegetativa, propagar as duas diferentes formas (GURGEL-FILHO, 1980). As mudanças ambientais, nutricionais e hormonais podem causar mudanças fisiológicas e morfológicas, temporárias ou permanentes (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992).

É de fundamental importância o desenvolvimento de mudas para incentivar o plantio da *A. angustifolia*, agregando novas perspectivas para o agricultor, como plantio de árvores selecionadas e com precocidade na produção de pinhões. É por estes motivos que esta pesquisa teve como principal objetivo definir um protocolo de enxertia, escolhendo a melhor estação do ano para a sua realização.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado ao ar livre, na unidade experimental do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. O experimento foi desenvolvido de 2006 a 2009. Em 2006, os porta-enxertos foram transplantados para o ambiente externo. No ano 2007 e 2008, durante o início da segunda semana de cada estação do ano, foi feita a enxertia.

Para a obtenção dos porta-enxertos, foram utilizadas plantas oriundas de sementes pré-selecionadas de *A. angustifolia*. Estas plantas permaneceram em saco plástico até os dois anos de idade, posteriormente foram transplantadas para vasos plásticos com o volume de dezesseis litros e enxertadas após o terceiro ano (Figura 1A). Foram utilizados 114 porta-enxertos e realizados 160 enxertos. Durante o primeiro ano cada planta recebeu um enxerto. No segundo ano, os porta-enxertos cujos enxertos não sobreviveram na primeira enxertia, receberam um segundo ou terceiro enxerto. A enxertia foi realizada durante dois anos, na entrada de cada estação do ano.

Os ramos usados para fazer os enxertos foram obtidos de oito árvores adultas: quatro fêmeas e quatro machos. Estes ramos se apresentavam jovens, verdes, tenros e com crescimento ortotrópico, resultado de brotações laterais ao longo da árvore (Figuras 1B e 1C). Cada ramo media aproximadamente vinte centímetros de comprimento, contando do ápice para a base (Figuras 1D e 1E). Todos os enxertos foram realizados com material coletado no dia da enxertia. Com auxílio de uma tesoura de ponta fina, foram retiradas as acículas dos ramos (Figuras 1F e 1G).

As placas para as enxertias foram cortadas com uma lâmina de bisturi e mediam aproximadamente 25 a 35 mm de comprimento e 8 mm de largura (Figuras 1H e 1I). Em seguida, a placa foi encaixada na janela aberta do porta-enxerto o mais rápido possível, evitando tocar nos tecidos de contato. Após o encaixe, o material vegetal foi amarrado com um arame e com uma fita plástica com aproximadamente 30 cm de comprimento, para evitar a penetração de água e o ressecamento (Figuras 1J, 1K e 1L).

A enxertia ocorreu na região subapical do ramo principal do porta-enxerto (Figura 1L), na região em que as acículas foram retiradas. Após 80 dias, foram avaliados os enxertos vivos e mortos, e a fita plástica foi retirada (Figuras 2A, 2B e 2C). Quando a placa estava verde e bem aderida (Figuras 2A e 2B), o arame foi retirado.

A partir de 120 dias foram avaliados os enxertos que continuavam vivos (Figuras 2D e 2E), neste período ocorreu a decapitação do broto terminal do porta-enxerto. As brotações do porta-enxerto que apareciam, foram retiradas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, foram utilizados quatro tratamentos, cada tratamento correspondendo a uma estação do ano. Cada tratamento possuiu quatro repetições, duas repetições a cada ano por estação, sendo que cada unidade experimental foi composta por dez plantas, totalizando cento e sessenta enxertos. Os dados coletados foram analisados pelo teste Qui-quadrado ao nível de 99% de probabilidade.



FIGURA 1 - *Araucaria angustifolia*; A- PORTA-ENXERTOS COM TRÊS ANOS DE IDADE; B, C, D E E- RAMOS ORTOTRÓPICOS DE ÁRVORES ADULTAS, UTILIZADOS PARA A ENXERTIA; F, G, H E I- RETIRADA DAS ACÍCULAS PARA A ENXERTIA; J- ENCAIXE DO ENXERTO COM O PORTA ENXERTO; K- FIXAÇÃO DA PLACA DE ENXERTIA; L- FIXAÇÃO DO FITILHO.



FIGURA 2- ENXERTIA DE *Araucaria angustifolia*; A E B- ENXERTOS SOBREVIVENTES REALIZADOS NO INÍCIO DO OUTONO, APÓS O TERCEIRO MÊS; C- ENXERTO NÃO SOBREVIVENTE, REALIZADO NA PRIMAVERA; D E E- ENXERTO REALIZADO NO OUTONO APÓS OITO MESES; F- BROTAÇÃO DO ENXERTO E DO PORTA ENXERTO, APÓS UM ANO E OITO MESES; G E H- ENXERTIA APÓS UM ANO E OITO MESES E DOIS ANOS, RESPECTIVAMENTE; I E J- ENXERTIA APÓS DOIS ANOS E OITO MESES, MATERIAL TRANSPLANTADO PARA O CAMPO, COM A SETA INDICANDO O LOCAL DA ENXERTIA.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Sobrevivência dos enxertos nas estações do ano

O teste de Qui-quadrado revelou existir associação entre a sobrevivência e as estações do ano. O índice de sobrevivência foi de 65% e 35% dos enxertos realizados no outono, 0% e 5% realizados no inverno, 0% e 20% na primavera e 0% no verão. O outono diferiu de todas as estações, com maior média de sobrevivência de todos os enxertos (Tabela 1 e 2).

O sucesso da sobrevivência e do crescimento do enxerto depende de vários fatores como: época do ano, fase de crescimento e idade da planta matriz, fase de crescimento e idade do porta-enxerto, ciclo de vida dos tecidos envolvidos, tipo de enxerto, local de cultivo, afinidade anatômica quanto ao tamanho e forma das células, consistência dos tecidos, exigência nutricional, porte e vigor da copa e do porta-enxerto, produção de compostos metabólicos secundários como resina ou substâncias fenólicas que dificultam a formação de calos e condição fitossanitária do enxerto e do porta-enxerto (FACHINELLO et al., 1995; HARTMANN et al., 2002).

Um fator determinante para o sucesso da enxertia nesse trabalho foi a técnica utilizada, a placagem lenhosa de ramos ortotrópicos. O método contorna o problema entre a diferença de diâmetro dos ramos ortotrópicos em relação ao porta-enxerto, buscando placas de tamanho compatível com o do porta-enxerto jovem, uma vez que os brotos ortotrópicos de plantas decapitadas e rebrotes no ápice de plantas adultas são sempre de diâmetro muito avantajado dificultando a enxertia (GURGEL e GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975; WENDLING et al., 2009). Além disso, os ramos ortotrópicos originam plantas com crescimento vertical, contornando o problema de enxertos com crescimento plagiotrópico, decorrentes de enxertos realizados com ramos laterais de menor diâmetro. Outra vantagem da placagem lenhosa que merece destaque é que com apenas 20 cm de ramo podem-se fazer mais de 10 enxertos.

TABELA 1- PORCENTAGEM DA SOBREVIVÊNCIA DOS ENXERTOS DE *Araucaria angustifolia* REALIZADOS NAS ESTAÇÕES DO ANO EM 2007.

Avaliação	Estação do ano				X <sup>2</sup>
	Outono	Inverno	Primavera	Verão	
80 dias	65	0	0	0	46,56**
120 dias	65	0	0	0	46,56**

\*\* significativo, ao nível de 1% de significância pelo teste X<sup>2</sup>

TABELA 2- PORCENTAGEM DA SOBREVIVÊNCIA DOS ENXERTOS DE *Araucaria angustifolia* REALIZADOS NAS ESTAÇÕES DO ANO EM 2008.

Avaliação	Estação do ano				X <sup>2</sup>
	Outono	Inverno	Primavera	Verão	
80 dias	40	5	20	0	14,23**
120 dias	35	5	20	0	11,74**

\*\* significativo, ao nível de 1% de significância pelo teste X<sup>2</sup>

Para que ocorra a soldadura do enxerto com o porta-enxerto, a planta precisa estar em fase de crescimento (FAUSTA, 1997). Entretanto, em *A. angustifolia* existe um crescimento ininterrupto dos ramos durante todo o ano, não ocorrendo um tempo de repouso no crescimento da árvore (SOLÓRZANO-FILHO, 2001). Assunção (2008) corroborou esta afirmação e acrescentou que existe um crescimento acelerado da planta de outubro a abril, mas no mês de abril, ocorre uma desaceleração no crescimento. Foi justamente nesta época, março e abril, em que a planta diminui o ritmo de crescimento que a enxertia apresentou o melhor índice de sobrevivência, 65% e 35% em 2007 e 2008, respectivamente (Tabela 1 e 2).

A entrada do outono e o final do verão são as épocas do ano mais indicadas para fazer enxertia de vinte três árvores frutíferas, em que a borbulhia é utilizada para a propagação. Nessa época, a planta possui nutrientes suficientes para proporcionar a formação de novos tecidos utilizados na soldadura, que é fundamental para o pegamento do enxerto (FAUSTA, 1997). Este resultado foi relatado com o mesmo tipo de enxerto utilizando a *A. cunninghamii* (NIKLES, 1961), em que o melhor índice de sobrevivência no outono.

Os resultados encontrados em *A. cunninghamii* fundamentam o encontrado nessa pesquisa, em que a melhor época do ano para se fazer enxertia em *A. angustifolia* é início do outono quando comparada com as outras épocas (Figuras 2A e 2B). É possível inferir que nesta época ocorreram mudanças metabólicas fundamentais que contribuíram para o sucesso da enxertia, fato este

não constatado em outras épocas. Não se pode afirmar quais são exatamente estes mecanismos, mas os hormônios vegetais, sem dúvida nenhuma, estão relacionados com a recuperação dos vasos condutores do enxerto, principalmente as auxinas e citocininas, além da disponibilidade de carboidratos no caule, são importantes para a formação do calo e desenvolvimento do novo broto (HARTMANN et al., 2002; TAIZ e ZEIGER, 2004).

A segunda estação do ano mais indicada para a enxertia, segundo Fausta (1997), é o início da primavera, época em que a planta se encontra em fase de maior crescimento, fator determinante para algumas espécies. Entretanto, o fato da *A. angustifolia* estar em fase de maior crescimento vegetativo, na primavera e no verão (ASSUNÇÃO, 2008), não proporcionou sobrevivência satisfatória do enxerto. Ocorrendo somente 0% e 20% de sobrevivência na primavera em 2007 e 2008, respectivamente, e no verão os enxertos não sobreviveram (Tabela 1 e 2).

