

CÍCERO DESCHAMPS

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "IN VIVO" E "IN VITRO" DE
SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), ESPÉCIE
FLORESTAL DE MATA CILIAR**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de «MESTRE».

**ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS**

1993

CICERO DECHAMPS

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "IN VIVO" E "IN VITRO" DE
SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), ESPÉCIE
FLORISTAL DE MATA CILIAR

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agrar-
cultura de Lavras, como parte dos requisitos do cur-
so de Pós-Graduação em Agronomia, área de concen-
tração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título
de MESTRE.

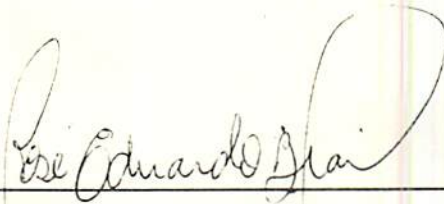
[REDACTED]

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

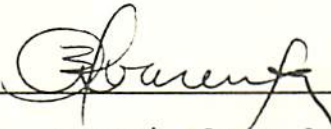
1993

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "IN VIVO" E "IN VITRO" DE
SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), ESPÉCIE
FLORESTAL DE MATA CILIAR

Aprovada:



Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto



Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga



Prof. Dr. Paulo Roberto Camargo e Castro

Dedico a

Tarcício e Erica (amigos e pais)

Néri (amiga e companheira)

AGRADECIMENTOS

- Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, especialmente aos Departamentos de Biologia e Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.
- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, pela licença concedida.
- Eng^o Agr^o Luiz Carlos Hatchbach, chefe da Divisão de Defesa Sanitária Vegetal pelo apoio e esforço à concessão da licença.
- Em especial ao Prof. PhD José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela segura orientação, amizade, confiança e sobretudo pelo seu exemplo de entusiasmo constante e dedicação à pesquisa.
- Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga, pela sugestão do assunto e participações na pré-banca e banca examinadora.
- Prof. Dr. Raimundo S. Barros, da Universidade Federal de Viçosa, pelas valiosas sugestões apresentadas na pré-banca.
- Prof. Dr. Paulo C. Castro, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela importante participação na banca examinadora.
- Aos amigos e irmãos Lena, César e Nádia pelo apoio e estímulo.
- Companheiros de turma, Eliazel, Alcebiades, Fátima, Valdemir e Patrícia pelo convívio e amizade durante o curso.
- Otoniel pela ajuda nos trabalhos e principalmente, pela amizade e companheirismo.
- Jucinei pela atenção, apoio e amizade.
- Eurides pela convivência e amizade.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE IMERSÃO, DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E DO SUBSTRATO NO ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE SARANDI (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG. var. Schottiana)	9
RESUMO	9
2.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO	10
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
2.3.1. Porcentagem de enraizamento	21
2.3.2. Comprimento de raízes	24
2.3.3. Peso de matéria fresca e seca de raízes	26
2.3.4. Raio médio de raízes e relação raiz/parte aérea	28
2.3.5. Número de ramos por estaca	29
2.3.6. Peso de matéria fresca e seca da parte aérea	31
2.3.7. Nutrientes minerais	37
2.4. CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO III - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE SARANDI (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) DIRETAMENTE EM SUBSTRATO	42
RESUMO	42
3.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO	43
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.3.1. Enraizamento "in vivo" de microestacas provenientes de brotações com 100 mm de comprimento	47

3.3.2. Enraizamento "in vivo" de microestacas provenientes de brotações com 200 mm de comprimento	50
3.4. CONCLUSÕES	54
CAPÍTULO IV - CONTROLE DA OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO "IN VITRO" DE BROTAÇÕES DE SARANDI (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. <i>Schottiana</i>)	56
RESUMO	56
4.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO	57
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.4. CONCLUSÕES	70
CAPÍTULO V - ENRAIZAMENTO "IN VITRO" DE MICROESTACAS E MICROPROPAGAÇÃO DE GEMAS AXILARES DE SARANDI (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. <i>Schottiana</i>)	71
RESUMO	71
5.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO	72
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	80
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.3.1. Enraizamento de microestacas "in vitro"	82
5.3.2. Multiplicação "in vitro" de gemas axilares	87
5.3.2.1. Efeito de BAP nos meios MS e WPM	87
5.3.2.2. Efeito da interação NAA e BAP	89
5.3.2.3. Efeito do carvão ativado e da interação BAP e GA ₃	91
5.4. CONCLUSÕES	98
CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES GERAIS	100

	Página
RESUMO	104
SUMMARY	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
APÊNDICE	123

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página	
1	Localização do Rio Grande (Perdões - MG), área de dispersão do Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993 ...	3
2	Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana), localizada às margens do Rio Grande. ESAL, Lavras - MG, 1993	5
3	<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana. Aspecto geral da planta com detalhes do ramo (A), fruto (B), semente (C) e inflorescência (D). ESAL, Lavras - MG, 1993	6
4	Sistema radicular de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993	7
5	Efeito do substrato sobre a porcentagem de estacas enraizadas e raio médio de raízes em Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993	22
6	Efeito do tempo de imersão em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) sobre a porcentagem de estacas enraizadas de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993	23
7	Efeito do tempo de imersão em solução de ácido indolbutírico (IBA) sobre o comprimento médio de raízes em estacas de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993	25

Figura

Página

- 8 Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) no comprimento médio de raízes e número de ramos/estaca em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) após seis horas de imersão. ESAL, Lavras - MG, 1993 25
- 9 Efeito dos substratos sobre os pesos de matéria fresca e seca de raízes e peso de matéria seca da parte aérea em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993 26
- 10 Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) nos pesos de matérias fresca e seca de raízes em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993 27
- 11 Efeito dos substratos sobre o número médio de ramos e relação raiz/parte aérea em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993 30
- 12 Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) nos pesos de matérias fresca e seca da parte aérea em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) após seis horas de imersão. ESAL, Lavras - MG, 1993 32

Figura

Página

- 13 Efeito de diferentes tempos de imersão em soluções 4,9mM de ácido indolbutírico (IBA) nos pesos de matérias fresca e seca da parte aérea e número de ramos por estaca em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993 33
- 14 Estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) após 60 dias do plantio em areia e plantimax com pré-tratamento em imersão durante seis horas em soluções contendo ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 1,2 (T2); 2,5 (T3); 4,9 (T4); 9,8 (T5)mM e testemunha (T1). ESAL, Lavras - MG, 1993 34
- 15 Estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) após 60 dias do plantio em areia e plantimax com pré-tratamento em imersão durante 12 horas em soluções contendo ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 1,2 (T7); 2,5 (T8); 4,9 (T9); 9,8 (T10)mM e testemunha (T6). ESAL, Lavras - MG, 1993 35
- 16 Estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) após 60 dias do plantio em areia e plantimax com pré-tratamento em imersão durante 24 horas em soluções contendo ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 1,2 (T12); 2,5 (T13); 4,9 (T14) e 9,8 (T15)mM e testemunha (T1). ESAL, Lavras - MG, 1993 36

Figura

Página

- 22 Efeito da concentração de ácido indolbutírico (IBA) na porcentagem de enraizamento e comprimento médio de raízes em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após imersão por 15 minutos. ESAL, Lavras - MG, 1993 52
- 23 Efeito da concentração de ácido indolbutírico (IBA) sobre o número médio de raízes em microestacas apical, mediana superior, mediana inferior e basal de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após imersão por 15 minutos. ESAL, Lavras - MG, 1993 54
- 24 Número médio e porcentagem de explantes com oxidação, necrose apical, contaminação e estabelecidos em meio MS e WPM de plantas adultas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após imersão por 12 horas em água corrente e manutenção por oito dias no escuro após inoculação. ESAL, Lavras - MG, 1993 64
- 25 Número médio e porcentagem de explantes com oxidação, necrose apical, contaminação e estabelecimento em meio MS e WPM de plantas adultas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após manutenção por diferentes períodos em água corrente e luminosidade após a inoculação (claro/escuro - seis dias). ESAL, Lavras - MG, 1993 65
- 26 Porcentagem de explantes oxidados, com necrose apical, contaminados e estabelecidos de plantas adultas e de estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) mantidas em casa de vegetação. ESAL, Lavras - MG, 1993 67

Figura	Página
27 Porcentagem de explantes com necrose apical e estabelecimento de explantes apicais e basais de estacas de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993 ...	68
28 Número médio de folhas emitidas em explantes apicais e basais, com e sem folhas, proveniente de mudas de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana), mantidas em casa de vegetação. ESAL, Lavras - MG, 1993	69
29 Número médio de explantes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) enraizados em meio WPM contendo diferentes concentrações de IBA. ESAL, Lavras - MG, 1993	84
30 Porcentagem de explantes sobreviventes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) em meios MS e WPM contendo ou não ágar 0,6%. ESAL, Lavras - MG, 1993	85
31 Microestaca de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) enraizada em meio WPM com 4,9 μ M IBA e posteriormente aclimatada. ESAL, Lavras - MG, 1993	86
32 Porcentagem de explantes com gemas axilares alongadas em Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) a partir de meios contendo diferentes concentrações de BAP. ESAL, Lavras - MG, 1993	88

Figura	Página
33 Número médio de folhas na parte aérea de explantes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) em meio contendo BAP. ESAL, Lavras - MG, 1993	89
34 Porcentagem de explantes com mais de cinco e com cinco ou menos folhas e de explantes com gemas alongadas em Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) em meio MS contendo NAA. ESAL, Lavras - MG, 1993	90
35 Número médio de explantes alongados, comprimento no alongamento de gemas axilares e número de gemas nos explantes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) em meio contendo GA ₃ . ESAL, Lavras - MG, 1993	92
36 Número médio de explantes alongados em meio contendo carvão ativado (0,1%) e BAP na multiplicação "in vitro" de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993 ...	93
37 Número médio de explantes alongados, número de gemas e comprimento no alongamento de gemas axilares de explantes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana) em meio contendo BAP sem carvão ativado. ESAL, Lavras - MG, 1993	94
38 Comprimento médio de gemas axilares alongadas em meio contendo diferentes concentrações de BAP nos explantes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993 ...	95

Figura	Página
39 Número médio de gemas em meio contendo ou não carvão ativado (0,1%) e BAP nos explantes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. <i>Schottiana</i>). ESAL, Lavras - MG, 1993	96
40 Explantes de Sarandi (<i>Sebastiania schottiana</i> MUELL. ARG., var. <i>Schottiana</i>), com gema axilar alongada. ESAL, Lavras - MG, 1993	97

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

Um dos principais motivos para o assoreamento de rios e represas é a ausência de cobertura vegetal em suas áreas marginais. Em represas, a região denominada área de depleção, correspondente a diferença anual entre as cotas mínima e máxima dos reservatórios, geralmente se apresenta sem cobertura vegetal. As ações erosivas, nessas áreas, são responsáveis por deslizamentos marginais que contribuem para o assoreamento. Em reservatórios destinados à geração de energia elétrica, o assoreamento diminui a energia potencial, e as partículas sólidas em suspensão aumentam o efeito abrasivo com um desgaste prematuro das turbinas.

Nas margens de rios e riachos, a área de depleção corresponde à região com períodos de inundação temporária, em função da ocorrência de precipitações sazonais nas áreas pertencentes às bacias hidrográficas. Nessas áreas, localizam-se as espécies que compõem a mata de galeria. O assoreamento, devido à falta dessas espécies, eleva o nível normal dos rios, o que se agrava no período de chuvas, causando enchentes.

O reflorestamento da mata ciliar corresponde a uma das práticas conservacionistas, que pode ser empregada. Portanto, após a identificação de espécies com tolerância a diferentes

graus ou períodos de inundação,   necessário que se proceda a produção de mudas e repovoamento dessas áreas.

O g nero *Sebastiania* pertence à família Euforbiaceae, uma das maiores das dicotiled neas, com cerca de 290 g neros e 7.500 espécies, incluindo muitas plantas úteis ao homem. Segundo SMITH et alii (1988), o g nero *Sebastiania*   composto por cerca de noventa espécies, com áreas de dispersão, principalmente, no leste do Brasil, América do Norte, África, Sudeste da Ásia e ilhas vizinhas. Os mesmos autores destacam as espécies *S. corniculata* (Vahl) MUELL. ARG., *S. hispida* (Martins) Pax, *S. schottiana* MUELL. ARG., *S. argutidens* Pax & K. Hoffmann, *S. commersoniana* (Baillon) L. B. Smith & R.J. Downs e *S. brasiliensis* Sprengel, como as principais do g nero.

O Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.)   uma espécie florestal de mata de galeria, formada pelas variedades *Schottiana* e *Angustifolia*, a primeira com dispersão nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo e, a segunda, de São Paulo até o Rio Grande do Sul, e ainda Uruguai, Argentina e Paraguai (Figura 1).

A descrição botânica caracteriza o Sarandi como um arbusto de 2 a 3,5 m de altura com ramos eretos, espinhosos, rijos e flexíveis e ramos secundários curtos, retos e pontiagudos. As folhas são sub-coriáceas, com nervuras laterais evidentes, responsáveis pela diferenç a morfológica entre as variedades dessa espécie. As espigas podem ser bissexuadas ou conter apenas a parte masculina ou a feminina bem desenvolvida; quando novas são aproximadamente do tamanho das folhas (CORREA, 1969). As flores cont m, geralmente, três estames, raras vezes

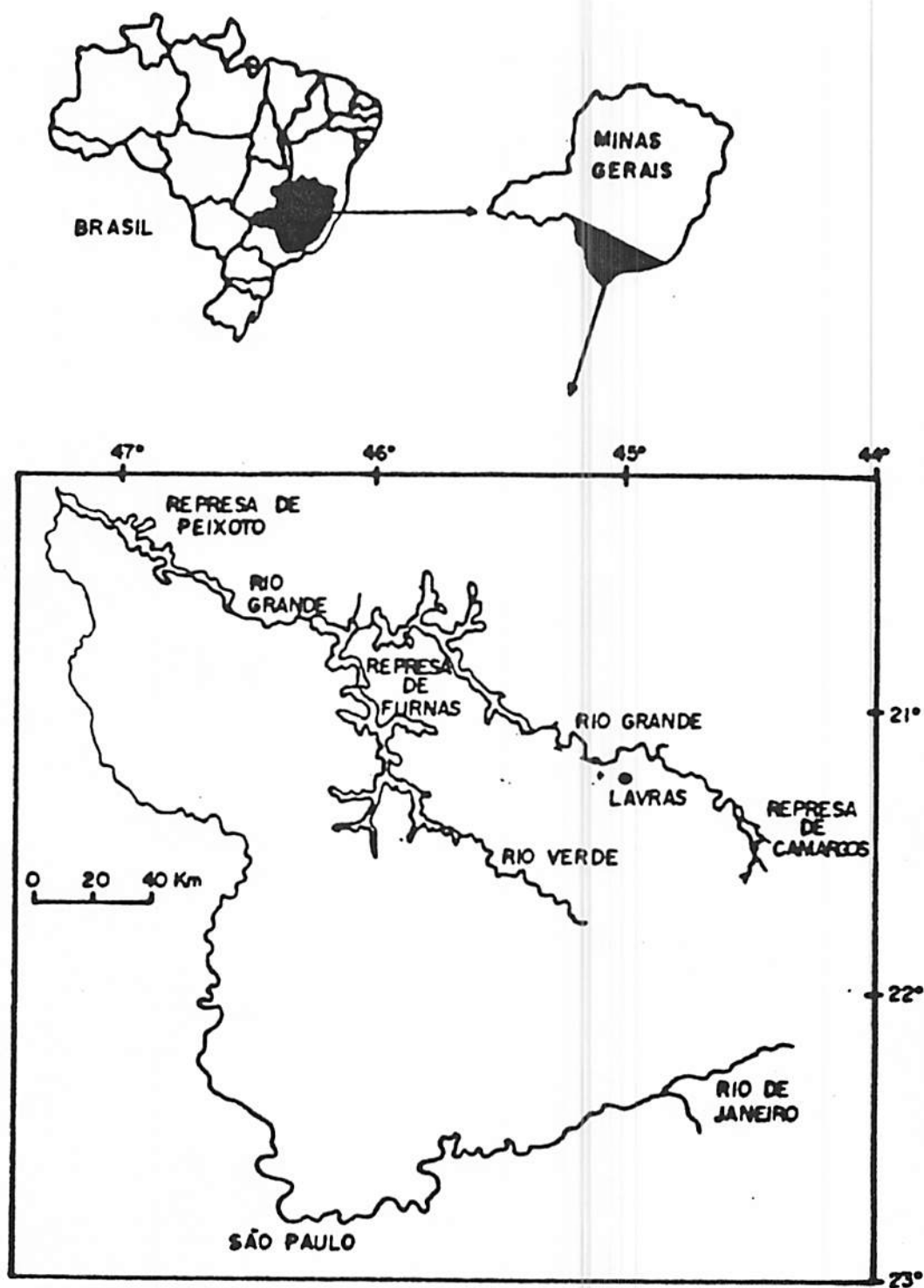


FIGURA 1. Localização do Rio Grande (Perdões - MG), área de dispersão do Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

dois ou quatro, com anteras longitudinalmente deiscentes. O ovário, em regra, é trilocular com um único óvulo em cada lóculo, e os frutos formam uma cápsula trilobulada ou subglobosa (Figuras 2 e 3). As sementes possuem albúmen carnoso e testa lisa e os cotilédones são largos e planos. O sistema radicular é bastante desenvolvido e profundo (Figura 4).

Em *S. schottiana* MUELL. ARG. var. *Schottiana*, as folhas apresentam-se com 10 - 40mm de comprimento e 3,5 - 8mm de largura, enquanto que em *S. schottiana* MUELL. ARG. var. *Angustifolia*, as folhas possuem 40 - 50mm de comprimento e 5 - 6mm de largura.

Assim como outras espécies do gênero, o Sarandi, conforme SMITH et alii (1988), é ainda uma espécie adaptada para resistir às correntezas durante o período de enchentes. No estado de São Paulo, GIBBS & LEITÃO FILHO (1978) verificaram a presença de outra espécie do gênero (*Sebastiania commersoniana*), com frequência de 69% às margens do rio Mogi Guaçu. BERTONI et alii (1982), estudando a composição florística e estrutura fitossociológica de florestas da Reserva de Porto Ferreira (SP), verificaram nítidas diferenças entre as formações vegetais de terra firme e mata ciliar, destacando-se, dentre outras, a espécie *S. commersoniana*, adaptada às condições climáticas da mata ciliar.

Outros pesquisadores (JOLY & CRAWFORD, 1982) estudaram os mecanismos fisiológicos na tolerância de *S. commersoniana*, em relação à inundação. Verificaram que a saturação hídrica do solo induz a uma aceleração da fermentação alcoólica, com um elevado acúmulo de etanol nos tecidos e uma forte indução da atividade da

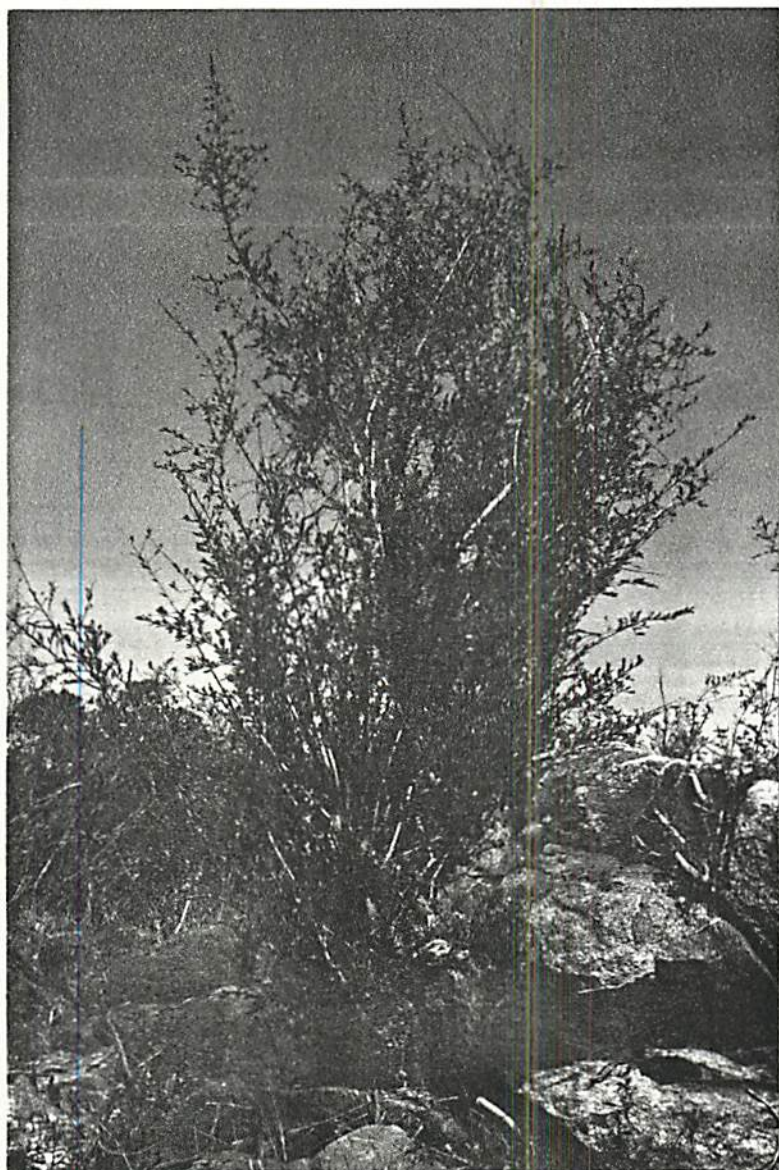


FIGURA 2. Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana), localizada às margens do Rio Grande. ESAL, Lavras - MG, 1993.



FIGURA 3. *Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*. Aspecto geral da planta com detalhes do ramo (A), fruto (B), semente (C) e inflorescência (D). ESAL, Lavras - MG, 1993.

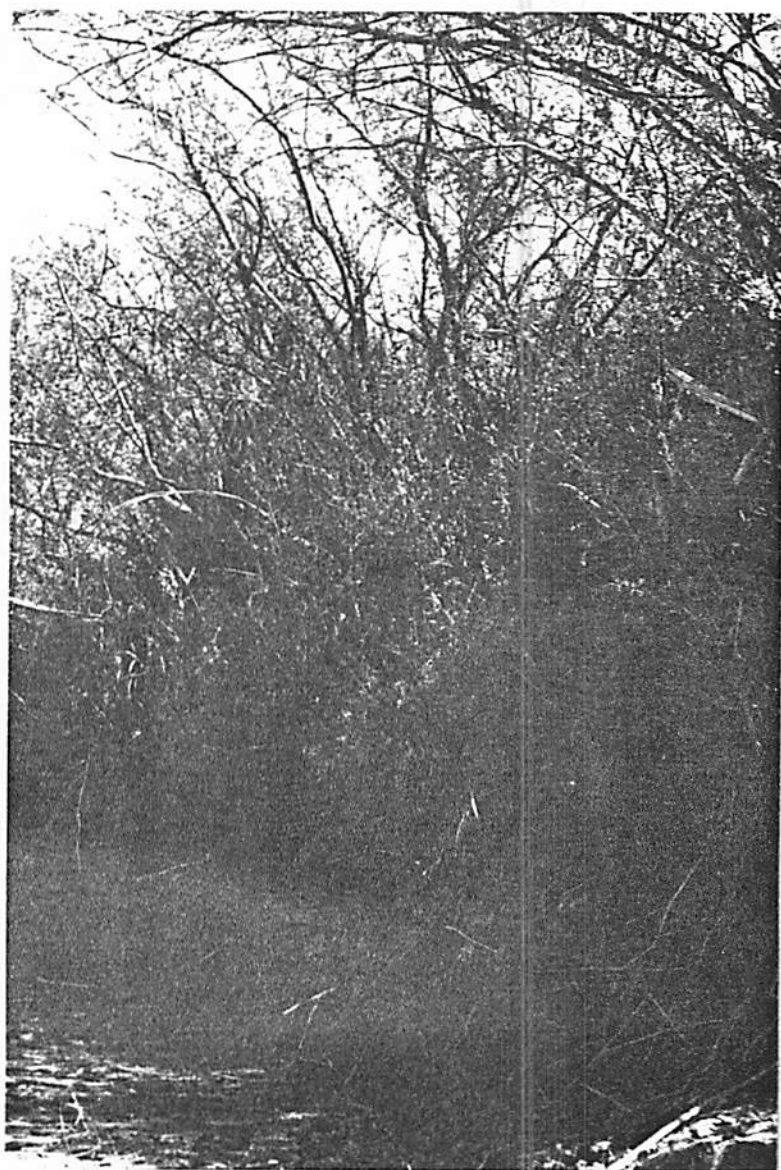


FIGURA 4. Sistema radicular de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

enzima desidrogenase alcoólica. A parte aérea contudo, apresentou crescimento similar em plantas controle e submetidas ao estresse, o mesmo ocorrendo com a morfologia da base do caule.