Devido ao crescimento acelerado (ASSUNÇÃO, 2008), ao alto metabolismo da planta nesta época e, conseqüentemente, à alta produção de compostos metabólicos secundários como a resina, é provável que tenha ocorrido uma migração desta substância via floema no local do corte da enxertia (Figura 2C). Esta substância quando produzida pode acarretar a obstrução dos vasos, impedindo o fluxo de seiva e impossibilitando a boa cicatrização e formação do calo de enxertia.

Durante o inverno, o resultado de sobrevivência foi de apenas 0% e 5% em 2007 e 2008 (Tabela 1 e 2). Para outra espécie do mesmo gênero, a *A. cunninghamii*, durante o inverno, ocorreu uma diminuição da sobrevivência dos enxertos da ordem de 25%, quando comparado com enxertos realizados no outono (NIKLES, 1961). Mesmo numa espécie como *A. cunninghamii*, em que o índice de sobrevivência é de 91%, já se observa uma tendência de ocorrer diminuição de sobrevivência na época do inverno. O mesmo foi observado com *A. angustifolia* neste trabalho.

Os mecanismos que levam à incompatibilidade dos enxertos não estão completamente entendidos e muitos trabalhos recorrem às causas citológicas e bioquímicas como resposta (PINA e ERREA, 2005). A *A. angustifolia* não apresentou condições adequadas para uma boa sobrevivência da enxertia, o tecido vegetal do enxerto secou, o que demonstra não ter havido uma conexão de tecidos e formação de calo. Provavelmente no inverno, as condições endógenas, níveis hormonais e

disponibilidade de carboidratos não foram suficientes para o desenvolvimento dos novos tecidos e formação de calo.

### 3.3.2 Primeira avaliação

O período de retirada do fitilho e da exposição do enxerto varia muito entre os trabalhos estudados, alguns autores retiram o fitilho após 30 dias (MORA, BERTOLOTTI e HIGA, 1978), outros até um ano após o procedimento (CARNEIRO, 2007), dependendo das condições ambientais e da espécie trabalhada. Neste trabalho, oitenta dias foram suficientes para diferenciar os enxertos sobreviventes dos enxertos mortos onde não ocorreu a união dos tecidos, pois a placa de enxertia se encontrava totalmente seca. O tempo para a retirada do fitilho dos enxertos da *A. angustifolia* pode ser reduzido nas próximas pesquisas.

### 3.3.3 Desenvolvimento do enxerto

A retirada do ápice do porta-enxerto foi fundamental, pois somente após a quebra da dominância apical é que o desenvolvimento do enxerto ocorreu. Neste experimento, um porta-enxerto não foi decapitado. A placa da enxertia permaneceu verde sem nenhuma sinalização de brotação e posteriormente ocorreu a morte deste enxerto. Este fato mostra uma forte influência do ápice do porta-enxerto sobre os polos meristemáticos da placa de enxertia, impedindo seu desenvolvimento.

Em todos os experimentos feitos, independentemente da época do ano, ocorreu perda de apenas 0% dos enxertos após três meses e 4% após 120 dias (Tabela 1 e 2). Esse resultado sugere que após a união dos tecidos do enxerto com porta-enxerto a possibilidade de ocorrer a brotação é de aproximadamente 96%. Foi relatado que nos primeiros anos a incompatibilidade é rara em enxertos realizados com *A. cunninghamii* (NIKLES, 1961). Em outro trabalho em que várias técnicas de enxertia foram testadas com *A. angustifolia*, em condições de estufa, após a primeira avaliação de sobrevivência aos 45 dias, 100% dos enxertos sobreviventes continuavam vivos aos 210 dias (KAGEYAMA e FERREIRA, 1975), afirmando estes resultados adquiridos nesta pesquisa.

Entretanto a brotação da enxertia não ocorreu de forma homogênea, mas aos 180 dias já havia ocorrido em todas as brotações. Durante o processo de

brotação do enxerto, foi possível observar que, na região superior da acícula, ocorreu um inchaço e posteriormente emergiu um broto, com desenvolvimento de um novo broto, por placa de enxertia (Figuras 2D e 2E). É provável que a forte dominância apical do novo broto tenha inibido o desenvolvimento das células dos polos meristemáticos encontrados abaixo, pois somente um novo broto se desenvolveu por placa. Porém, o novo broto não exerceu influência suficiente sobre o desenvolvimento de novos brotos do porta-enxerto, que se desenvolveram (Figura 2F). Um conjunto de fatores estão envolvidos nesta resposta, como quantidades de hormônios e condições ambientais. Possivelmente a quantidade de auxina produzida pela brotação do novo enxerto não foi suficiente ou não foi transportada adequadamente para o porta-enxerto, não exercendo a dominância apical sobre eles.

A brotação do enxerto teve origem no polo de células meristemáticas, localizadas na axila de cada acícula (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992), a qual não se caracteriza morfológicamente como uma gema. As células meristemáticas encontradas nas axilas das folhas foram descritas por meio de estudos anatômicos em várias espécies da família araucariaceae como *A. biidwillii*, *A. klinkii*, *A. columnaris*, *A. palmerstonii* e *A. cunninghamii* (NIKLES, 1961). Mesmo não apresentando morfológicamente uma gema completa, a *A. angustifolia* possui células com a competência morfogênica de uma gema na axila de cada folha, que foram ativadas no processo da enxertia e deram origem à copa das árvores neste trabalho (Figuras 2G, 2H e 2I) e com excelente cicatrização (Figura 2J).

As células dos polos meristemáticos ou “gemas” dormentes endógenas são os únicos meristemas capazes de produzir ramos ortotrópicos, quando libertados da dominância apical (HERTEL, 1980; IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992). O crescimento da nova brotação foi verticalizado, e a escolha do ramo com crescimento ortotrópico foi fundamental para este resultado. Alguns trabalhos realizados (GURGEL-FILHO, 1980; NIKLES, 1961; KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) afirmam que, como ocorreu nesta pesquisa, o hábito de crescimento da nova parte aérea da planta é o mesmo do propágulo que lhe deu origem.

Para o bom desenvolvimento e crescimento do enxerto, foi fundamental a retirada das brotações do porta-enxerto, que apresentaram maior vigor do que as do enxerto. O procedimento é importante para recuperar o equilíbrio da planta enxertada (CARNEIRO, 2007). A retirada dos rebrotos do porta-enxerto devem

ocorrer várias vezes, pois são persistentes. A aplicação de auxina após a decapitação do porta-enxerto foi recomendada para a *Araucaria cunninghamii*, evitando o rebrote e induzindo a manutenção da dormência do porta-enxerto (HOUSE et al.,1998). Este procedimento poderá ser incorporado em futuros trabalhos de enxertia com *A. angustifolia*.

Ocorreu uma variação no crescimento dos enxertos, alguns enxertos mediram 0,7 m, 0,8 m até 1,20 m, com dois anos e oito meses de idade, em condições de vaso. Foi constatada a existência de uma grande variabilidade genética representada pelo início da brotação e pelo crescimento do enxerto. Esta observação já foi registrada por outros autores (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992; BETTIO, WEDLING e DUTRA, 2008). Em outras espécies do gênero, como *A. cunninghamii*, foi observado um crescimento de 1,80 m, enquanto em *A. robusta*, de 0,6 m em 2 anos. O crescimento *A. angustifolia* está dentro do esperado quando se compara com o crescimento do enxerto de outras espécies dentro do mesmo gênero.

#### 3.3.4 Precocidade reprodutiva

São esperados para os próximos anos o desenvolvimento dos ginostróbilos e androstróbilos. As plantas após três anos da enxertia apresentam uma parte aérea com um excelente crescimento vegetativo, chegando algumas plantas a mais de 4m de altura quando transplantadas para o campo. Esta expectativa tem base em outros trabalhos com enxertos, como a produção de ginostróbilo e androstróbilo em *A. cunninghamii* em 5 e 4 anos (NIKLES, 1961) e de *Pinus pinea* em 1 ano e 5 anos, respectivamente (CARNEIRO, 2007).

#### 3.3.5 Recuperação do porta-enxerto

Durante o trabalho foi possível observar que as plantas em que os enxertos não sobreviveram, recuperavam-se muito bem e puderam ser reaproveitados. A excelente recuperação dos porta-enxertos ocorreu devido ao tipo de enxerto utilizado, a placagem lenhosa. O corte usado no porta-enxerto para

receber a placa abriu apenas um pequeno ferimento na planta e o ápice permaneceu intocável, o que ajudou na recuperação do ferimento, pois existiu um fluxo contínuo de seiva até o ápice. Desta forma, as plantas que estavam em um bom estado recebiam um segundo ou terceiro enxerto. Carneiro (2007) concorda que no caso de insucesso da primeira enxertia é possível enxertar no mesmo porta-enxerto novamente e recomendou refazer o enxerto após um ano, com enxertos de garfagem de topo em *Pinus pinea*. Em *A. angustifolia*, foi possível enxertar após seis meses, podendo até mesmo diminuir este prazo, pois ao contrário do trabalho realizado por Carneiro, foi utilizada a placagem, em qual ocorre recuperação precoce do porta-enxerto.

### 3.4 CONCLUSÕES

A enxertia de *A. angustifolia* do tipo placagem lenhosa de ramos ortotrópicos é viável. O método contorna o problema entre a diferença de diâmetro dos ramos ortotrópicos em relação ao porta-enxerto, buscando placas de tamanho compatível com o do porta-enxerto jovem.

O problema do crescimento plagiotrópico dos ramos enxertados foi contornado a partir da técnica descrita neste trabalho, o que viabiliza a produção de árvores enxertadas. A melhor época do ano para fazer enxertia é o início do outono.

A brotação e o crescimento dos enxertos não ocorreram de forma homogênea. Os enxertos originaram-se na mesma localização, na região mais apical da placa de enxertia, acima da última acícula. É possível fazer um segundo enxerto no porta-enxerto, quando o primeiro não sobrevive.

### 3.5 REFERÊNCIAS

ANSELMINI, J. I. **Microenxertia e polinização controlada em *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE.** 86f. Tese (Doutorado em Agronomia-Produção Vegetal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2008.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v.38, p.967-973, n.4, 2008.

ASSUNÇÃO, A. **Plastocromo e filocromo aparente anual em *Araucaria angustifolia* Bert.) O. Ktze, no município de Colombo – PR.** Curitiba. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2008.

BANDEL, G.; GURGEL, J. A. Proporção do sexo em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvicultura em São Paulo**, v.6, p.209-220, 1967.

BERTOLLOTI, G.; MORA L. A.; GONÇALVES, N. A.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa em *Eucalyptus* e *Pinus*. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, IPEF**, n.54, p.1-9, 1979.

BETTIO, G. P.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia*. In: **Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas**, 7p., 2008, Colombo. Anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. Resumo. 1 CD-ROM.

CARNEIRO, A. N. **Manual ilustrado - Enxertia em pinheiro manso.** Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pesca. Portugal, 41p., 2007.