O Sarandi, ainda segundo SMITH et alii (1988) é uma espécie heliófita, seletiva higrófito, até xerófito, adaptada às condições extremas de umidade ou seca. Essas características oferecem segurança no seu emprego ao controle a erosão de margens de rios bem como na reconstituição de ecossistemas em áreas de inundação de represas. A propagação dessa espécie porém, apresenta problemas quanto à viabilidade das sementes produzidas em função dos diferentes estádios de maturação verificados em cada planta, em condições de campo. Além disso, estudos preliminares, realizados com sementes selecionadas quanto ao aspecto fitossanitário, forneceram baixos percentuais de germinação, caracterizando algum tipo de dormência, o que dificulta ainda mais a produção de mudas a partir de sementes (ALVARENGA, 1991)*.

O objetivo geral desse trabalho portanto, foi tentar viabilizar a propagação dessa espécie, por meio de enraizamento de estacas e microestacas, e através do enraizamento e multiplicação "in vitro", buscando uma metodologia rápida, eficaz e econômica para produção de mudas, visando-se o plantio posterior em áreas de depleção e margens de rios.

* Comunicação pessoal.

**CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE IMERSÃO, DO ÁCIDO
INDOLBUTÍRICO E DO SUBSTRATO NO ENRAIZAMENTO DE
ESTACAS DE SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL.
ARG., var. *Schottiana*)**

RESUMO

As estacas foram coletadas de plantas localizadas às margens do Rio Grande, município de Perdões, MG. O comprimento e o diâmetro foram padronizados em 250 x 8mm, retirando-se todos os ramos laterais. Em seguida, essas estacas tiveram suas bases imersas em solução de ácido indolbutírico (IBA) de diferentes concentrações (0; 1,2; 2,5; 4,9 e 9,8mM) por seis, doze e vinte e quatro horas. Além destes fatores, dois substratos (areia e plantimax) foram testados.

Os resultados obtidos após 60 dias do plantio mostraram que a areia proporcionou maiores peso de matéria fresca e seca de raízes, raio médio de raízes e porcentagem de estacas enraizadas, assim como peso de matéria seca da parte aérea, número de ramos/estaca e relação raiz/parte aérea. Raízes com maior comprimento e peso de matéria fresca e seca foram obtidas com imersão em 4,9mM de IBA. O período de 12 e 24 horas de imersão afetou o comprimento de raízes, quando plantimax foi o substrato

utilizado. A porcentagem de estacas enraizadas, o número de ramos/estaca, peso de matéria fresca e seca da parte aérea diminuíram também com 12 e 24 horas de imersão. A análise dos nutrientes minerais das estacas enraizadas mostrou correlação negativa dos elementos P, Ca, Mg, S, B e Zn no enraizamento das estacas, ou seja, menores teores foram observados nos melhores tratamentos. O Fe apresentou correlação positiva com o enraizamento.

2.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO

A propagação vegetativa através do uso de estacas é uma técnica agrônômica antiga sendo muito empregada devido a facilidade e rapidez na execução. No entanto, a capacidade de enraizamento em algumas espécies é inferior devido a componentes bioquímicos da própria planta, como também às condições ambientais em que estão submetidas.

As diferenças genéticas da capacidade de enraizamento, segundo HAISSIG (1986), podem estar relacionadas com a atividade de enzimas específicas. O número de genes e vias metabólicas não são conhecidos, apenas sabe-se que não necessariamente os mesmos genes são responsáveis pelo processo de rizogênese (HAISSIG & RIEMENSCHNEIDER, 1988). MILLER et alii (1982), avaliando fatores no enraizamento de *Abies fraseri* (Pursh) Poir, verificaram pronunciada variação genotípica em relação ao número de estacas enraizadas, número e comprimento de raízes. A diferença genética do enraizamento entre cultivares de abacateiro foi relatada por REUVENI & RAVIV (1981), que as classificou em grupos de fácil e

difícil enraizamento. CARTER (1984), estudando o enraizamento de diferentes clones de *Larix laricina* (DU ROI) K. Koch., observou grande diferença na porcentagem de enraizamento, variando de 23 até 93%.

DEOL et alii (1983) mostraram a influência do tamanho da estaca no enraizamento de *Populus ciliata* Walh, em que foram testados diferentes diâmetros (10, 14 e 18mm) e comprimentos (150, 225 e 300mm). Os maiores números e comprimentos de raízes foram obtidos em estacas de 18 x 300mm, porém sem diferença significativa para dimensões de 14 x 225mm que são recomendadas pelos autores. MILLER et alii (1982) verificaram que o comprimento (100 - 260mm) de estacas de *Abies fraseri* não afetou o percentual de enraizamento, mas proporcionou maior número de raízes em estacas maiores.

A influência da idade da planta matriz foi estudada por CARTER (1984), entre árvores de *Larix laricina* (DU ROI) K. Koch., com idade entre 19 e 41 anos. A capacidade de enraizamento nessa espécie não apresentou correlação com a idade da planta matriz. O enraizamento de *Eucalyptus gunnii* Hook, de acordo com CURIR et alii (1990), apenas ocorre em tecidos jovens devido às alterações fisiológicas em tecidos com maior idade, tal como o acúmulo de substâncias fenólicas (flavonóides), relacionadas com a perda do potencial de enraizamento.

KLING et alii (1983) estudaram o efeito de compostos fenólicos na iniciação do enraizamento de *Phaseolus aureus*, *Acer saccharinum* e *Acer griseum*. Os compostos testados foram catecol, pirogalol, ácido salicílico e tanínico, sendo que a combinação de

catecol com IAA proporcionou nas três espécies maior número de raízes.

GASPAR & HOFINGER (1988) citam a especificidade das auxinas na promoção do enraizamento. Conforme esses autores, ocorre uma variação endógena de auxinas livres e conjugadas durante a rizogênese incluindo anabolismo, catabolismo e conjugação.

O tratamento de espécies de difícil enraizamento através da aplicação de auxinas apresenta vantagens como o aumento da porcentagem de enraizamento, antecipação da indução e aumento do número, qualidade e uniformidade das raízes.

O ácido indolilacético (IAA) é a auxina natural mais encontrada nas plantas, tanto na forma livre como conjugada. A partir de sua descoberta, testes com os análogos tais como ácido indolbutírico (IBA) e ácido naftalenacético (NAA) comprovaram o grande efeito na promoção do enraizamento, sendo denominados de auxinas sintéticas. Mais tarde outros compostos como o 2,4-D e 2,4,5-T foram também incluídos neste grupo.

As diferenças na eficácia das auxinas tem sido verificadas em muitas espécies. KUMAR (1989) comparou o efeito de IAA, IBA e NAA de forma isolada ou em combinação (aos pares), nas concentrações de 50 e 100mg.L⁻¹ em estacas de *Butea monosperma*. Constatou que o melhor tratamento partiu da combinação de NAA e IBA em 100mg.L⁻¹. Outro teste comparativo envolvendo IAA, NAA, IBA e 2,4-D foi realizado por GUPTA et alii (1989) em *Melia azedarach* L. Os autores concluíram que esta espécie enraizou melhor nos tratamentos onde IAA e IBA foram utilizados. HOSTALÁCIO et alii (1977) testaram a eficácia do NAA e IBA no

enraizamento de mimó de vênus (*Hibiscus rosa sinensis*) e três maríais (*Bougainvillea spectabilis*). A primeira espécie citada enraizou após imersão em solução contendo 0,98mM de IBA enquanto a segunda foi induzida após tratamento com 0,54mM de NAA.

O ácido indolbutírico (IBA) é citado com frequência em trabalhos de propagação vegetativa por estaquia, devido principalmente a sua estabilidade, maior espectro de ação em diferentes espécies e menor fitotoxidez em plantas lenhosas (PROEBSTING, 1984). ABEDINI & MORLATS (1988) enraizaram estacas de diferentes genótipos de *Eucaliptus camaldulensis* Dehn. após tratamento com 9,8mM de IBA. Em urucum (*Bixa orellana*), segundo SÃO JOSÉ et alii (1992), o enraizamento de estacas foi obtido quando tratadas com 0,49 a 0,98mM dessa auxina. HAISSIG (1979) demonstrou que P-IBA e P-IBT (arilésteres) e NP-IBA (anilamida) foram mais efetivos no enraizamento de *Pinus banksiana* Lamb. devido à menor toxidez desses compostos.

As bases fisiológicas dessas diferenças, como no caso da reduzida indução pelo IAA comparado ao NAA e IBA são atribuídas, segundo LEOPOLD & KRIEDEMANN (1975), aos diversos mecanismos metabólicos que a planta possui para reduzir ou anular os efeitos do IAA, através de conjugação e/ou destruição. Além disso, o IAA apresenta problemas na sua estabilidade com o efeito da luz.

Diferentes técnicas tem sido empregadas na aplicação de auxinas; a partir de misturas de talco e auxina, imersão em solução diluída e em solução concentrada.

As misturas de talco e auxina são de fácil aplicação e baixa disponibilidade de formulações são disponíveis no mercado,

entretanto, o custo é elevado. É necessário umedecer a base das estacas para que a mistura fique aderida.

Em soluções diluídas, as bases das estacas permanecem em imersão por diferentes períodos sendo lavadas antes do plantio. Apresenta a desvantagem de ser um método mais demorado, onde o ambiente pode alterar a absorção durante a imersão.

O método mais comum no entanto, é a rápida imersão em soluções concentradas de auxinas. Como vantagem é citada a rapidez e uniformidade dos resultados (BLAZICH, 1988).

BONAMINIO (1984) comparou diferentes métodos de aplicação em *Ilex crenata* cv. Convexa demonstrando a superioridade na utilização de soluções concentradas, em relação à mistura de talco e auxina. Também em *Pinus strobus*, STRUVE & BLAZICH (1982) compararam o enraizamento em estacas a partir de vários métodos de aplicação de auxinas. Concluíram que, para essa espécie, não há um método superior pois a resposta foi dependente de cada clone em estudo.

A fitotoxidez das auxinas foi observada por SÃO JOSÉ et alii (1992) em estacas de urucum após imersão em solução contendo 1,97mM de IBA, durante um período de doze horas. Esse é apenas um exemplo em que se observa uma relação inadequada entre a concentração da solução e tempo de imersão. IGBOANUGO (1987) procurou determinar uma relação adequada desses fatores na propagação por estaquia em três espécies de *Eucaliptus* (*E. cloeziana*, *E. tereticornis* e *E. grandis*). Os períodos de imersão testados foram três, seis, doze e vinte e quatro horas em soluções contendo 0,12; 0,25; 0,37 e 0,49mM de IBA. O autor verificou que em todas as espécies, a concentração de 0,12mM

proporcionou bom enraizamento, sendo que após seis ou doze horas, houve um decréscimo, não ocorrendo em tratamentos com vinte e quatro horas de imersão.

Os substratos como meio de enraizamento também influenciam a propagação por estacas, determinando a arquitetura do sistema radicular e o estado nutricional das plantas (SPURR & BARNES, 1973). São características desejáveis, a firmeza, o volume razoavelmente constante quando seco ou úmido, a capacidade de retenção de umidade, a porosidade para facilitar drenagem e aeração, o baixo nível de salinidade e a disponibilidade de nutrientes (HARTMANN & KESTER, 1975).

O substrato comercial denominado Plantimax, composto de vermiculita e casca de *Pinus* moída, compostada e enriquecida, proporcionou melhores características de fertilidade e teores de nutrientes no peso da matéria seca total em limoeiro 'Cravo' (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Cravo) conforme LIRA (1990). Quando o mesmo composto foi utilizado na formação de mudas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera Rio, em diferentes formulações com solo, areia, bagaço de cana, vermiculita e húmus de minhoca, não verificou-se diferenças significativas (TOLEDO, 1992).

As condições de ambiente em casa de vegetação que afetam o enraizamento de estacas como temperatura do ar e do substrato, umidade e radiação, são discutidos minuciosamente em várias espécies por LOACH (1988).

A participação de macro e micronutrientes no processo de rizogênese pode ser analisada em duas fases distintas, ou seja, na indução dos primórdios radiculares e em seus desenvolvimentos (BLAZICH, 1988).

O nitrogênio, fósforo e potássio foram avaliados por Haun & Cornell (1951), citado por BLAZICH (1988), na indução ao enraizamento de gerânio em substratos com baixo, médio a altos teores, em combinação, desses nutrientes. A maior porcentagem de enraizamento foi a partir de substratos com baixo e médio teor de nitrogênio. Esse nutriente mostrou ter maior influência que P e K na resposta ao enraizamento, embora o P e o K tenham demonstrado resposta positiva em algumas combinações. A mobilização de P em estacas de crisântemo foi verificada na fase de iniciação por Good & Tukey citados por BLAZICH (1988).

BLAZICH et alii (1983) estudaram a influência da aplicação do ácido indolbutírico (IBA) na mobilização de minerais durante a propagação de *Ilex crenata* Thunb. Os nutrientes N, P, K, Ca e Mg não apresentaram diferenças nos teores na fase de iniciação dos primórdios. Após este período, esses nutrientes foram redistribuídos para as folhas e região de enraizamento, sendo que N, P e K foram mais mobilizados em tecidos tratados com IBA.

Estacas de 10 diferentes cultivares de abacateiros (*Persea americana* Mill.) apresentaram, segundo REUVENI & RAVIV (1981), correlação negativa entre manganês (Mn) e o enraizamento, já que estacas de cultivares consideradas de difícil enraizamento apresentaram altos teores de manganês e vice-versa. Os autores sugeriram que esse nutriente atua no sistema IAA-oxidase, diminuindo os níveis endógenos de auxina e conseqüentemente o enraizamento. Em videira, a fertilização com Zn aumentou a porcentagem de estacas enraizadas, o que ocorreu também associado

ao aumento dos níveis de triptofano (Sanish & Spiegel, 1958 citados por BLAZICH, 1988).

No período de crescimento do sistema radicular em gerânio, a variação dos teores de P e K na base das estacas, não foi significativa (Haun & Cornell, 1951 citados por BLAZICH, 1988). O crisântemo, nessa mesma fase, apresentou mobilização de P para a região de enraizamento (Good & Tukey, 1967 citados por BLAZICH, 1988).

A influência do Ca, apesar de sua baixa mobilidade e presença em pequenos teores no floema, está relacionada à regulação do crescimento. HASENSTEIN & EVANS (1988) afirmam que o Ca é um importante componente do modo de ação das auxinas na inibição do crescimento das raízes, de forma que o aumento de sua concentração citoplasmática causa inibição enquanto que a diminuição do Ca disponível leva ao crescimento propriamente dito. LEONARD & HEPLER (1990) associam esse nutriente com a formação de pontes unindo estruturas proteicas, originando complexos denominados camoldulina (CaM) que possuem função regulatória.

O B é um nutriente frequentemente mencionado em trabalhos com enraizamento. JARVIS et alii (1984) estudando a interação entre B e auxinas em *Phaseolus aureos* Roxb., observaram que estacas tratadas com altas concentrações de B, o número de raízes foi menor quando os tecidos foram imediatamente após, tratados com auxina. O autor sugere que esse nutriente controla a atividade do sistema IAA oxidase determinando a concentração de auxina em primórdios radiculares. Todavia, em estacas de Camélia (*Camellia japonica* L.), ONO et alii (1992) verificaram que

tratamentos com IBA e B estimularam melhor desenvolvimento das raízes. O efeito benéfico do B no enraizamento é mencionado por LEWIS (1980), devido ao controle da permeabilidade de membranas, transporte de açúcares e de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, fenóis, ligninas, auxinas e ácidos nucleicos.

CLARKSON & HANSON (1980) citam a participação do Fe com reações redox como agentes redutores (ferredoxinas), oxidases (citocromo oxidase), peroxidases (catalase e peroxidase) e em reações de transferência de elétrons (citocromo b e c).

O Sarandi, espécie estudada neste trabalho, tem uma importância fundamental no repovoamento de margens de rios e represas, portanto é de interesse a sua propagação. No entanto, a produção de mudas a partir de sementes é dificultada pela baixa germinação e, através da propagação vegetativa não foram, até o momento, realizados trabalhos com esta espécie.

Em função do exposto, e com base em estudos de enraizamento de estacas em diferentes espécies, procurou-se viabilizar a propagação vegetativa do Sarandi através da escolha de substrato adequado e tempo de imersão em solução contendo diferentes níveis de IBA como pré-tratamento das estacas, bem como avaliar a participação de macro e micronutrientes no processo de rizogênese.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

As estacas foram coletadas de plantas matrizes distribuídas às margens do Rio Grande, no município de Perdões (MG), em novembro de 1991.

A poda dos ramos "de ano" partiu de aproximadamente 500mm do ápice mantendo-se as ramificações. Após a coleta, realizou-se a toilette das estacas, eliminando-se todos os ramos laterais. Simultaneamente efetuou-se a padronização em comprimento ($250\text{mm} \pm 20\text{mm}$) e diâmetro ($0,8\text{mm} \pm 0,2\text{mm}$). Nessa etapa, retirou-se pequenos "toletes" (20mm) da parte basal e apical para análise mineral anterior aos tratamentos.

O experimento foi instalado em casa de vegetação no Departamento de Agricultura da ESAL. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo, cada tratamento, constituído por quatro parcelas de quatro estacas cada. O esquema fatorial $2 \times 3 \times 5$ envolveu respectivamente, os fatores substrato, tempo de imersão e concentração de IBA.

Os substratos utilizados foram areia fina e o produto comercial Plantimax. Antes do plantio, porém, mantiveram-se as estacas em sala com temperatura ambiente e luminosidade natural com a parte basal em imersão por períodos de seis, doze e vinte e quatro horas em solução de ácido indolbutírico (1,2; 2,5; 4,9 e 9,8mM) e testemunha (sem IBA).

O plantio das estacas foi em profundidade de 100mm nos substratos de enraizamento, acondicionados em sacos de polietileno com volume de 0,6L, protegidas com sombrite 50% e mantidas em ambiente com temperatura e umidade controlados.

Após 60 dias, avaliou-se o peso de matéria fresca das raízes e parte aérea, bem como o número de ramos por estaca e porcentagem de enraizamento. A parte aérea após a pesagem, foi levada à estufa a 70°C até peso constante. As raízes foram acondicionadas em sacos plásticos contendo solução de etanol 50%

e armazenadas a 0°C, conforme BOHM (1979). Com uma amostra de 0,5 g, determinou-se o comprimento e raio médio de raízes a partir do método descrito por TENNANT (1975) com base na seguinte equação:

$$C = N \cdot f_c \quad \text{em que:}$$

C = comprimento radicular;

N = número de intersecções;

f_c = fator de correção (variável conforme área dos quadrantes da grade utilizada. Nesse caso, 1 cm² foi a área com f_c de 0,7857).

O raio médio de raízes foi determinado segundo SHENK & BARBER (1979), pela equação:

$$r = \sqrt{mf/c \cdot \pi}$$

$$r = (mf/c \cdot \pi)^{0,5}$$

onde r é raio médio, mf o peso da matéria fresca e c o comprimento radicular.

Posteriormente a essas determinações, as raízes foram levadas à estufa a 70°C até atingirem peso constante. A relação raiz/parte aérea foi calculada a partir do peso de matéria seca.

De estacas enraizadas e não enraizadas foram tomadas amostras de segmentos basais e apicais (20mm), antes e após o plantio, os quais foram secos em estufa a 70°C até atingirem peso constante, e em seguida, moídos. Após a homogeneização das amostras, retiraram-se sub-amostras para análise mineral (N, P,

K, Ca, Mg, B, Cu, Zn, Fe e Mn) realizada no Laboratório de Ciência do Solo da ESAL.

As médias das características avaliadas foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) para o fator substrato, sendo que para o tempo de imersão e concentração de IBA, as médias foram analisadas através de regressão polinomial.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Porcentagem de enraizamento

O fator substrato e a interação dos fatores tempo de imersão e concentração de IBA influenciaram a porcentagem de enraizamento. Conforme Figura 05, 53% em média das estacas enraizaram em areia e 32% em plantimax. Essa diferença sugere que a temperatura do substrato tenha sido importante no enraizamento. O substrato plantimax, com temperaturas mais elevadas, induziu o desenvolvimento de brotações precoces, antecedendo ao enraizamento. Conforme LOACH (1988), temperaturas fora da faixa ideal para o enraizamento, levam a retomada de crescimento das gemas e conseqüentemente das brotações, competindo com a região basal das estacas, dificultando ou impedindo a formação de raízes. Quando o enraizamento não ocorreu, essas brotações logo secavam levando à morte. A maior porcentagem de enraizamento (69,77%) foi no entanto, obtida quando as estacas permaneceram por seis horas em solução contendo 4,9mM de IBA, mostrando que a concentração endógena do fitohormônio alcançou nível ótimo para o processo de rizogênese após esse tratamento exógeno. Prolongando-

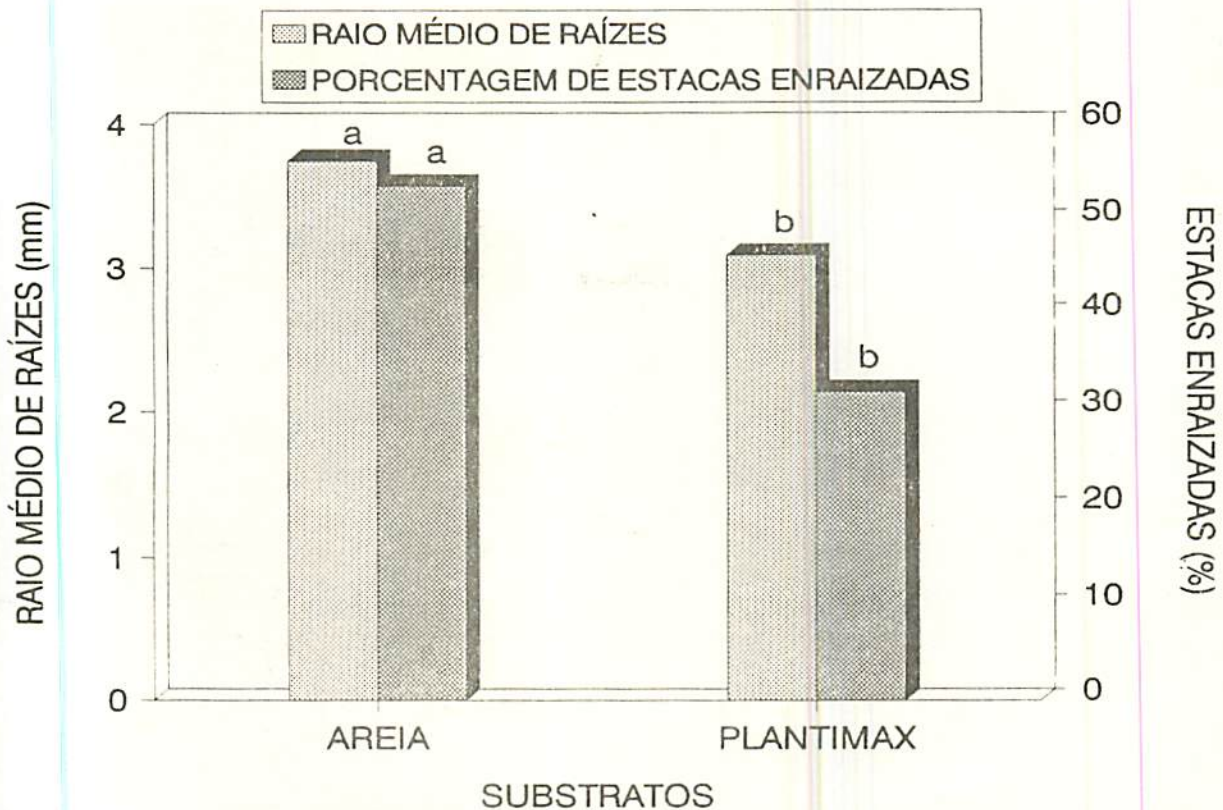


FIGURA 5. Efeito do substrato sobre a porcentagem de estacas enraizadas e raio médio de raízes em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

se o período de imersão para 12 horas, mantendo-se a mesma concentração, verificou-se um efeito tóxico devido à maior absorção do regulador de crescimento, sendo a melhor porcentagem de enraizamento alcançada na metade da concentração (2,5mM). Os resultados mostram ainda que o IBA não deve ser usado nas concentrações adotadas se as estacas permanecerem 24 horas em imersão. Neste caso, quanto mais concentrada for a solução, menor será a porcentagem de enraizamento (Figura 6). SÃO JOSÉ et alii (1992) também verificaram que a toxidez do IBA em estacas de Urucum ocorreu após doze horas de imersão. IGBOANUGO (1987), da mesma forma verificou em três espécies de *Eucaliptus* um

decréscimo após 12 horas de imersão, não ocorrendo em 24 horas. Quando as estacas permaneceram por 24 horas em água destilada, apresentaram em média 48% de enraizamento e portanto, superior em relação a 6 e 12 horas sem IBA, as quais alcançaram apenas 39 e 28%, respectivamente. Esses resultados sugerem que a região basal da estaca não foi afetada pelo aumento do período anóxico (imersão em água), pelo contrário, pode ter contribuído para maior hidratação dos tecidos e/ou exsudação de compostos fenólicos que atuariam na oxidação de IAA endógeno, conforme LEE et alii (1980).