DELGADO, M. E.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. Indução de brotações basais e estaquia de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: **Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas**, 6p., 2007. Colombo: Anais. Embrapa Florestas, 2007. Resumo. 1CD-ROM.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de frutíferas de clima temperado.** Pelotas, Gráfica Universitária da UFPEL, 175p., 1995.

FAUSTA, M. F. **Los injertos.** Editorial de Vecchi, Barcelona, 126p., 1997.

GAMA, T. M. T. B. **Estudo comparativo dos aspectos físico-químicos do pinhão nativo e do pinhão proveniente de processos de polinização controlada de *Araucaria angustifolia* e da influência do tratamento térmico.** 89f. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2006.

GOMES, S. F.; PACHECO, M. R. Clonagem de eucalipto na Jari. **Anais: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, IPEF**, p.67-69, 1994.

GURGEL, J. T. A.; GURGEL-FILHO, C. A. Métodos de enxertia para o pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze., visando à formação de pomares de sementes. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v.6, p.153-155, 1967.

GURGEL-FILHO, C. A. Silvicultura da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze. In: Problemas florestais do gênero araucária, 1980, 29-69p. **Encontro da IUFRO, realizado em Curitiba, Paraná**, 366p., 1980.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES J. F.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. Principles and practices. 6 ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 647p., 2002.

HERTEL, R. J. G. **Interpretação morfológica da *Araucaria angustifolia***. Curitiba, 1980. 143f. Tese (Concurso para professor titular na área de Morfologia Vegetal) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1980.

HOUSE, S.; DIETERS, M.; JOHNSON, M.; HAINES, R.; Inhibition of orthotropic replacement shoots with auxin treatment on decapitated hoop pine, *Araucaria cunninghamii*, for seed orchard management. **New Forests**, v.16, p.221-230, 1998.

IRITANI, C. **Ação de reguladores de crescimento na propagação vegetativa por estaquia de *Ilex paraguariensis* Saint Hilare e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Curitiba, 163f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 1981.

IRITANI, C.; SOARES, V. R.; GOMES, A. V. Aspectos morfológicos da ação de reguladores de crescimento em estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Acta Biologica Paranaense**, v.15, p.1-20, 1986.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biologica Paranaense**, v.21, n.1, 2, 3, 4, p.57-76, 1992.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. II. O enraizamento dos brotos axilares. **Acta Biologica Paranaense**, v.22, n.1, 2, 3, 4, p.1-13, 1993.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze**. Curitiba. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 1997.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, n.12, p.95-102, 1975.

MORA, A. L.; BERTOLOTI, G.; HIGA, R. A. Propagação vegetativa de pinus por enxertia. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, n.42, p.1-10, 1978.

MORA, A. L.; BERTOLOTI, G.; PINTO E. J.; KAGEYAMA, P. Y. Enxertia em *Pinus kesiya*. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, IPEF**, n.21, p.1-16, 1980.

NIKLES, D. G. The development of a new method for grafting hoop on kauri pines. **Queensland forest service**, p.1-31, 1961.

PINA, A.; ERREA, P. A review of new advances in mechanism of compatibility incompatibility. **Scientia Horticulturae**, v.106, n.1, p.1-11, 2005.

SOLÓRZANO-FILHO, J. A. **Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kutze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP.** 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, 2001.

TAIZ L.; ZEIGER E. Auxinas. In: **Fisiologia vegetal**. 3ª edição, Editora Artmed: Porto Alegre, 719p., 2004.

WENDLING I.; DUTRA L. F.; HOFFMANN H. A.; BETTIO G.; HANSEL F.; Indução de brotações epicórmicas para a propagação vegetativa de árvores de *A. angustifolia*. **Agronomia Costarricense**, v.33, n.2, p.309-319, 2009.

ZANETTE, F.; IRITANI C.; PAULA S. R. Aspectos básicos da cultura *in vitro* de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.9, p.7-13, 1987.

## 4 CAPÍTULO II

### MICROENXERTIA DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE

#### RESUMO

A *Araucaria angustifolia* é uma espécie ameaçada de extinção devido à extração predatória feita pelo homem especialmente entre os anos de 1950 a 1980. Atualmente existem pequenos fragmentos da Floresta Atlântica, local onde a espécie está inserida, sendo fundamental para o equilíbrio deste ecossistema. A principal proposta das pesquisas realizadas com a *A. angustifolia* é torná-la mais atrativa para o plantio, por meio de trabalhos de melhoramento genético e clonagem de genótipos superiores. Esta pesquisa teve como principal objetivo a propagação clonal da espécie, utilizando a microenxertia de ápice caulinar e do segmento do caule. Os microporta-enxertos foram preparados a partir de sementes germinadas *in vitro*. O material vegetal utilizado nas microenxertias foi retirado de ramos ortotrópicos jovens de indivíduos adultos pré-selecionados. A microenxertia foi realizada na região do epicótilo em microporta-enxertos de dois meses de idade. Os microenxertos feitos com o ápice caulinar apresentaram um bom resultado de sobrevivência, 54%, mas não ocorreu o crescimento dos propágulos. Os microenxertos feitos com o segmentos do caule oxidaram e não sobreviveram. Entretanto, estes resultados são de fundamental importância, pois abrem novos caminhos para futuros trabalhos de microenxertia da *A. angustifolia*.

**Palavras-chave:** Pinheiro-do-paraná, biotecnologia, micropropagação, cultura de tecidos.

## MICROGRAFTING OF *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE

### ABSTRACT

The *Araucaria angustifolia* is an endangered species due to the predatory extraction performed by humans in the recent decades. Currently, there are small Atlantic Forest fragments where the species is inserted which is fundamental to the balance of this ecosystem. The main proposition of the researches carried out with the *Araucaria angustifolia* is to make it more attractive for the plantation through genetic improvement work and the superior genotype cloning. This research had as its main goal the cloning propagation of the species, using the micrografting of the caulinar apex and of the bud stem segment. The micro-rootstocks were prepared from seeds germinated *in-vitro*. The vegetable material used in the micrografting was withdrawn from young orthotropic branches of pre-selected adult individuals. The micrografting was held in the epicotyl region, in two-month-old micro-rootstocks through the top grafting and horizontal cut bud technique. The micrografting hold with the caulinar apex had a good tissue union result with 54% but there was no growth of propagules. The micrografting hold with the bud stem segment oxidized and did not survive. However, these results are of fundamental importance because they prove the species cloning capacity through adult material and open new ways to future micrografting works.

**Key-words:** Parana-pine, biotechnology, micropropagation, tissue culture

## 4.1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* está ameaçada de extinção (IBAMA, 2009) e apresenta um papel chave na conservação do seu ecossistema (SOLÓRZANO-FILHO, 2001). É uma espécie pioneira que, ao crescer em áreas abertas, cria condições de sombreamento, permitindo que outras espécies umbrófilas típicas de seu ecossistema sejam recrutadas (FRANCO e DILLENBURG, 2007; SOUZA et al., 2008). Além disso, produz o pinhão, alimento muito importante para os animais no interior da floresta (KOCH e CORRÊA, 2002; RODRIGUES et al., 1981), que está disponível durante o inverno e possui alto valor nutritivo (GAMA, 2006).

A utilização da técnica *in vitro* na produção vegetal teve início com pesquisas de germinação de sementes no começo do século XX. Atualmente diversas técnicas são utilizadas como a embriogênese somática, técnicas de transformação genética, limpeza clonal de cultivares pela cultura do ápice caulinar e propagação de genótipos superiores (TORRES, CALDAS e BUSO, 1999). Além disso, existe a vantagem que a propagação clonal *in vitro* tem sobre as outras técnicas, que é o aumento de produção em menor tempo.

Em *A. angustifolia* algumas técnicas de micropropagação vêm sendo estudadas para produzir pinhão precocemente e fixar fenótipos desejados, pela clonagem de material adulto. Entre as pesquisas realizadas de *A. angustifolia* destacam-se: desenvolvimento de brotos ortotrópicos a partir de segmentos do caule de mudas estioladas (HANDRO e FERRENRA, 1980; PENCHEL, 1986); estudos da capacidade morfogênica de meristemas axilares (ZANETTE, IRITANI e PAULA, 1987); enraizamento de microestacas (IRITANI, ZANETTE, CISLINSKI, 1993; IRITANI, 1997); indução da embriogênese somática através de embriões imaturos (ASTARITA e GUERRA, 1998; GUERRA et al., 2000; ASTARITA, HANDRO e FLOH, 2003; STEINER et al., 2005; STEINER, SILVEIRA e GUERRA, 2007) e mais recentemente a automicroenxertia por meio de plântulas germinadas *in vitro* (ANSELMINI, 2008; ANSELMINI e ZANETTE, 2008).

Apesar das pesquisas desenvolvidas, a *A. angustifolia* não possui um protocolo eficiente para a propagação clonal *in vitro*. Existem alguns problemas que ainda não foram contornados na micropropagação, como o baixo índice de enraizamento de microestacas (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1993), plagiotropismo dos ramos microenxertados (ANSELMINI, 2008; ANSELMINI e ZANETTE, 2008) e diferença no diâmetro dos ramos ortotrópicos para serem microenxertados em porta-enxertos provenientes de embriões germinados *in vitro*.

Em geral, as espécies arbóreas e algumas frutíferas apresentam grande dificuldade na regeneração de uma nova planta a partir de ápices caulinares e dificuldade no enraizamento dos explantes. Portanto, desenvolveu-se o método da microenxertia para contornar esse problema. Desta forma, torna-se possível a produção de matrizes de fruteiras com alta qualidade fitossanitária e com características das plantas adultas, não revertendo o propágulo ao estado juvenil (PAZ e PASQUAL, 1998). A técnica da microenxertia tem sido aplicada em citros (CARVALHO, SANTOS e MACHADO, 2002), manga (ZACCARO, DONADIO e LEMOS, 2006), maçã (NUNES et al., 2005) e maracujá (RIBEIRO, VIEIRA e SIMÕES, 2008).

Segundo Anselmini e Zanette (2008), apesar das dificuldades encontradas na propagação *in vitro*, a alta sobrevivência de microenxertos provenientes de material juvenil comprovou que a técnica é viável, pois houve formação do calo, regeneração dos tecidos formando novas conexões cambiais e crescimento do propágulo microenxertado.

As soluções dos problemas na produção clonal de *A. angustifolia* requerem avanços e continuidade nos estudos. Produzir árvores com baixa estatura, ampliar a safra e a produção de pinhão são características que motivam as pesquisas. Este trabalho vem complementar os estudos de microenxertia realizados pela equipe da UFPR. O objetivo desta pesquisa foi identificar a melhor região dos ramos ortotrópicos, ápice caulinar ou segmento do caule, para a microenxertia de material vegetal adulto, visando estabelecer um protocolo de microenxertia para a formação de bancos clonais de matrizes selecionadas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, durante o ano de 2008 e 2009.