$$Y1: 0,945683 + 0,0599565X - 0,00607713X^2 \quad R^2 = 0,9239$$

$$Y2: 0,888887 + 0,1511716X - 0,00277650X^2 \quad R^2 = 0,9439$$

$$Y3: 0,990892 - 0,0194243X \quad R^2 = 0,8138$$

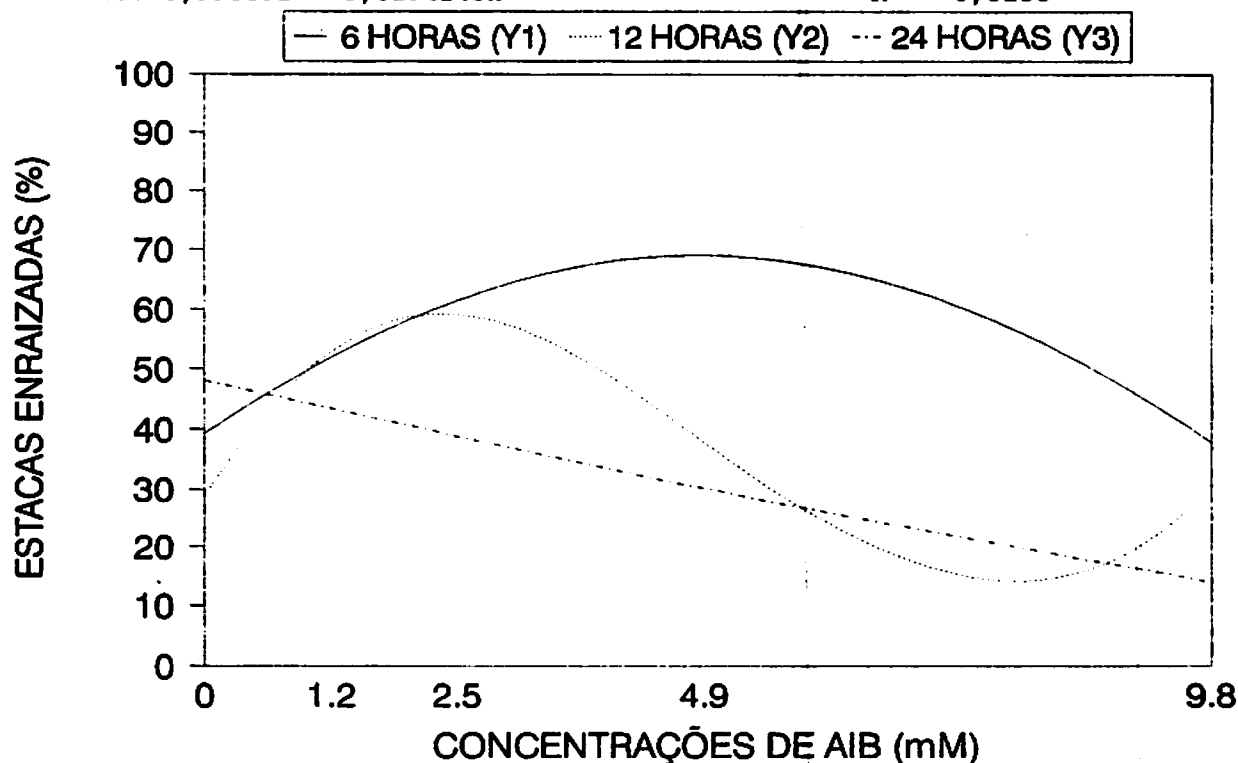


FIGURA 6. Efeito do tempo de imersão em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) sobre a porcentagem de estacas enraizadas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

2.3.2. Comprimento de raízes

Os resultados do comprimento de raízes ocorreram em função da interação entre substrato e tempo de imersão e do efeito isolado do ácido indolbutírico (IBA). De acordo com a Figura 7, observa-se que, quando a areia foi utilizada como substrato não houve diferença significativa entre as médias de comprimento após seis, 12 e 24 horas de imersão. Em plantimax, o comprimento da raiz foi reduzido significativamente após o pré-tratamento de 12 e 24 horas de imersão em qualquer uma das soluções. GILL & MILLER (1956) verificaram que o alongamento das raízes de milho cessou quando a concentração de oxigênio em um meio artificial foi menor que 1%. Neste trabalho, observamos que o comprimento de raiz demonstrou uma redução em plantimax, provavelmente como resultado de uma interação entre a disponibilidade de oxigênio na solução de indução ao enraizamento e em seguida, no substrato. Presume-se que após 12 ou 24 horas de imersão, as estacas necessitam de um suprimento adequado de oxigênio para formarem raízes com o mesmo comprimento que em seis horas de imersão, o que ocorreu no substrato areia.

Além da disponibilidade de oxigênio, a maior temperatura em plantimax pode também ter contribuído para a redução dessa característica.

Assim como para as características anteriores, a Figura 8 mostra que o comprimento das raízes nas estacas foi superior quando tratadas com 4,9mM de IBA.

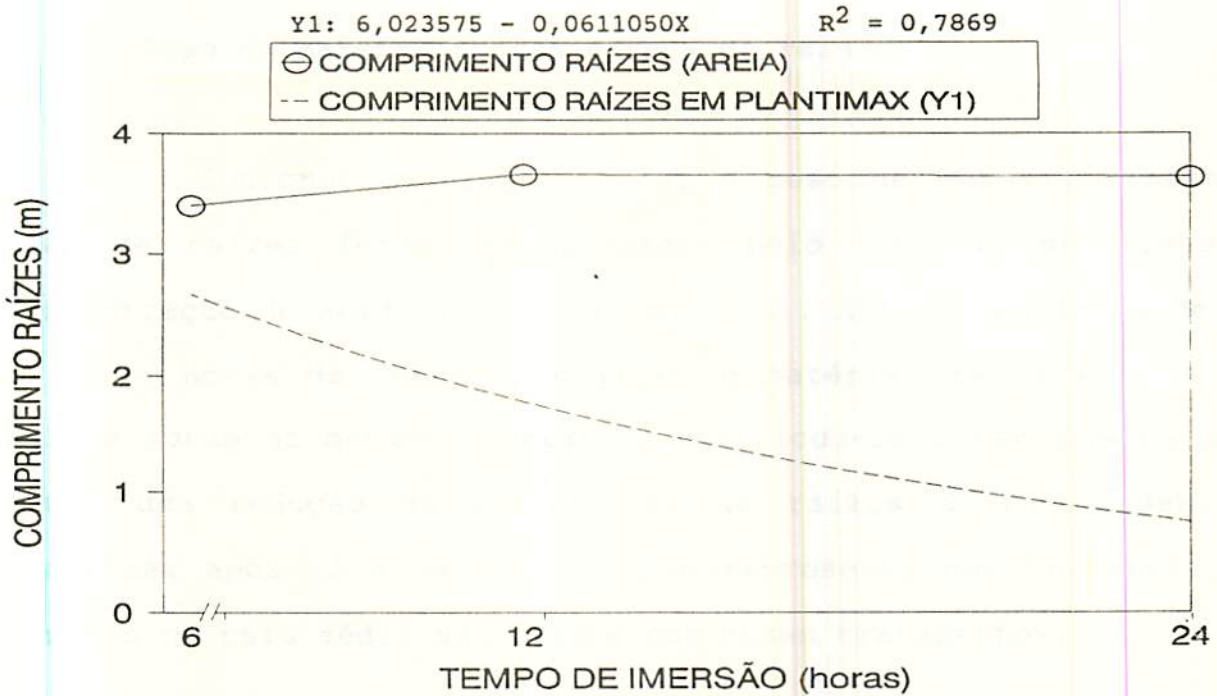


FIGURA 7. Efeito do tempo de imersão em solução de ácido indolbutírico (IBA) sobre o comprimento médio de raízes em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

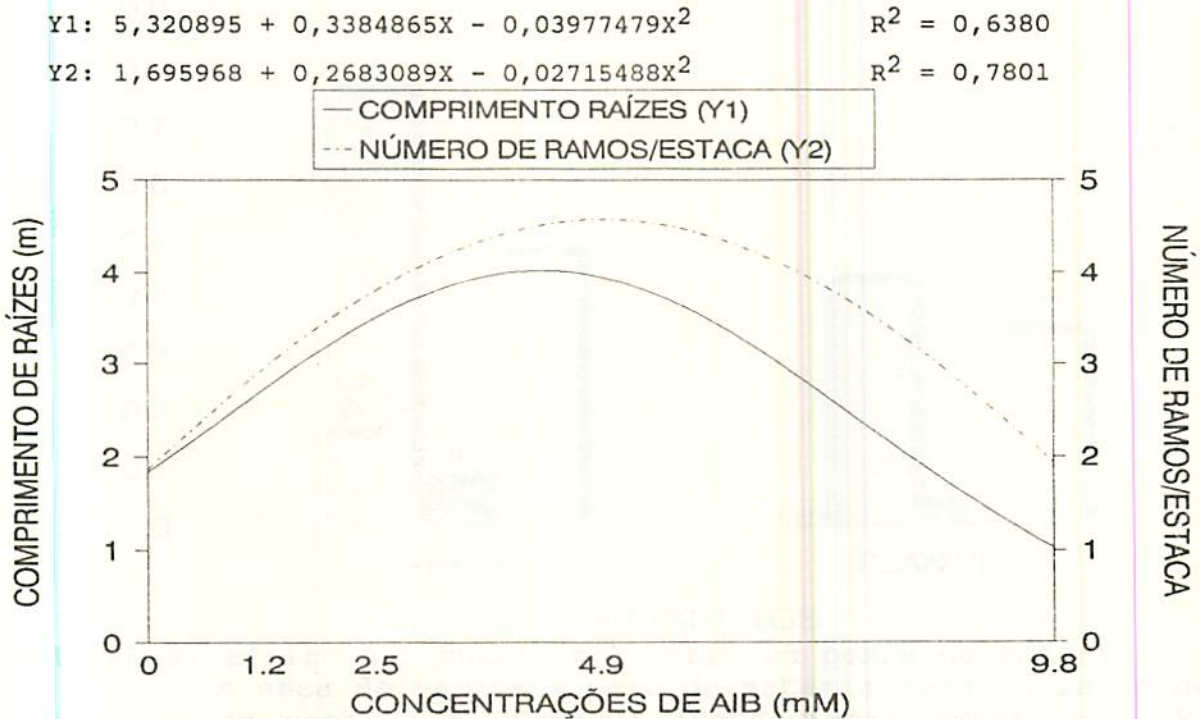


FIGURA 8. Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) no comprimento médio de raízes e número de ramos/estaca em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) após seis horas de imersão. ESAL, Lavras - MG, 1993.

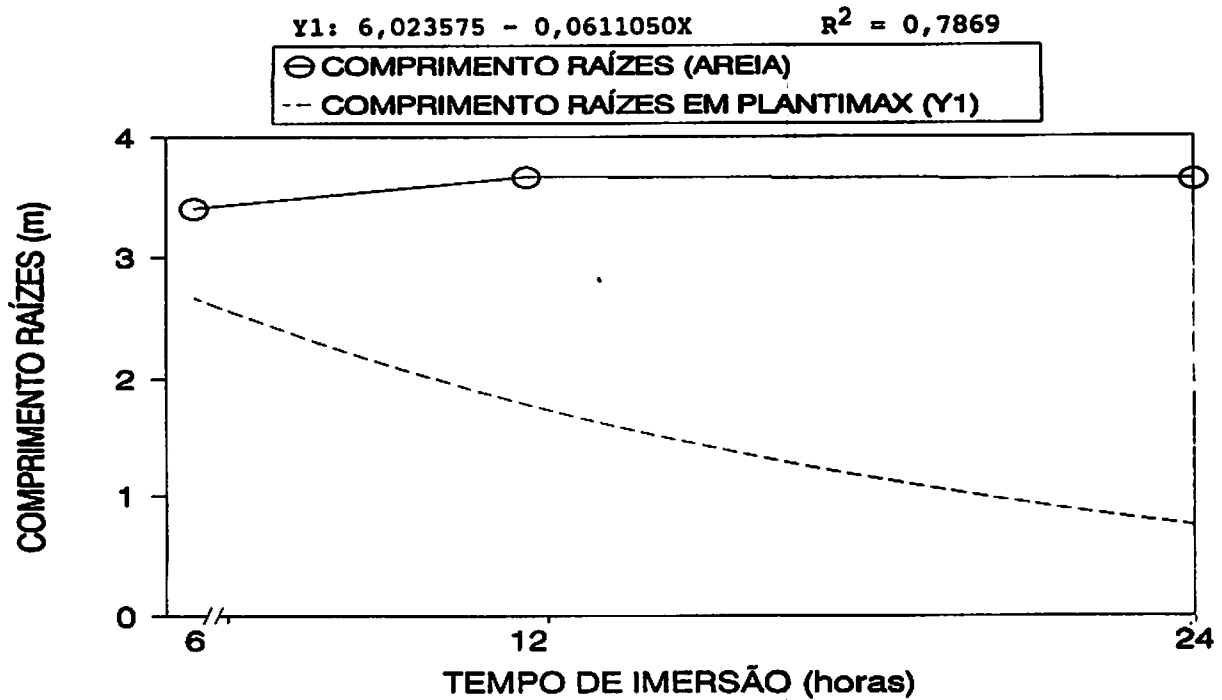


FIGURA 7. Efeito do tempo de imersão em solução de ácido indolbutírico (IBA) sobre o comprimento médio de raízes em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

Y1: $5,320895 + 0,3384865X - 0,03977479X^2$ $R^2 = 0,6380$
 Y2: $1,695968 + 0,2683089X - 0,02715488X^2$ $R^2 = 0,7801$

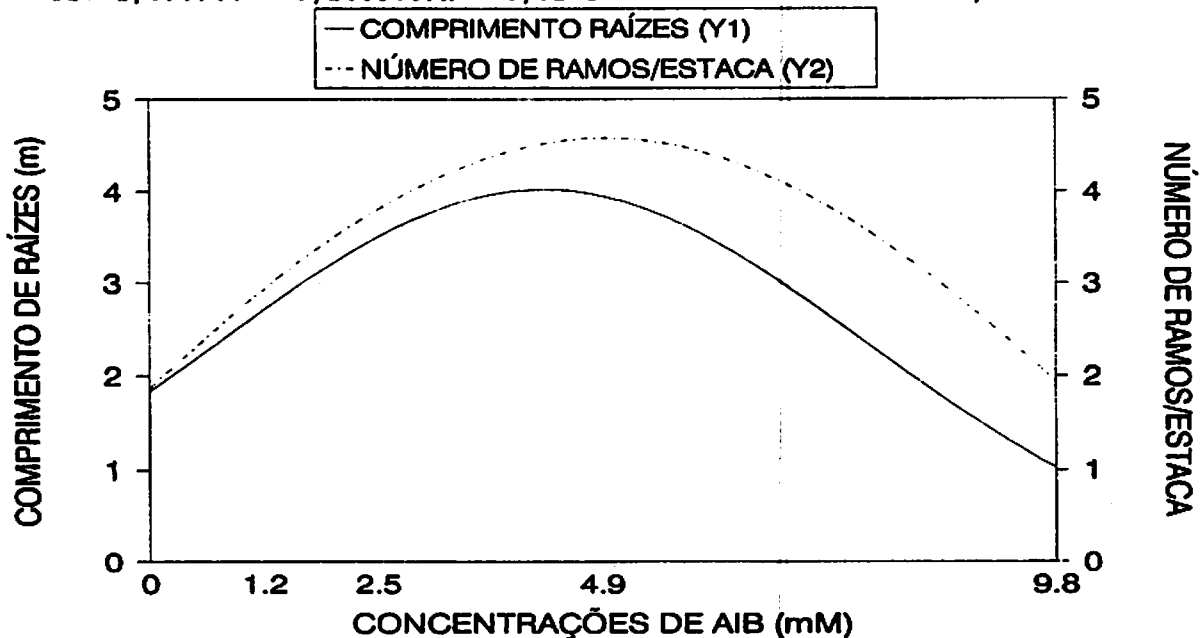


FIGURA 8. Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) no comprimento médio de raízes e número de ramos/estaca em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) após seis horas de imersão. ESAL, Lavras - MG, 1993.

2.3.3. Peso da matéria fresca e seca de raízes

Conforme Figuras 9 e 10, o peso de matéria fresca e seca de raízes foram influenciados pelo tipo de substrato e concentração de ácido indolbutírico (IBA). Após os períodos de 6, 12 e 24 horas de imersão, o peso de matéria fresca e seca de raízes foram os mesmos. Portanto, verificou-se anteriormente que houve uma redução no comprimento de raízes desenvolvidas em plantimax após 12 e 24 horas o que representa uma tendência de aumento no raio médio das raízes sob esses tratamentos.

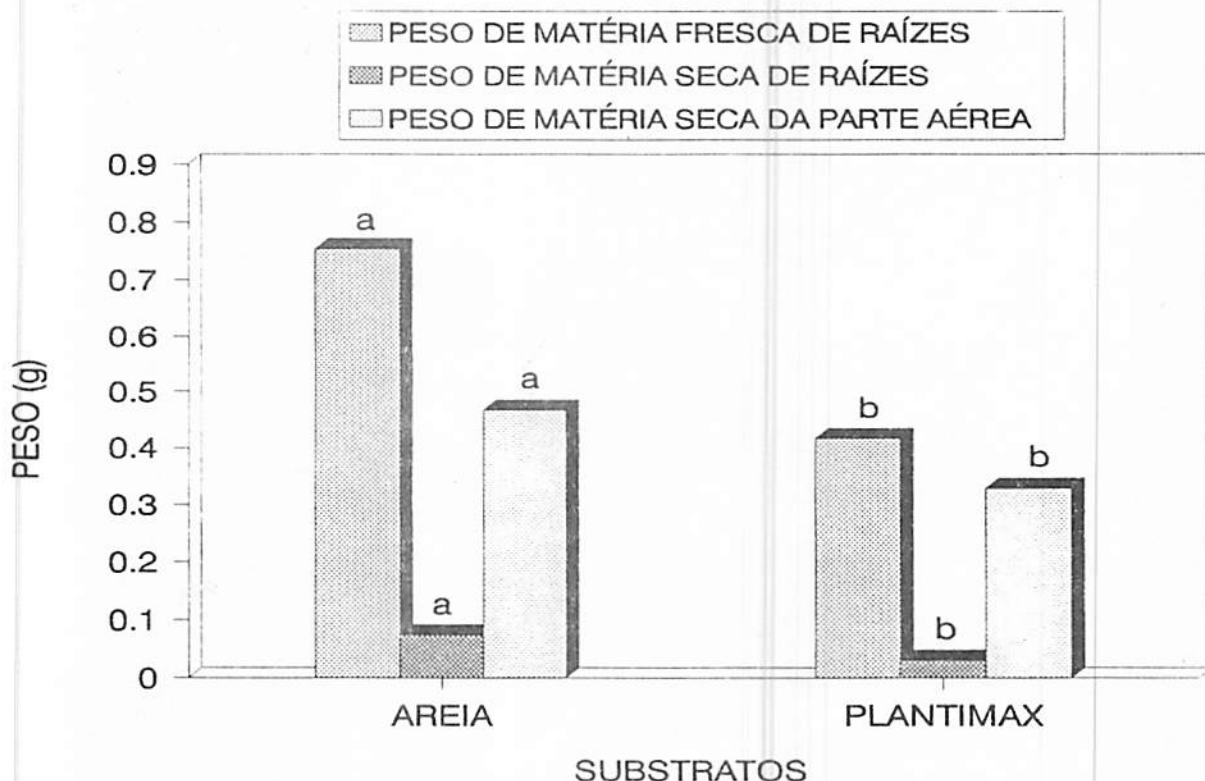


FIGURA 9. Efeito dos substratos sobre os pesos de matéria fresca e seca de raízes e peso de matéria seca da parte aérea em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

Y1: 0,957750 + 0,0799825X - 0,00834660X²
 Y2: 0,732644 + 0,0102625X - 0,00105112X²

R² = 0,7073
 R² = 0,6906

— PESO DE MATÉRIA FRESCA (Y1)
 — PESO DE MATÉRIA SECA (Y2)

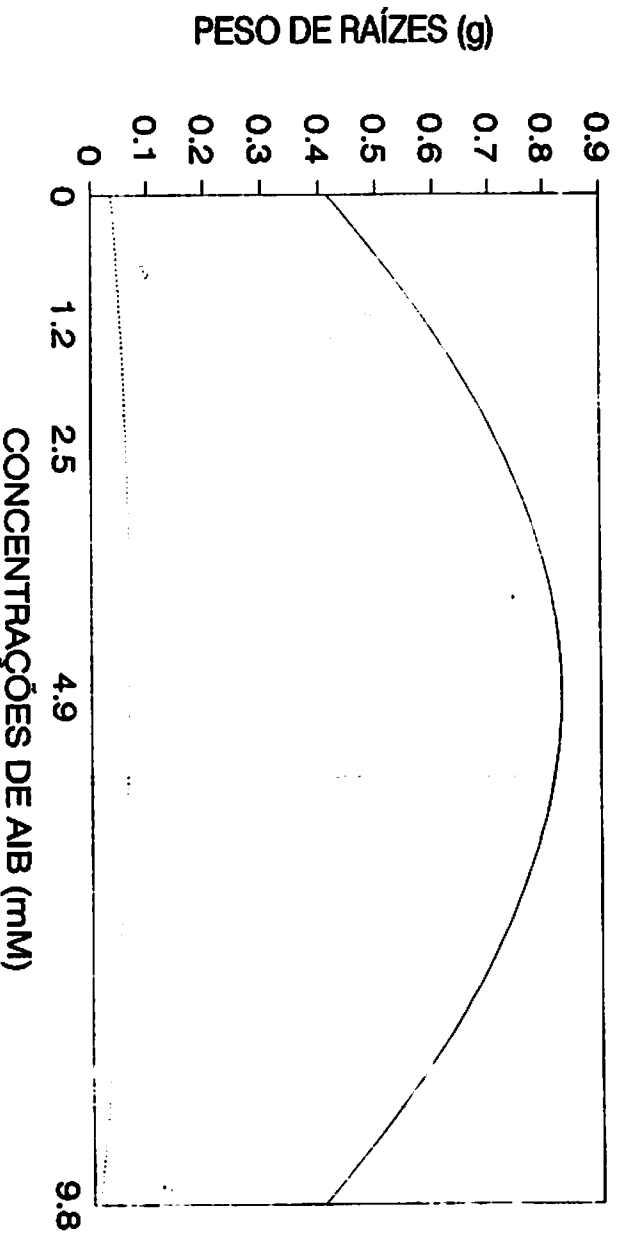


FIGURA 10. Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) nos pesos de matérias fresca e seca de raízes em estacas de Sarandi (Sebastiania schottiana MUELL. ARG., var Schottiana). ESAL, Lavras - MG, 1993.