Foram coletadas sementes de matrizes pré-selecionadas de plantas com mais de 20 anos, localizadas no Setor Ciências Agrárias. As sementes foram coletadas em agosto e acondicionadas em ambiente refrigerado. Os embriões foram isolados em setembro e outubro. O tratamento de desinfestação das sementes e isolamento dos embriões foi realizado conforme Anselmini e Zanette (2008), seguindo o procedimento: retirada do tegumento com o auxílio de um bisturi, imersão em álcool 70% por dez minutos, hipoclorito de sódio a 6% por 30 minutos e após esse processo as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar. As sementes foram lavadas com água estéril, e seu embrião foi retirado com auxílio de um pinça e um bisturi (Figuras 3A e 3B). Na sequência, os embriões foram isolados em meio de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) acrescido de 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 6 gL<sup>-1</sup> ágar Vetec® e 1 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado (Figura 3C). Os tubos ensaio contendo os embriões foram transferidos para a sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C e 16 horas de fotoperíodo, com luz fornecida por lâmpadas fluorescentes e radiação de 24,0 ± 2 μmolm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 3D). Após duas semanas, os tubos contaminados por bactéria e fungos foram retirados.

Quando os microporta-enxertos atingiram dois meses de idade (Figura 3D e 3E), no mês de dezembro, foram feitas as microenxertias. Os explantes usados para a microenxertia foram provenientes dos ramos ortotrópicos de árvores adultas, medindo aproximadamente 20 cm de altura (Figuras 3F e 3G), e todos os microenxertos foram feitos com material coletado no mesmo dia. As acículas dos ramos do enxerto foram retiradas (Figura 3H) e a assepsia foi realizada pela imersão

durante cinco minutos no álcool 70% e 15 minutos hipoclorito de sódio 6 %. Esses ramos foram levados para a câmara de fluxo laminar e lavados em água estéril.

Duas regiões distintas dos ramos foram usadas: ápice caulinar do ramo com 3 a 4 mm de comprimento (Figura 3I) e um segmento do caule na região acima da acícula 9 mm<sup>2</sup> (Figuras 3J e 3K). Esta região foi escolhida por meio de observações realizadas no experimento anterior (Capítulo II), local de onde os brotos da enxertia emergiram, firmando observações feitas em outro experimento com *Araucareaceae* (NIKLES, 1961).

Quando os embriões atingiram dois meses de idade, foram feitas as microenxertias. Primeiramente foi feita a limpeza do porta-enxerto, retirada parcial de raízes secundárias para facilitar a inoculação em novo meio de cultura e retirada da parte aérea na região acima dos cotilédones por meio de um corte horizontal. Durante a microenxertia, uma atenção especial foi dada para se fazer o contato dos tecidos e manter a polaridade das células do enxerto. O corte usado na base do microporta-enxerto e do enxerto foi na posição horizontal, segundo recomendações de Anselmini e Zanette (2008), pois amplia a superfície de contato dos tecidos.

No segmento apical do ramo, algumas acículas que cobriam a região meristemática, foram retiradas com auxílio de uma pinça de ponta fina. Quando o ápice do ramo estava medindo aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento e restavam apenas alguns pares de folhas cobrindo a região meristemática, este material foi enxertado no microporta-enxerto (Figura 3L). Os enxertos do segmento caulinar foram cortados em aproximadamente 9 mm<sup>2</sup> e submetidos ao mesmo procedimento de assepsia e da retirada da acícula (Figura 3M).

O enxerto foi equilibrado sobre o porta-enxerto com auxílio do bisturi e de uma pinça de ponta fina (Figuras 3L e 3M). Desta forma, efetuaram-se as microenxertias do tipo ápice caulinar e segmento do caule, sem fenda na região do epicótilo.

Os tubos de ensaio contendo as plântulas enxertadas foram transferidos para a sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente. Após duas semanas, os tubos contaminados foram retirados e após um mês ocorreu a avaliação do experimento. Os tecidos vegetais enxertados que continuaram verdes foram considerados como sobreviventes, os enxertos de coloração marrom, não sobreviventes. As avaliações foram realizadas após um, quatro e oito meses da microenxertia.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, foram utilizados dois tratamentos, cada tratamento correspondeu a um tipo de material enxertado: enxerto de ápice de ramo ortotrópico e enxerto de segmento de caule de ramo ortotrópico. Cada tratamento possui três repetições, cada repetição foi composta por onze plantas, totalizando sessentas e seis microenxertias. Os dados coletados foram analisados pelo teste Qui-quadrado ao nível de 99% de probabilidade.



FIGURA 3- *Araucaria angustifolia* A- PINHÃO SEM O TEGUMENTO; B- EMBRIÃO; C- EMBRIÃO ISOLADO EM MEIO DE CULTURA; D- EMBRIÕES GERMINADOS *IN VITRO*; E- MICROPORTA-ENXERTO; F E G- ASPECTO GERAL DE RAMOS ORTOTRÓPICOS UTILIZADOS COMO MICROENXERTOS; H- ÁPICE CAULINAR APÓS A RETIRADA DE ALGUMAS ACÍCULAS; I- ÁPICE CAULINAR SECCIONADO UTILIZADO NA

MICROENXERTIA; J E K- SEGMENTO CAULINAR UTILIZADA NA MICROENXERTIA; L- MICROENXERTIA DE ÁPICE CAULINAR; M- MICROENXERTIA DO SEGMENTO DO CAULE.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste do Qui-quadrado revelou que existe associação entre os tratamentos (Tabela 3). As microenxertias com ápice caulinar de ramo ortotrópico tiveram 54% de sobrevivência no primeiro mês, 48% no quarto mês e 45% no oitavo mês, contra 0% das enxertias realizadas com segmento de caule.

TABELA 3- PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE MICROENXERTOS REALIZADOS COM *Araucaria angustifolia* PELO MÉTODO DE MICROENXERTO DE ÁPICE CAULINAR E SEGMENTO DO CAULE

	Tipo de enxertia		X <sup>2</sup>
	Ápice caulinar	Segmento do caule	
30 dias	54	0	24,74**
120 dias	48	0	21,12**
240 dias	45	0	19,4**

\*\* = significativo, ao nível de 1% de significância pelo teste X<sup>2</sup>

#### 4.3.1 Microenxertia de ápice caulinar

O índice de sobrevivência foi satisfatório para os microenxertos com o ápice caulinar, tendo ocorrido formação do calo, significando soldadura dos tecidos entre o enxerto e o microporta-enxerto.

O calo é formado por células do parênquima que preenchem os espaços entre ambas as partes, tornando contínua a conexão do enxerto com o porta-enxerto (ESAU, 1974). Um estudo histológico sobre a microenxertia revelou que nas primeiras horas após o procedimento já existe evidência de divisão celular a partir de células parenquimatosas (ESTRADA, LOPES e CARDENAS, 2002).

A enxertia está ligada diretamente com a multiplicação de células para a formação de calo, desdiferenciação de células do parênquima em traqueídes e células crivadas para a formação dos vasos (GLORIA e GUERREIRO, 2003),

competência morfogênica para a formação de gemas e finalmente o desenvolvimento de uma nova parte aérea a partir de um ápice caulinar microenxertado. Esses processos são regulados por múltiplos fatores extremamente complexos, como, por exemplo, o balanço hormonal de auxina e citocinina e a disponibilidade de carboidratos (HARTMANN et al., 2002; TAIZ e ZEIGER, 2004).

O processo de sobrevivência teve início nos microenxertos realizados com o ápice de *A. angustifolia*, porém estes, não cresceram e permaneceram com 3 a 4 mm, mesmo após oito meses. Uma parte do processo de enxertia descrita acima não foi efetivada e, conseqüentemente, o desenvolvimento do enxerto não teve continuidade.

Este resultado a princípio contraria os resultados descritos por Anselmini (2008), que trabalhou com automicroenxertia de ápice caulinar e ápice de ramos plagiotrópicos de plântulas germinadas *in vitro* de *A. angustifolia*. A autora descreve que após 30 dias do enxerto a proliferação de células meristemáticas foi constatada, aos 90 dias foi observada a reconstituição dos vasos, posteriormente, as plantas cresceram e foram aclimatizadas.

Embora ambos os trabalhos tenham sido realizados com a mesma espécie, o explante utilizado por Anselmini (2008) foi um material proveniente de plântula, por outro lado, o material usado nesta pesquisa foi extraído de brotações de planta adulta. Diante deste contexto, pode-se aferir que existem diferenças significativas entre os dois estádios de desenvolvimento das plantas, principalmente nas características fisiológicas, bioquímicas e anatômicas (WENDLING e XAVIER, 2001). O explante jovem proveniente de sementes apresenta maior capacidade morfogênica dos tecidos (TEIXEIRA, 2001), quando se compara com material adulto proveniente de brotações de planta adulta. Fato que foi confirmado por Deogratias, Lutz e Dosba (1986), que realizaram ensaios de microenxertia *in vitro* de *Prunus avium*, utilizando ápices meristemáticos em estágio jovem e adulto, e obtiveram 50 % de sobrevivência com os ápices em estágio juvenil, mas somente de 15 a 20 % de sucesso com meristemas em estágio adulto.

Além disso, sabe-se que o ramo ortotrópico da *A. angustifolia* apresenta forte dominância apical sobre os demais ramos, sendo que a dominância apical é impulsionada por fatores como a alta concentração de auxina no ápice caulinar (TAIZ e ZEIGER, 2004). O comportamento da planta *in vivo* parece estar relacionado com o comportamento dos explantes *in vitro*. Plantas com dominância apical

pronunciada apresentam uma capacidade menor de proliferação celular do ápice caulinar do que plantas que apresentam baixa e média dominância apical (DEBIASI et al., 2002).

É provável que pela alta concentração de auxina não tenha ocorrido a formação dos vasos devidamente e na nutrição dos tecidos tenha ocorrido difusão e osmose, fato compatível com o tamanho do explante. Possivelmente a premissa básica não foi alcançada para a formação adequada dos vasos, que é a desdiferenciação celular, o que depende do balanço hormonal de auxina e citocinina entre outras condições metabólicas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Pode-se inferir que o ápice caulinar do ramo ortotrópico de material proveniente de rebrota tem uma concentração maior de auxina (dominância apical) e menor de citocinina quando comparado com o ápice caulinar de uma plântula desenvolvida *in vitro* (ANSELMINI, 2008), justificando parcialmente a diferença nos resultados.

Somando-se a estas observações, Zanette, Iritani e Paula (1987) concluíram que a capacidade morfogênica é menor nas regiões apicais do que nas regiões basais de plantas jovens de *A. angustifolia*. Essa diferença no comportamento foi possivelmente proveniente da maior concentração de auxina nas regiões apicais e maior concentração de citocininas nas regiões mais basais do caule. Estes dados corroboram as afirmações observadas nesta pesquisa.