Além da disponibilidade de oxigênio, a maior temperatura em plantimax pode também ter contribuído para a redução dessa característica.

O enraizamento em substrato areia comparado ao plantimax, proporcionou em média, maior peso da matéria fresca (80,31%) e seca (137,42%) de raízes. A matéria seca de raízes produzidos em areia representou 9,91% em relação ao peso total da matéria fresca enquanto que em plantimax foi de apenas 7,53%. Apesar da provável superioridade da fertilidade do plantimax, outros fatores além deste parecem ter influenciado negativamente as médias de peso (fitotoxidez, porosidade, pH), resultando num melhor desenvolvimento de raízes em areia.

O pré-tratamento com IBA na concentração de 4,9mM foi responsável pelo maior peso de matéria fresca (0,82g) e seca (0,07g) de raízes. Na Figura 10, verifica-se porém que a diferença entre o peso das raízes obtido a 4,9mM e 2,5mM, foi de 0,82 para 0,71g na matéria fresca e de 0,07 para 0,064g na matéria seca. A fitotoxidez do regulador de crescimento em relação ao peso das raízes foi verificada pela redução do peso praticamente à metade quando se utilizou concentração de 9,8mM, sendo até inferior ao peso de estacas que apenas foram imersas em água destilada sem regulador.

2.3.4. Raio médio e relação raiz/parte aérea

O substrato foi o único fator responsável por diferenças significativas no raio médio de raiz e relação raiz/parte aérea.

A Figura 5 mostra que o maior raio médio foi obtido em raízes que se desenvolveram em areia. Características como maior tamanho dos poros, umidade e temperatura podem ter favorecido o crescimento nessa condição. Conforme TAYLOR (1974), o impedimento mecânico normalmente causa um aumento no diâmetro de raízes o que pode ter acontecido neste trabalho, tendo em vista que, apesar da maior porosidade do substrato areia, esse apresenta maior densidade levando ao aumento da pressão de crescimento axial e radial das raízes e conseqüente aumento do raio médio. A porosidade por sua vez, contribui para maior aeração e drenagem (HARTMANN & KESTER, 1975), que são condições desejáveis ao melhor

desenvolvimento do sistema radicular com aumento do raio médio, conforme observado em areia.

As médias da relação raiz/parte aérea são mostradas na Figura 11. Em areia foram obtidas as maiores médias da relação raiz/parte aérea, devido principalmente ao melhor desenvolvimento do sistema radicular. A parte aérea apresentou, proporcionalmente, menor diferença no peso da matéria fresca e seca, em ambos os substratos. Isso talvez se justifique pela maior fertilidade do plantimax onde, um sistema radicular menos desenvolvido, foi responsável por maior demanda de macro e micronutrientes à parte aérea.

2.3.5. Número de ramos por estaca

As estacas enraizadas em substrato areia produziram em média 2,72 ramos, enquanto esse valor no substrato plantimax foi de apenas 1,58 (Figura 11). Tendo em vista a correlação altamente significativa do substrato nas características analisadas, o maior número de ramos por estaca em areia, também pode ser explicado pelo que foi abordado anteriormente (porosidade, temperatura, disponibilidade de oxigênio). Além disso, essa característica foi influenciada pelo pré-tratamento em função do tempo de imersão e concentração da solução (Figura 8). A maior média resultou da imersão por seis horas em solução contendo 4,9mM de IBA. Quando as bases das estacas foram mantidas por 12 e 24 horas em imersão, o IBA apresentou fitotoxidez em todas concentrações utilizadas, tendo em vista que a maior média de número de ramos ocorreu sem IBA (Figura 13). Esses resultados

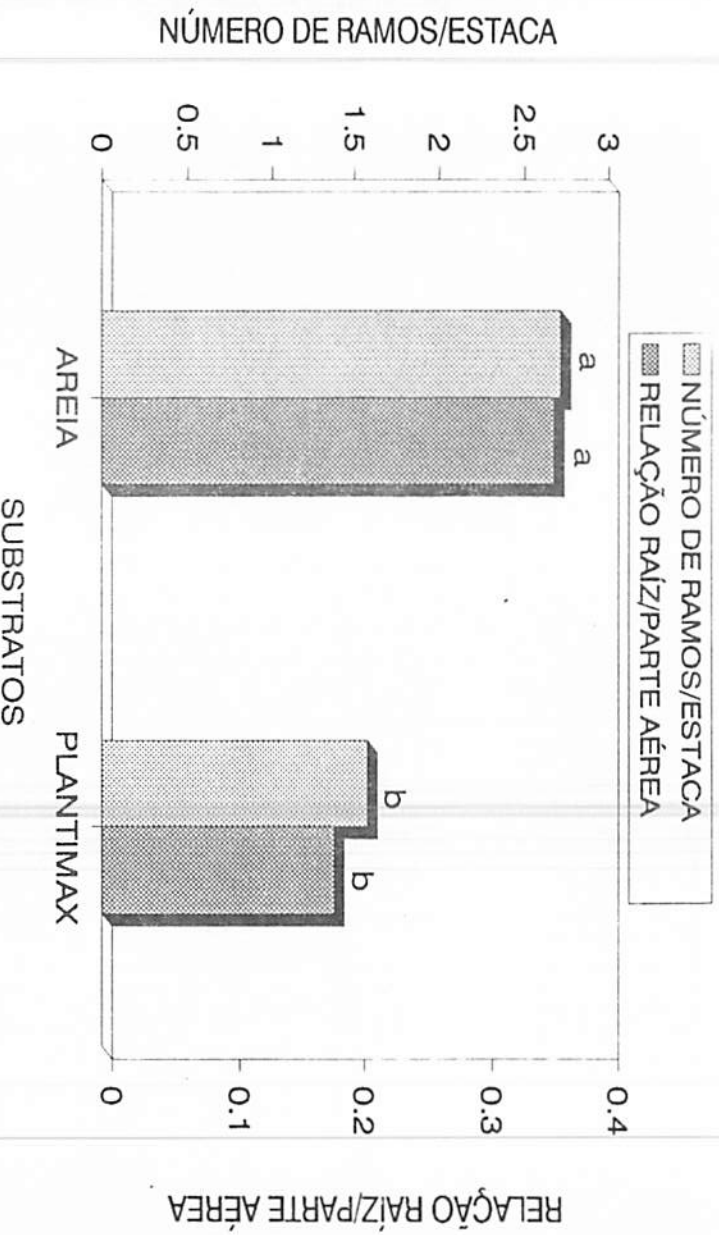


FIGURA 11. Efeito dos substratos sobre o número médio de ramos e relação raiz/parte aérea em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

talvez estejam relacionados com a porcentagem de enraizamento aonde a imersão por 12 e 24 horas em solução contendo IBA proporcionou resultados inferiores, devido a toxidez do regulador de crescimento. Como a porcentagem de enraizamento é uma característica resultante da fase de iniciação, podemos talvez relacionar o desenvolvimento do número de ramos por estaca com essa fase do processo de rizogênese. Observou-se um comportamento interessante das estacas quando da ausência do IBA, pois os tratamentos de 12 e 24 horas proporcionaram médias de 2,52 e 2,37 ramos/estaca, enquanto em seis horas, obteve-se apenas 1,86. Portanto, maiores médias de número de ramos podem ser alcançadas utilizando-se o substrato areia. Se o IBA for empregado, as estacas devem permanecer apenas por seis horas em imersão; caso a

imersão seja realizada apenas em água destilada, períodos maiores (12 e 24 horas) favorecem maior números de ramos por estaca. Isto pode dar-se em decorrência da maior hidratação dos tecidos na base das estacas e/ou exsudação de substâncias tóxicas ao enraizamento.

2.3.6. Peso de matéria fresca e seca da parte aérea

O peso da matéria fresca da parte aérea foi influenciado pela interação entre concentrações de IBA e tempo de imersão das estacas nessas soluções (Figura 12). No tempo de seis horas de imersão o peso das brotações foi 50% superior, comparado à brotações de estacas mantidas em imersão por 24 horas.

A concentração de 4,9mM de IBA foi a que proporcionou melhor ganho de matéria fresca na parte aérea das estacas, sendo responsável por um acréscimo de 0,81g da testemunha para 2,57g quando tratadas. Apesar da fitotoxidez sob 9,8mM, o peso da parte aérea, nessa concentração, ainda foi superior à testemunha.

O peso de matéria seca da parte aérea, de acordo com a Figura 9, além da interação entre concentração de IBA e tempo de imersão, foi influenciado pelo tipo de substrato. A mesma tendência quanto ao peso de matéria fresca foi constatado para o peso de matéria seca no tratamento com IBA.

O melhor tempo de imersão das estacas foi seis horas, observando-se uma queda nas médias de peso da matéria seca sob períodos de 12 e 24 horas (Figura 13). A mesma concentração de IBA (4,9mM) para melhores médias de peso da matéria fresca foi

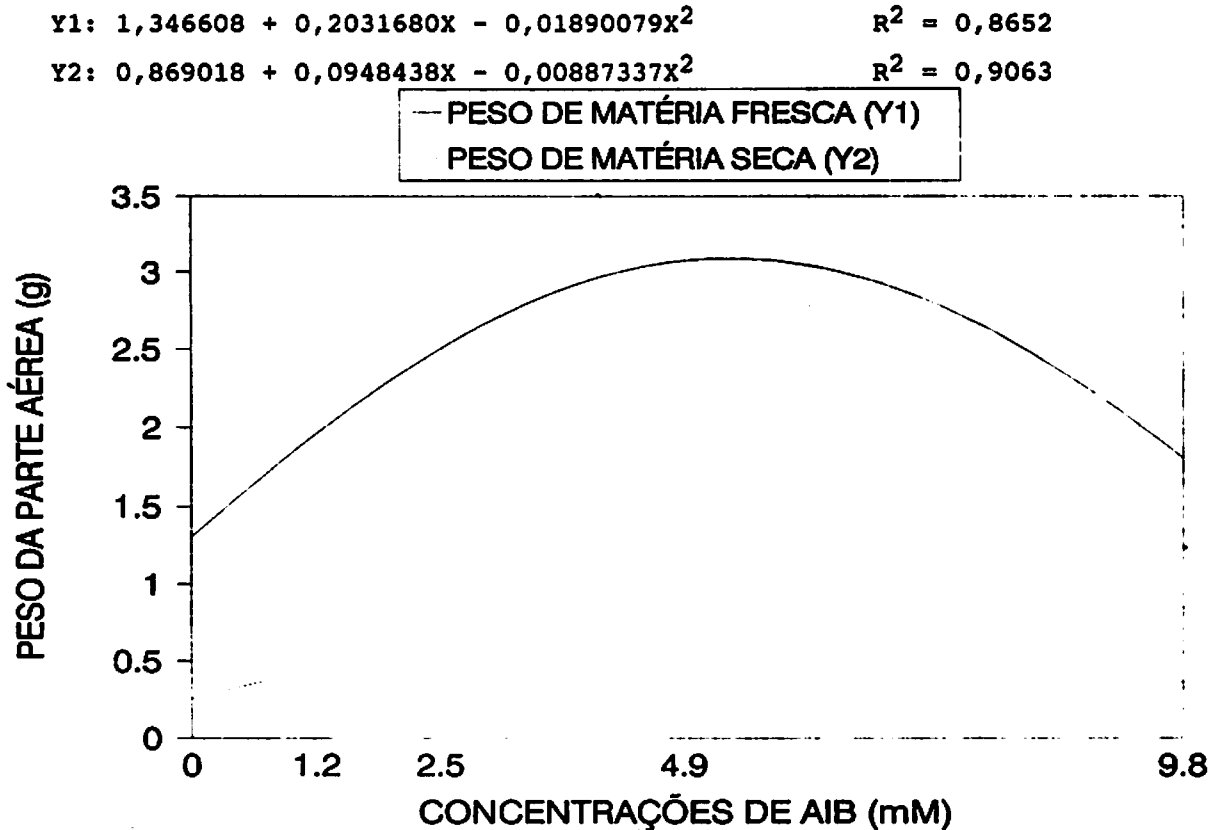


FIGURA 12. Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (IBA) nos pesos de matérias fresca e seca da parte aérea em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) após seis horas de imersão. ESAL, Lavras - MG, 1993.

também verificada para médias superiores de peso seco da parte aérea.