Quando os reguladores vegetais são aplicados no ponto da microenxertia, aumenta-se o potencial regenerativo dos tecidos em algumas espécies, especialmente no tecido do câmbio, pelo alongamento e formação de novas camadas celulares, assegurando o estabelecimento e continuidade da vascularização entre o porta-enxerto e a copa (JEFFREE e YEOMAN, 1983). O tratamento com BAP (6-benzilaminopurina) aumentou a viabilidade de microenxertos de ápice de 40% para 90% em citros (STARRANTINO e CARUSO, 1988). O uso de reguladores vegetais é uma alternativa viável que deve ser considerada em futuros trabalhos de microenxertia de ápice caulinar de *A. angustifolia*.

#### 4.3.2 Microenxertia do segmento do caule

A região selecionada do caule, para coletar material vegetal da microenxertia, foi a região superior da emergência da acícula. Esta região foi escolhida após as observações realizadas durante a enxertia do tipo placagem de lenho da *A. angustifolia*, local onde ocorreu o rebrote do enxerto, dando origem à formação da parte aérea da nova planta (Capítulo II). Essa informação somou-se aos resultados de pesquisas que revelaram a existência de polos meristemáticos encontrados acima do local de emergência das acículas (IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992; NIKLES; 1961). Estas células são as únicas capazes de desenvolver ramos com crescimento ortotrópico (NIKLES, 1961; HERTEL, 1980). Os enxertos com *A. angustifolia* comprovaram a eficiência deste polo meristemático para formar uma nova parte aérea da planta.

Entretanto, neste experimento não ocorreu o mecanismo de cicatrização, e a inexistência de calo indica que não houve resposta morfogênica à cicatrização dos tecidos na região do enxerto. Após o primeiro mês de avaliação, os segmentos microenxertados apresentaram ressecamento e oxidação dos tecidos vegetais (Tabela 3). A oxidação influenciou negativamente a sobrevivência do enxerto e a primeira premissa da enxertia não foi alcançada, que é a nutrição do microenxerto (MACDONALD, 1996).

Comparando este resultado com o obtido na microenxertia do ápice caulinar, conclui-se que a área de contato da placa de 9 mm<sup>2</sup> quadrados (Figuras 1J, 1K e 1M) apresentou maior contato com o ar do que o microenxerto de ápice (Figura 1L). Na microenxertia com o ápice caulinar, os primórdios foliares protegeram o enxerto contra a oxidação, sendo evidente que este fator foi determinante para o não crescimento e desenvolvimento do microenxerto do segmento do caule.

Os resultados obtidos com relação à oxidação dos enxertos estão de acordo com Paz e Pasqual (1998) e Mneney e Mantell (2001), que relatam que a oxidação das superfícies cortadas restringe o percentual de sobrevivência dos microenxertos e, com isso, as chances de sucesso no estabelecimento das plantas

microenxertadas em muitas espécies. As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em polifenóis, derivados do metabolismo secundário, muito importantes na defesa da planta. A oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa do tipo quinonas. Estas substâncias podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e por conseqüência a morte da célula (TEIXEIRA, 2001), impedindo assim a conexão do enxerto com o porta-enxerto, como ocorreu com *A. angustifolia*, que é rica em compostos fenólicos (BUNDCHEN, 2001).

Visando minimizar os efeitos da oxidação, Grattapaglia e Machado (1998) recomendam a adição de antioxidantes ao meio de cultivo ou em pré-tratamento dos explantes de uma solução desta substância, para diminuir da oxidação. O pré-tratamento realizado nos explantes com a solução do antioxidante, citrato de potássio teve efeito positivo em cultura de tecido com ápices caulinares que apresentavam o problema de oxidação. O uso de antioxidante pode ser uma alternativa para os próximos trabalhos com *A. angustifolia*.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Microenxertos de ambas as regiões, ápices de ramos ortotrópicos e placas laterais, provenientes de rebrota dos ramos ortotrópicos de árvores adultas, não são viáveis para serem utilizados na propagação clonal por meio da microenxertia *in vitro*, nas condições deste experimento.

Sugere-se que a aplicação de reguladores vegetais devem ser testados em futuros trabalhos.

A indução de novos brotos, provenientes de ramos ortotrópicos jovens de plantas a adultas é um passo fundamental para o sucesso da microenxertia.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ANSELMINI, J. I. **Microenxertia e polinização controlada de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba.** 86f. Curitiba. Tese (Doutorado em Agronomia-Produção Vegetal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2008.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.967-973, 2008.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, P. G. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* - induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.113-118, 1998.

ASTARITA L. V.; HANDRO W.; FLOH E. I. S. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.163-168, 2003.

BÜNDCHEN, M.; **Respostas morfo-anatômicas e fisiológicas em folhas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) sujeitas à poluição urbana.** 80f. Curitiba. Tese (Mestrado em Botânica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.

CARVALHO, S. A.; SANTOS, F. A.; MACHADO, M. A. Eliminação de vírus do complexo sorose dos citros por microenxertia associada a termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n.3, 2002.

DEBIASI, C.; ZAFFARI R. G.; SALERNO A. R.; GUERRA M. P. Correlação entre a capacidade proliferativa *in vitro* e a dominância apical *in vivo* da bananeira Grand Naine e Nanicão. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n.3, p.597-600, 2002.

DEGRATIAS, J. M.; LUTZ, A.; DOSBA, F. Shoot-tip micrografting of *in vitro* micropropagated sweet cherries (*Prunus avium* L.), in order to eliminate 3 viruses (CLSV, PDV and NRSV). **Fruits**, v.41, n.11, p.675-680, 1986.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes.** São Paulo: Edgard Blucher, 293p., 1974.

ESTRADA-LUNA, A. A.; LOPES, P. C.; CARDENAS, S. E. In vitro micrografting and histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, v. 92, n.3/4, p.317-327, 2002.

FRANCO, S. M. A.; DILLENBURG R. L. Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea**, v.34, n.2, p.135-144, 2007.

GAMA, T. M.M. T. B. **Estudo comparativo dos aspectos físico-químicos do pinhão nativo e do pinhão proveniente de processos de polinização controlada de *Araucaria angustifolia* e da influência do tratamento térmico**. 89f. Curitiba. Dissertação (Tecnologia de Alimentos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2006.

GLORIA A. B.; GUERREIRO C. M. S. **Anatomia vegetal**. Editora: Universidade Federal de Visoça. 438p., 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. micropropagação. In: Torres A. C. e Caldas L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Embrapa, v.1, p.183-260, 1998.

GUERRA, P. G.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A. L. W.; ASTARITA, L. V.; NODARI, R. O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze. **Forestry Sciences**: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v.06, p.458-479, 2000.

HANDRO W.; FERRENRA C. W. Preliminary report in tissue of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Bol. Bot. USP**, v.8, p.71-74, 1980.

HARTMANN H. T.; KESTER D. E.; DAVIES J. F.; GENEVE R. L. **Plant propagation: principles and practices**. Principles and practices. 6ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 647p., 2002.

HERTEL, R. J. G. **Interpretação morfológica da *Araucaria angustifolia***. Curitiba. 143f. Tese (Concurso para professor titular na área de Morfologia Vegetal) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 1980.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE (IBAMA). **Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção**. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm](http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm)> . Acesso em: 27/10/2009.

IRITANI, C.; SOARES V. R.; GOMES A. V. Aspectos morfológicos da ação de reguladores de crescimento em estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Acta Biologica Paranaense**, v.15, p.1-20, 1987.

IRITANI, C.; ZANETTE F.; CISLINSKI J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biologica Paranaense**, v. 21, n.1, 2, 3, 4, p.57-76, 1992.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. II. O enraizamento dos brotos axilares. **Acta Biologica Paranaense**, v. 22, n.1, 2, 3, 4, p.1-13, 1993.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze.** Curitiba, 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 1997.

JEFFREE, C.E.; YEOMAN, M.M. Development of intercellular connections between opposing cells in graft unions. **New Phytologist**, v.93, n.4, p.491-509, 1983.

KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional**, 148p., 2002.

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.3, p.421-427, 1980.

MACDONALD, B. **Practical woody plant propagation for nursery growers.** Timber Press, 699 p., 1996.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. *In vitro* micrografting of cashew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p.49-58, 2001.

NIKLES, D. G. The development of a new method for grafting hoop an kauri pines. **Queensland Forest Service**, p.1-31, 1961.

NUNES, J. C. O.; ABREU, M. F.; DANTAS, A. C. M.; PEREIRA, J. A.; PEDROTTI E. L. Caracterização morfológica de microenxertia em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.80-83, 2005.

PAZ, O. P.; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH, v.1, p.147-160, 1998.

PENCHEL, R. M. ***In vitro* studies of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria heterophylla*.** New Jersey, 98f. Tese (Mestrado em Ciência, Botânica e Fisiologia Vegetal), Universidade de New Jersey, 1986.

RIBEIRO, L. M.; VIEIRA, M. L.; SIMÕES M. O. M. Microenxertia ex vitro para eliminação do vírus CABMV em maracujá-azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n.5, p.589-594, 2008.

RODRIGUES C. L.; ALMEIDA Á. F.; KIKUTI P.; SPELTZ R. M. Estudo comparativo da avifauna em mata natural e em plantio homogêneo de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Instituto de pesquisas e estudos florestais**, 1981.

SOLÓRZANO-FILHO, J. A. **Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kutze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP.** São Paulo, 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, 2001.

STARRANTINO, A.; CARUSO, A. The shoot-tip grafting technique applied in citriculture. **Acta Horticulturae**, v.227, p.101-103, 1988.

STEINER N.; VIEIRA, F. N.; SARA, M. S.; GUERRA M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.895-903, 2005.

STEINER, N.; SILVEIRA, E. V.; GUERRA M. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.89, p.55-62, 2007.

SOUZA, A. F. ; SILVA, C.F.; LONGHI, S. J. ; BRENA, D. A. Regeneration patterns of a long-lived dominant conifer and the effects of logging in southern South America. **Acta Oecologica**, v. 34, p.221-232, 2008.

TAIZ L.; ZEIGER E. Auxinas. In: **Fisiologia vegetal**. 3ª edição, Editora Artmed: Porto Alegre, 2004.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. In: **IV Encontro latino americano de biotecnologia vegetal**. Goiás, 2001. Online. Disponível em:<[www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/simposios/S-06/João%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/João%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf)>. Capturado em: <3/10/2007>.

TORRES, A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J, A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa: Brasília, v.1, p.509, 1999.

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

ZACCARO, R. P.; DONADIO, L. C.; LEMOS, E. G. M. Microenxertia em cultivares de manga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.533-535, 2006.

ZANETTE, F.; IRITANI C.; PAULA S. R. Aspectos básicos da cultura *in vitro* de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.9, p.7-13, 1987.

## 5 CAPÍTULO III

### O TROPISMO EM *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE

#### RESUMO

A *A. angustifolia* se reproduz naturalmente por meio de suas sementes, mas a propagação clonal se faz necessária para a produção de árvores selecionadas. Características como determinação do sexo, alta produção de pinhão, precocidade reprodutiva e porte reduzido são desejáveis para um pomar de produção de pinhão. Várias pesquisas vêm sendo realizadas para a propagação via macropropagação ou micropropagação, mas, atualmente não existe um protocolo para se propagar *A. angustifolia* em larga escala. O hábito de crescimento dos ramos plagiotrópicos e a falta de disponibilidade de ramos ortotrópicos são obstáculos à propagação vegetativa da espécie. O objetivo deste trabalho foi descrever morfológicamente o hábito de crescimento de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos em estacas e enxertos. Foi observado que enxertos e estacas realizados com ramos plagiotrópicos originaram plantas com crescimento plagiotrópico. Os enxertos realizados com ramos ortotrópicos originaram plantas com crescimento verticalizado.

**Palavras-chave:** hábito de crescimento, plagiotropismo, ortotropismo

## TROPISM DESCRIPTION IN *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE

### ABSTRACT

The *Araucaria angustifolia* reproduces naturally through its seeds but the propagation of the cloned trees is necessary for the production of the selected ones. Characteristics such as sex determination, high quality pine seeds, precocious reproduction and low height are desired for a pine seed production orchard. Several researches have been held for the propagation through staking, grafting and micro-propagation. However, currently there is not a protocol to propagate the *Araucaria angustifolia* in large-scale. The growth habit of the plagiotropic branches and the lack of availability of the orthotropic branches are obstacles to achieve the vegetative propagation of the species. The aim of this work was to describe morphologically the growth habit of the orthotropic and plagiotropic branches through the observation of the plant growth in its normal development in re-sprouting, stakings and graftings.

**Key-words:** growth habit, plagiotropism, orthotropism.

## 5.1 INTRODUÇÃO

*Araucaria angustifolia* é considerada um fóssil vivo, tendo acompanhado inúmeras transformações ocorridas no planeta e, após algumas décadas de exploração (HERTEL, 1980; KOCH e CORRÊA, 2002), integra a lista oficial do Ibama (2009) de espécies ameaçadas de extinção. Representa mais de 40% das árvores que compõem a Floresta Ombrófila Mista, sendo uma espécie dominante no dossel. Tronco de fuste único, colunar e cilíndrico, perenifólia, com folhas de coloração verde-escura, que se destacam na paisagem da floresta, tendo essa recebido o nome de Floresta com Araucária (CARVALHO, 1994).

Espécie longeva, atingindo em média entre 140 a 250 anos, existindo exemplares, de acordo com os anéis de crescimento, com até 386 anos de idade, porém são raros (SANQUETTA et al., 2007). As árvores são dioicas, raramente monoicas, o ciclo reprodutivo pode se iniciar aos 15 a 20 anos de idade (BANDEL e GURGEL, 1967), a produção de pinhões leva aproximadamente entre 29 a 34 meses (ANSELMINI, 2005; ANSELMINI, ZANETTE e BONA, 2006). O pinhão é um alimento altamente nutritivo, é uma rica fonte de energia, amido e proteína, serve tanto para os animais no interior da floresta quanto para o homem. A produção de pinhão se restringe aos meses de abril até setembro (ZANETTE, ANSELMINI e OLIVEIRA, 2007) e a extração pelo homem ocorre de forma predatória sem planejamento (SOLÓRZANO-FILHO, 2001), com a retirada do produto nos locais de ocorrência natural da árvore.

*A. angustifolia* não é plantada com o objetivo de produzir pinhão e não é vista como economicamente viável (AQUINO, 2005). No Brasil, este recurso ainda é pouco explorado e merece uma atenção especial. Porém, em Portugal, o pinhão proveniente de *Pinus pinea* é utilizado como fonte de alimento e move a economia da região de Alcaccer. As pinhas são consideradas pelos agricultores altamente rentáveis, cada árvore produzindo entre cem e duzentas pinhas de 300 a 400 g (CARNEIRO, 2007). A *A. angustifolia* produz pinhas de 1.300 g chegando facilmente

em pinhas com 2300 g, podendo atingir em caso extremo a produção de 398 pinhas (KAYUVÁ, 2009).

A propagação vegetativa é uma ferramenta importante para proporcionar a maximização de produção, mantendo as características desejáveis de árvores selecionadas, para formar pomares clonais (HIGASHI, SILVEIRA e GONÇALVES, 2000). Alguns trabalhos foram realizados no Brasil para propagar a *A. angustifolia* vegetativamente pela estaquia (IRITANI, SOARES e GOMES, 1986), enxertia (KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) e micropropagação (ZANETTE, IRITANI e PAULA 1987; IRITANI, ZANETTE, CISLINSKI, 1992; IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI 1993; IRITANI 1997; ASTERITA e GUERRA 1998; GUERRA et al., 2000; ANSELMINI e ZANETTE 2008; STEINER, SILVEIRA e GUERRA, 2007). Entretanto, ainda não se estabeleceu um protocolo eficiente para a produção de mudas de *A. angustifolia* em larga escala.

Os ramos da árvore apresentam diferenças no hábito de crescimento e na morfologia. As modificações são provocadas pelo tropismo, podendo formar ramos com crescimento plagiotrópico ou ortotrópico, que limitam a propagação clonal da espécie.

O crescimento destes ramos são respostas de um processo endógeno, relacionado à redistribuição desigual da auxina, mediante a distribuição e posicionamento dos estatólitos. Os estatólitos são sensores de gravidade formados por amiloplastos, grandes e densos, presentes em muitas células vegetais. Esses são responsáveis pela primeira resposta da planta mediante a percepção da mudança espacial, e a segunda resposta é visível pelas modificações morfogênicas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O objetivo deste trabalho foi fazer a descrição do comportamento do tropismo por meio da análise qualitativa do hábito de crescimento dos ramos, ortotrópicos e plagiotrópicos, em estacas e enxertos. Este estudo visa dar subsídios para futuras pesquisas que abordem a indução de ramos e a clonagem de genótipos superiores.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na unidade experimental do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. O trabalho foi desenvolvido de 2006 a 2010 e foi dividido em dois experimentos: o primeiro utilizou ramos plagiotrópicos em estacas e enxertos, o segundo usou ramos ortotrópicos em enxertos.

### 5.2.1 Experimento com ramos plagiotrópicos

#### 5.2.1.1 Coleta de ramos para a estaquia e enxertia

A coleta dos ramos plagiotrópicos ocorreu em ramos secundários e terciários de árvores adultas, com o sexo conhecido. Os ramos foram retirados no dia da estaquia e da enxertia (Figura 4A).

#### 5.2.1.2 Estaquia de ramos plagiotrópicos

As estacas foram preparadas com 5 cm de comprimento e, na metade basal, as acículas foram retiradas e o corte em bisel foi realizado. Após o processo de desinfestação, as estacas foram submetidas à imersão por um minuto em solução de ácido indo-3-butírico ( $3000 \text{ mg.L}^{-1}$ ), foram plantadas em bandejas contendo vermiculita e permaneceram em casa de vegetação com nebulização intermitente.

Após 18 meses, as estacas enraizadas, em 2006 passaram para o ambiente externo e foram plantadas no solo em pleno sol. Após o plantio, as estacas foram divididas em dois grupos: o primeiro se desenvolveu rasteiro na superfície do solo, o segundo foi tutorado com estacas de bambu e conduzido na vertical. No período de quatro anos, o crescimento das plantas foi monitorado.

### 5.2.1.3 Enxertos plagiotrópicos

Foram realizados dois tipos de enxertia: garfagem de topo e placagem. Para a garfagem de topo, em 2006, foram utilizados porta-enxertos com 1 ano e sete meses idade. A enxertia foi realizada no mês de março, em casa de vegetação e os garfos foram fixados com fita plástica. Após três meses da enxertia, as fitas foram retiradas e as plantas transferidas de sacos plásticos para vasos com capacidade de 12 litros. As plantas foram levadas para o jardim na unidade experimental do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo no Setor de Ciências Agrárias, neste local permanecendo por quatro anos, até a avaliação final do experimento.

Na placagem, as placas para a enxertia foram retiradas da região subapical dos ramos de árvores fêmeas adultas. Os porta-enxertos utilizados tinham cinco anos de idade, estavam plantados no chão e a enxertia ocorreu no mês de março de 2009. As placas de enxertia apresentavam aproximadamente 20 mm de comprimento e 5 mm de largura e foram fixadas em ramos secundários (plagiotrópicos) da árvore. A fixação da placa ocorreu com o auxílio de um arame e com uma fita plástica. Após três meses, a fita foi retirada e foi cortada a parte do porta-enxerto superior à placa. O enxerto foi avaliado aos oito e aos dez meses. Os dois tipos de enxerto foram avaliados quanto ao tropismo dos ramos enxertados.

### 5.2.2 Experimento com ramos ortotrópicos

#### 5.2.2.1 Coleta de ramos ortotrópicos para enxertia

Os brotos ortotrópicos (Figura 4B) utilizados na enxertia foram provenientes de rebrote de planta adulta com sexo identificado. Os rebrotos tiveram origem natural e/ou induzida. Os rebrotos de origem natural foram provenientes de brotações ortotrópicas laterais ao longo do tronco (Figura 4C e D). Os rebrotos induzidos (DELGADO, WENDLING e BRONDANI, 2007; WENDLING, et al. 2009), tiveram origem, no tronco principal com a retirada de parte da copa, ou de rebrotos que surgiram após a derrubada de pinheiros adultos ou ainda com a eliminação somente

o ápice de plantas adultas (Figura 4 E e F). Após dez meses do corte do tronco, os brotos com crescimento ortotrópico foram retirados e enxertados no mesmo dia.

#### 5.2.2.2 Enxertos ortotrópicos

A enxertia do tipo garfagem de topo e placagem lenhosa foram realizadas em porta-enxertos com um e três anos, respectivamente. Os enxertos do tipo garfagem foram realizados com ramos de 120 mm de comprimento com corte em bisel. Para o tipo placagem, as placas para enxertia foram cortadas com a lâmina de bisturi e mediam aproximadamente 25 mm de comprimento e 8 mm de largura. Em seguida foram encaixadas na janela aberta do porta-enxerto o mais rápido possível, evitando-se tocar nos tecidos de contato. A enxertia ocorreu na região subapical do ramo principal do porta-enxerto, local em que as acículas foram retiradas.

Após o encaixe, em ambos os enxertos o material enxertado foi amarrado com um arame e com uma fita plástica. Após oitenta dias, a fita plástica foi retirada para verificar a sobrevivência ou não do enxerto.

Após 120 dias, foi avaliada a sobrevivência dos enxertos, quando ocorreu a decapitação do porta-enxerto, no caso da enxertia do tipo placagem. As brotações do enxerto foram avaliadas quanto à morfologia e direção do crescimento. Durante o experimento as brotações do porta-enxerto foram retiradas.

## 5.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Experimento com ramos plagiotrópicos

#### 5.3.1.1 Crescimento das plantas provenientes de estaquia sem tutoramento

As estacas provenientes de ramos plagiotrópicos de plantas adultas após o enraizamento, permaneceram com crescimento contínuo e horizontalizado rente ao chão, simetria bilateral e diâmetro visivelmente reduzido (Figura 5A). Estas características foram marcantes e persistiram após cinco, não permitindo a formação de indivíduos normais, como observado também por Iritani (1997) em microestaquia de *A. angustifolia*.

Sabe-se que a nova planta tem o hábito de crescimento do propágulo que lhe deu origem, isto é, se o propágulo foi proveniente de segmentos de ramo lateral, o crescimento da nova parte aérea resultará em um ramo com crescimento horizontalizado. Em outras espécie como *Coffea arabica* (CARVALHO e FILHO, 1952), *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) (GONDIM et al., 2001) e *Piper aduncum* (ALVARENGA et al., 2009), o plagiotropismo dos ramos acompanha o crescimento das plantas que tiveram origem em ramos plagiotrópicos, assim como observado neste trabalho.

O plagiotropismo é um fenômeno que se caracteriza por uma diferenciação somática, que na maioria dos casos é permanente, podendo ocorrer devido às condições ambientais, nutricionais ou hormonais. Os mecanismos que levam a estas transformações são extremamente complexos e ainda não estão bem elucidados (IRITANI, 1981; KAGEYAMA e FERREIRA 1975; IRITANI, ZANETTE e CISLINSKI, 1992).

O crescimento plagiotrópico é muito comum em plantas que possuem dominância apical. Os ramos plagiotrópicos de *Araucariaceae* podem ser mais ou menos horizontalizados. Em *Araucaria excelsa*, os ramos apresentavam crescimento mais horizontal quando comparados com os ramos de *Araucaria cunninghamii* e

*Araucaria robusta*. Logo, concluiu-se que esta diferença do plagiotropismo dos ramos ocorreu devido a uma dominância apical mais pronunciada em *A. excelsa* (NIKLES, 1961). Quanto mais evidente a dominância apical da planta, maior será a canalização progressiva do desenvolvimento, representado pelo crescimento plagiotrópico. Este fato pode ser confirmado com a *A. angustifolia*, que apresenta uma forte dominância apical e um plagiotropismo bem caracterizado, com ramos formando ângulo de  $90^{\circ}$  com o eixo principal.

#### 5.3.1.2 Crescimento das plantas provenientes de estaquia com tutoramento

As plantas que receberam o auxílio do tutor para orientar seu crescimento na vertical permaneceram com características de ramos plagiotrópicos, simetria bilateral e diâmetro do caule limitado, quando comparadas com uma planta vinda de semente com a mesma idade. O comportamento das plantas foi o mesmo dos ramos jovens ligados à planta mãe. Entretanto, no quarto ano de cultivo, com 1,5 m de altura (Figura 5B) e após sete verticilos com simetria bilateral, ocorreu a formação do oitavo verticilo com quatro ramos, caracterizando uma nova disposição espacial, apresentando simetria radial (Figuras 5B e 5C).

Em *Araucaria excelsa*, foi observada uma reversão parcial do plagiotropismo quanto ao crescimento verticalizado e não quanto à simetria (MAENE e DEBERGH, 1987). Esses resultados abrem novas expectativas para as estacas de plantas que possuem crescimento horizontalizado em seus ramos.

Mesmo após o crescimento diferenciado dos verticilos da região terminal do caule e com grau avançado de lignificação (Figura 5D e 5E), a planta não apresentou capacidade de se manter na vertical sem o auxílio de um tutor. A retirada do auxílio significa o tombamento da planta. É provável que o diâmetro da base do caule, visivelmente inferior quando comparado com o da região mais apical, tenha contribuído para esta falta de estabilidade da estaca na posição vertical.

#### 5.3.1.3 Crescimento de ramo plagiotrópico enxertado em ramo ortotrópico

Os ramos plagiotrópicos usados para se fazer a enxertia do tipo garfagem de topo tiveram crescimento horizontalizado, tempo limitado, sem ramificação e diâmetro do caule reduzido, como o de um ramo terciário ligado a planta mãe

(Figuras 6A e 6B). Estes resultados foram os mesmos dos trabalhos de enxertia (GURGEL e GURGEL FILHO (1967); KAGEYAMA e FERREIRA, 1975) e de microenxertia (ALSELMINI e ZANETTE, 2008), realizados a partir de ramos plagiotrópicos de *A. angustifolia*.

Os ramos plagiotrópicos usados na enxertia, que receberam o auxílio de um tutor, mantiveram a verticalização (Figuras 6C), mas quando este foi retirado ocorreu o tombamento do ramo. As demais características foram as mesmas citadas acima. Após o terceiro ano, esses ramos apresentam um decréscimo no crescimento, baixo vigor, amarelecimento das folhas, senescência, com posterior morte do enxerto. Este resultado pode ter sido consequência de fatores endógenos do próprio ramo ou da falta de interação adequada com o porta-enxerto, pois ocorreu o desenvolvimento de um calo na região da enxertia (Figuras 6D e 6E). O tempo de vida limitado não proporcionou o desenvolvimento de estróbilos como foi relatado com os enxertos de ramos plagiotrópicos de *Araucaria cunninghamii* (MASSART<sup>3</sup>, 1924; BREVIGLIERI<sup>4</sup>, 1947 *apud* NIKLES, 1961).

#### 5.3.1.4 Crescimento de ramo plagiotrópico enxertado em ramo plagiotrópico

Os resultados de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento dos enxertos foram positivos. Após quatro meses da enxertia, o enxerto apresentou um pequeno inchaço no tecido, sinalizando a indução de uma gema (Figura 7A). O crescimento do enxerto foi lateralizado, vigoroso, inicialmente lento, mas, aos oito e onze meses, o enxerto cresceu de 40 mm para 150 mm de comprimento (Figura 7B e 7C). Os resultados mostram a compatibilidade deste tipo de enxertia, tendo em vista o vigor no crescimento do enxerto. O comportamento de crescimento do ramo enxertado é o mesmo de um ramo plagiotrópico adulto, com ramificação e diâmetro compatível, o que indica a perspectiva de produção precoce de pinhão. Os trabalhos com enxertos de ramos plagiotrópicos em ramos plagiotrópicos não foram encontrados. Entretanto, estes resultados deram início a novas pesquisas que estão sendo realizadas com este tipo de enxerto.

---

<sup>3</sup> Massart, J. Royal Acad. Belgium Sc. Class Memoires- tome v fasc. 8, 1924.

<sup>4</sup> Breviglieri, N. Cit. From Schaffalitzky, 1949.

### 5.3.2 Experimento com ramos ortotrópicos

#### 5.3.2.1 Crescimento de ramo ortotrópico enxertado em ramo ortotrópico

A enxertia de ramos ortotrópicos em plantas jovens, tanto para garfagem como para a placagem, em vaso ou em campo, apresentaram crescimento ortotrópico como era de se esperar (Figura 7D, 7E e 7F). Após 2 anos as plantas continuaram crescendo com excelente cicatrização (Figura G e H), sem nenhum sintoma de rejeição, como foi observado em ramos plagiotrópicos enxertados. Nikles (1961) também observou um crescimento vigoroso de enxertos provenientes de ramos ortotrópicos, incluindo a produção de estruturas reprodutivas, o que deve acontecer nos próximos anos com os enxertos da *A. angustifolia*.

## 5.4 CONCLUSÕES

Plantas provenientes de estacas de ramos plagiotrópico sem tutoramento apresentam crescimento horizontalizado.

Plantas provenientes de estacas de ramos plagiotrópicos tutoradas apresentam simetria radial dos ramos somente após o sétimo verticilo e com 4 anos de idade ainda dependem do tutor, mesmo com mais de 2 metros de altura.

A enxertia de ramos terciários (plagiotrópicos) de plantas adultas em plantas jovens, por garfagem, é viável. Os ramos terciários mesmo quando enxertados em plantas jovens tem crescimento e tempo de vida limitado, com senescência após o terceiro ano. O crescimento do ramo é plagiotrópico, e sem ramificação, como um ramo terciário.

Ramos plagiotrópicos de fêmeas adultas, enxertados em ramos plagiotrópicos de plantas jovens, por placagem lenhosa, mantiveram o crescimento com ramificação radial de ramo adulto.

Os ramos ortotrópicos de plantas adultas enxertados em plantas jovens, apresentam um crescimento normal verticalizado.



FIGURA 4 - *Araucaria angustifolia*; A - ASPECTO GERAL DOS RAMOS COM CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO; B- ASPECTO GERAL DOS RAMOS COM

CRESCIMENTO ORTOTRÓPICO, COM DIÂMETRO SUPERIOR; C E D- RAMOS ORTOTRÓPICOS PROVENIENTES DE BROTAÇÕES NATURAIS AO LONGO DO CAULE; E- BROTOS ORTOTRÓPICOS INDUZIDOS PELA PODA DO ÁPICE DA ÁRVORE; F- BROTAÇÕES INDUZIDAS APÓS A RETIRADA DA COPA.



FIGURA 5 - *Araucaria angustifolia*; A- ASPECTO GERAL DA ESTACA PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO CRESCENDO RENTE AO CHÃO; B- ASPECTO GERAL DA ESTACA, PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO COM TUTOR PARA AUXILIAR A

VERTICALIZAÇÃO DO RAMO DURANTE O CRESCIMENTO; C- DETALHE DO ÁPICE DO RAMO APÓS O SÉTIMO VERTICILO; D E E- DETALHE DO DIÂMETRO DO CAULE NA BASE DA ESTACA E NA REGIÃO APICAL, RESPECTIVAMENTE.



FIGURA 6 - *Araucaria angustifolia*; A E B- ASPECTO GERAL DO ENXERTO DO TIPO GARFAGEM DE TOPO, PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO; C- ASPECTO GERAL DO ENXERTO DO TIPO GARFAGEM DE TOPO, PROVENIENTE DE RAMO PLAGIOTRÓPICO QUE RECEBEU O AUXÍLIO DE TUTOR DE CONDUÇÃO, VERTICALIZANDO O CRESCIMENTO DA PLANTA; D E E- DETALHE DO CALO

OBSERVADO EM ENXERTOS APÓS O PRIMEIRO E SEGUNDO ANO DA ENXERTIA, RESPECTIVAMENTE.



FIGURA 7- *Araucaria angustifolia*; A, B E C- RAMO PLAGIOTRÓPICO ENXERTADO EM RAMOS PLAGIOTRÓPICO APÓS QUATRO, OITO E ONZE MESES DA ENXERTIA, RESPECTIVAMENTE; D- ASPECTO GERAL DA PLANTA ENXERTADA COM RAMO ORTOTRÓPICO PROVENIENTE DA GARFAGEM, APÓS UM ANO E SETE MESES; E- ASPECTO GERAL DA PLANTA ENXERTADA COM RAMO ORTOTRÓPICO PROVENIENTE DA PLACAGEM APÓS DOIS ANOS E OITO MESES DE ENXERTIA; F- ASPECTO GERAL DA PLANTA ENXERTADA COM RAMO ORTOTRÓPICO

PROVENIENTE DA PLACAGEM APÓS TRÊS ANOS E OITO MESES DE ENXERTIA; G E H- DETALHE DO CALO DE ENXERTIA DOS RESPECTIVOS ENXERTOS.

## 5.5 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A. A.; SOUZA, E. S.; ALVES, J. S.; ARANTES, L. O.; CARVALHO, M. E. A. **Influência do tipo de estaca no enraizamento de *Piper aduncum***. São Lourenço, MG. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, p.1-3, 2009.

ANSELMINI, J. I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba**. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2005.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F.; BONA, C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – Pr. **Floresta e Ambiente**, v.13, n.1, p.44-52, 2006.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.967-973, 2008.

AQUINO, F. M. **Cultivo da *Araucaria angustifolia*, viabilidade econômico-financeira e alternativas de incentivo do Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul, agência de Florianópolis**, 53p. Santa Catarina gerência de planejamento is 2005-01, 05/10/2005.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, P. G. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* - induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.113-118, 1998.

BANDEL, G.; GURGEL, J. A. A. Proporção do sexo em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvicultura em São Paulo**, v.6, p.209-220, 1967.

CARNEIRO, A. N. **Manual ilustrado - Enxertia em pinheiro manso** - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pesca. Oeiras, Portugal, 41p., 2007.

CARVALHO, A.; FILHO A. H. Novas observações sobre o dimorfismo dos ramos em *Coffea arabica*. **Bragantia**, v.12, p.81-84, 1952.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 640p., 1994.

DELGADO, M. E.; WENDLING, I.; BRONDANI, E. G. Indução de brotações basais e estaquia de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: **Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas**, 6p., Colombo. Anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

GONDIM, S. M. T.; THOMAZINI, J. M.; CAVALCANTE, M. J. B.; SOUZA, J. M. L. **Aspectos da produção de cupuaçu**, Embrapa, Rio Branco Acre, 43p., 2001.

GUERRA, P. G.; SILVEIRA, V.; SANTOS A. L.; ASTARITA, L. V.; NODARI, R. O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze. **Forestry Sciences**: Kluwer Academic Publishers, v.06, p.458-479, 2000.

GURGEL, J. T. A.; GURGEL, F. C. A. Métodos de enxertia para o pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze., visando à formação de pomares de sementes. **Sivilcultura**, v.6, p.153-155, 1967.

HERTEL, R. J. G. **Interpretação morfológica da *Araucaria angustifolia***. Curitiba, 143f. Tese (Concurso para professor titular na área de Morfologia Vegetal) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1980.

HIGASHI, N. E.; SILVEIRA, A. R.; GONÇALVES, N. A. Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e sua evolução na Brasil. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, n.192, p.1-12, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE (IBAMA). **Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção**. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm](http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm)> . Acesso em:< 27/10/ 2009>.

IRITANI, C. **Ação de reguladores de crescimento na propagação vegetativa por estaquia de *Ilex paraguariensis* Saint Hilare e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Curitiba, 163f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 1981.

IRITANI, C.; SOARES V. R.; GOMES, A. V. Aspectos morfológicos da ação de reguladores de crescimento em estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Acta Biologica Paranaense**, v.15, p.1-20, 1986.

IRITANI, C.; ZANETTE F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biologica Paranaense**, v.21, n.1, 2, 3, 4, p.57-76, 1992.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* II. O enraizamento dos brotos axilares. **Acta Biologica Paranaense**, v.22, n.1, 2, 3, 4, p.1-13, 1993.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze**. Curitiba, 1997. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 1997.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, n.12, p.95-102, 1975.

KAYUVÁ. Projeto Kayuvá, família sustentável, **Kayuvá**. Disponível em: <[www.pinhao.org.br/portal/](http://www.pinhao.org.br/portal/)>. Acesso em: 12/11/2009.

KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional**, 148p., 2002.

MAENE, L., DEHBERG, P. C. In: Araucaria. BONGA J. M.; DURZAN. **Cell and tissue culture in forest**, Martinus Nijhoff Publ, v.3, p.176-184, 1987.

NIKLES, D. G. The development of a new method for grafting hoop an kauri pines. **Queensland forest service**, p.1-31, 1961.

SANQUETTA, C. R.; TETTO, A. F.; FERNANDES, L. A. V.; CORTE, A. P. D.; SOUZA, R. K. **Pinheiro do Paraná: Lendas e Realidades**. 2ª Edição. Curitiba: Editora: Optagraf, 120p., 2007

SOLÓRZANO-FILHO, J. A. **Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kutze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP**. São Paulo, 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, 2001.

STEINER, N.; SILVEIRA, E. V.; GUERRA, M. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.89, p.55-62, 2007.

TAIZ L.; ZEIGER E. Auxinas. In: **Fisiologia vegetal**. 3ª edição, Editora Artmed: Porto Alegre, 2004.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; HOFFMANN, H. A.; BETTIO, G.; HANSEL, F.; Indução de brotações epicórmicas para a propagação vegetativa de árvores de *A. angustifolia*. **Agronomia Costarricense**, v.33, n.2, p.309-319, 2009.

ZANETTE, F.; IRITANI C.; PAULA, S. R. Aspectos básicos da cultura *in vitro* de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.9, p.7-13, 1987.

ZANETTE, F.; ANSELMINI, J. I.; OLIVEIRA, L. S. **Araucaria como fruteira**. Anais do 1º Encontro Paranaense de Fruticultura, p.39-47, 2007.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 ENXERTIA

A época mais apropriada para a realização de enxertia em *A. angustifolia* é outono, para as condições da cidade de Curitiba. Recomenda-se fazer um estudo mais aprofundado, realizando enxertos, entre quinze a trinta dias antes e depois do início do outono, para estabelecer um tempo limite a qual a enxertia poderá ser realizada.

Existem algumas vantagens de trabalhar com a enxertia do tipo placagem de ramos ortotrópicos em *Araucaria angustifolia*:

- 1) pode-se trabalhar com porta-enxertos jovens em que o diâmetro do caule seja superior a sete milímetros;
- 2) evita-se o problema da diferença entre o diâmetro do enxerto do porta-enxerto;
- 3) com apenas um único ramo ortotrópico de aproximadamente 20 cm pode-se realizar mais de dez enxertos;
- 4) evita-se o crescimento plagiotrópico de plantas enxertadas;
- 5) quando o enxerto morre, pode-se enxertar a planta mais uma vez, pois a técnica escolhida causa poucos danos à planta, apresentando uma boa cicatrização devido ao pequeno corte realizada no processo.

As acículas do enxerto facilitam o arranque inicial da placa de enxertia, apesar do trabalho ficar tecnicamente mais difícil, seria importante deixar pelo menos a acícula mais apical da placa de enxertia, o que poderia facilitar a sobrevivência do enxerto.

A aplicação de auxina após a decapitação do porta-enxerto, pode evitar o rebrote do porta-enxerto. Este procedimento poderá ser incorporado em futuros trabalhos.

As plantas enxertadas no vaso não devem permanecer neste local por mais de dois anos. As árvores enxertadas no chão se desenvolvem mais rápido quando comparadas com as plantas em vaso.

Os resultados desta pesquisa ainda não foram totalmente concluídos, pois quando se trabalha com a *Araucaria angustifolia*, os estudos devem ser realizados a médio e longo prazo, devido ao longo ciclo de vida da espécie. É esperado para os próximos anos, a produção precoce de androstróbilos, ginostrobilos e pinhas nas árvores enxertadas.

É fundamental fazer mais estudos de indução de brotos ao longo do tronco de árvores selecionadas, para iniciar a produção de ramos ortotrópicos. É importante salientar que em algumas espécies da família araucariaceae a indução das brotações da base das árvores é influenciada pela época do ano em que ocorreu o corte da árvore.

A possibilidade de escolher um porta-enxerto menos exigente em relação ao solo, deve ser analisada.

Após o término dos estudos da propagação vegetativa em *Araucaria angustifolia*, será importante confeccionar um manual com normas e com certificação de responsabilidade da técnica de enxertia para garantir o acesso a todos e a qualidade do trabalho. É por meio de incentivos como a produção precoce de pinhão, mudas selecionadas e escolha do sexo da planta, que os produtores poderão ser atraídos para o plantio da árvore.

## 6.2 MICROENXERTIA

A microenxertia da *A. angustifolia* é importante para desenvolver clones de matrizes selecionadas. Os resultados obtidos por esta pesquisa sinalizam um caminho a ser seguido na propagação *in vitro* da espécie.

Possivelmente o rejuvenescimento de material adulto e o uso de citocinina se façam necessários para dar continuidade aos trabalhos. É provável que a indução de segmentos caulinares *in vitro* apresente bons resultados para o desenvolvimento brotos que desenvolvam propágulos com características de ramos ortotrópicos a serem microenxertados.

### 6.3 TROPISMO

Os ramos da araucária caracterizam-se pelo hábito de crescimento ortotrópico ou plagiotrópico.

Os ramos ortotrópicos apresentam crescimento verticalizado, diâmetro do caule significativamente superior aos demais ramos e com forte dominância apical.

Os ramos plagiotrópicos apresentam lateralização no crescimento, diâmetro inferior, crescimento e desenvolvimento acelerado.

Os ramos ortotrópicos e plagiotrópicos podem ser semelhantes morfológicamente no início do desenvolvimento, mas apresentam-se fisiologicamente distintos.

Os mecanismos que levam uma gema produzir ramos ortotrópicos e plagiotrópicos não estão totalmente elucidados, mas uma série de fatores podem estar envolvidos, como: o teor de hormônios, mudanças nutricionais, fatores ambientais e fatores genéticos.

O rebrote de ramo ortotrópico ocorre de forma natural, mas pode ser induzido. Naturalmente algumas árvores produzem brotações com crescimento ortotrópico ao longo do caule, isso ocorre de forma esporádica. Brotações ortotrópicas podem ser induzidas por meio de podas. As podas podem ocorrer em regiões distintas das árvores, como, ápice, abaixo dos verticilos, na base e nos ramos laterais, em cada região ocorre uma resposta específica. Estudos sobre, poda e época do ano devem ser realizados, para se produzir brotações em maior quantidade, objetivando-se propágulos para a clonagem.