Diferenças significativas de resposta entre os dois substratos testados foram obtidas entre peso da matéria seca da parte aérea, sendo superiores aquelas de estacas plantadas em areia, conforme Figura 9. Nas Figuras 14, 15 e 16 podemos verificar visualmente o desenvolvimento do sistema radicular das estacas nos diferentes tratamentos.

$$Y1: 2,819260 - 0,1700581X + 0,00457054X^2$$

$$R^2 = 1,0000$$

$$Y2: 1,186805 - 0,0138002X$$

$$R^2 = 0,8538$$

$$Y3: 2,722550 - 0,0608509X$$

$$R^2 = 0,8891$$

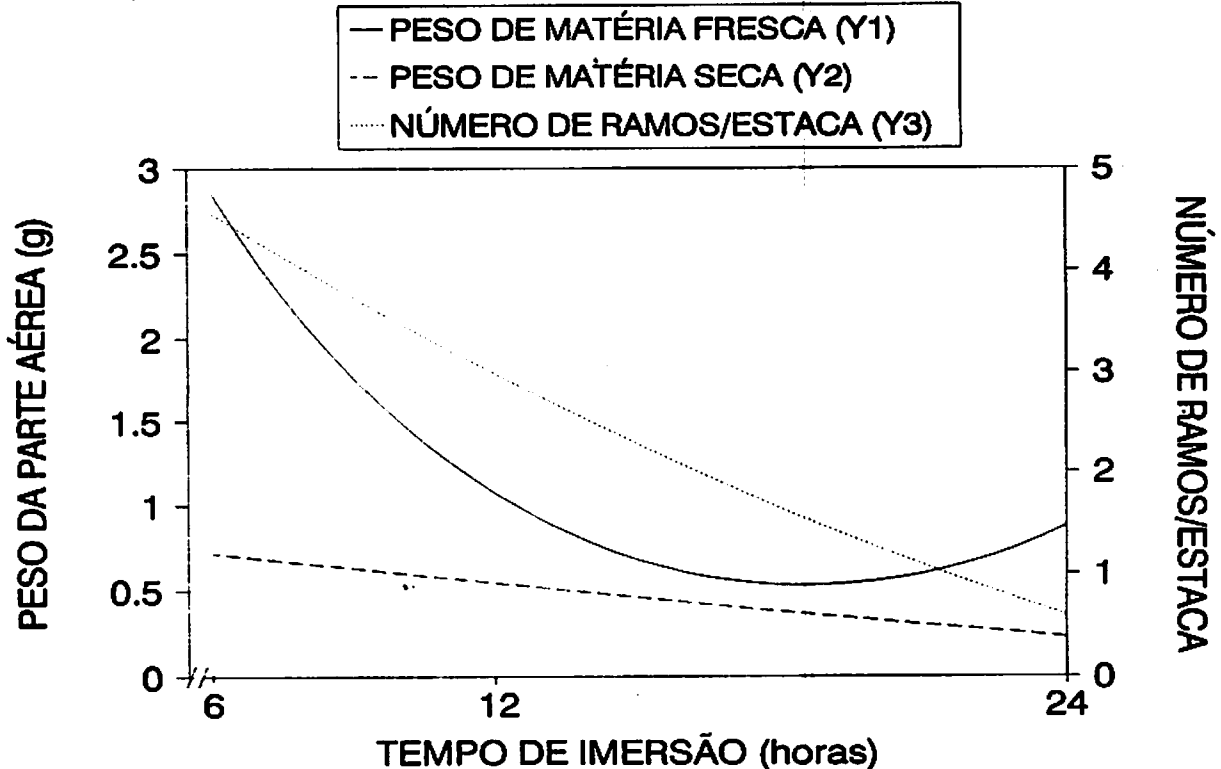


FIGURA 13. Efeito de diferentes tempos de imersão em soluções 4,9mM de ácido indolbutírico (IBA) nos pesos de matérias fresca e seca da parte aérea e número de ramos por estaca em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

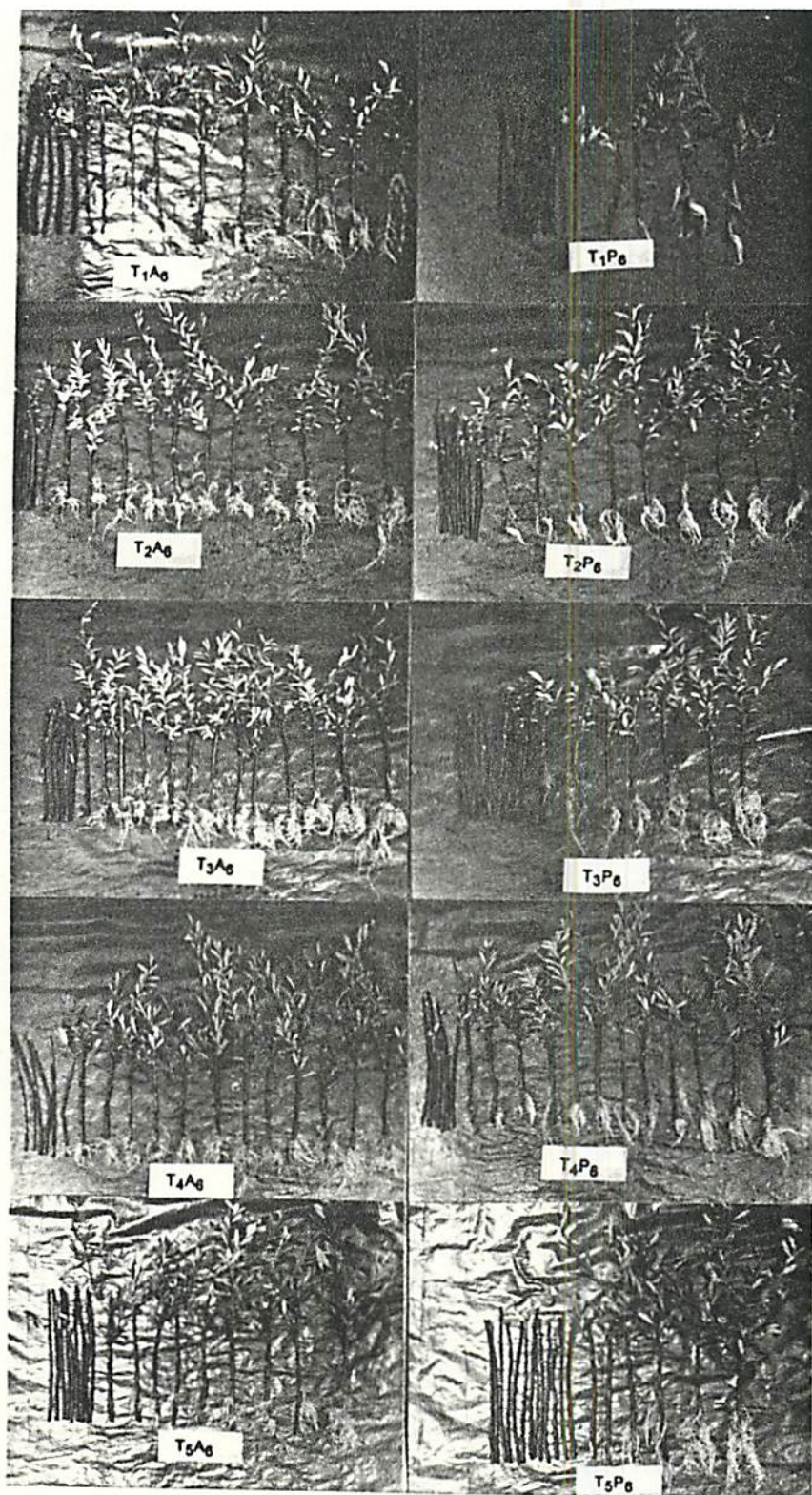


FIGURA 14. Estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) após 60 dias do plantio em areia e plantimax com pré-tratamento em imersão durante seis horas em soluções contendo ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 1,2 (T2); 2,5 (T3); 4,9 (T4); 9,8 (T5)mM e testemunha (T1). ESAL, Lavras - MG, 1993.

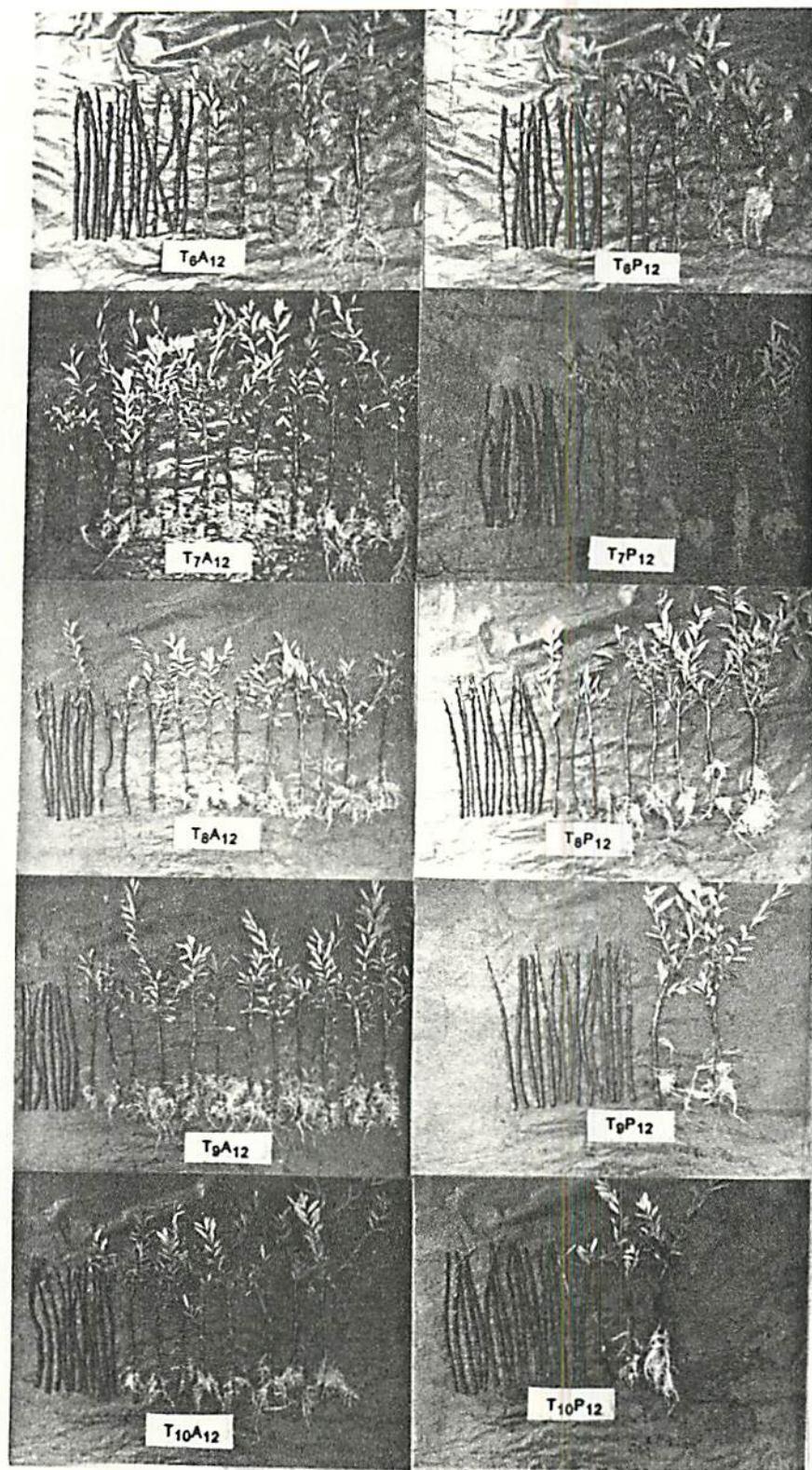


FIGURA 15. Estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) após 60 dias do plantio em areia e plantimax com pré-tratamento em imersão durante 12 horas em soluções contendo ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 1,2 (T7); 2,5 (T8); 4,9 (T9); 9,8 (T10)mM e testemunha (T6). ESAL, Lavras - MG, 1993.

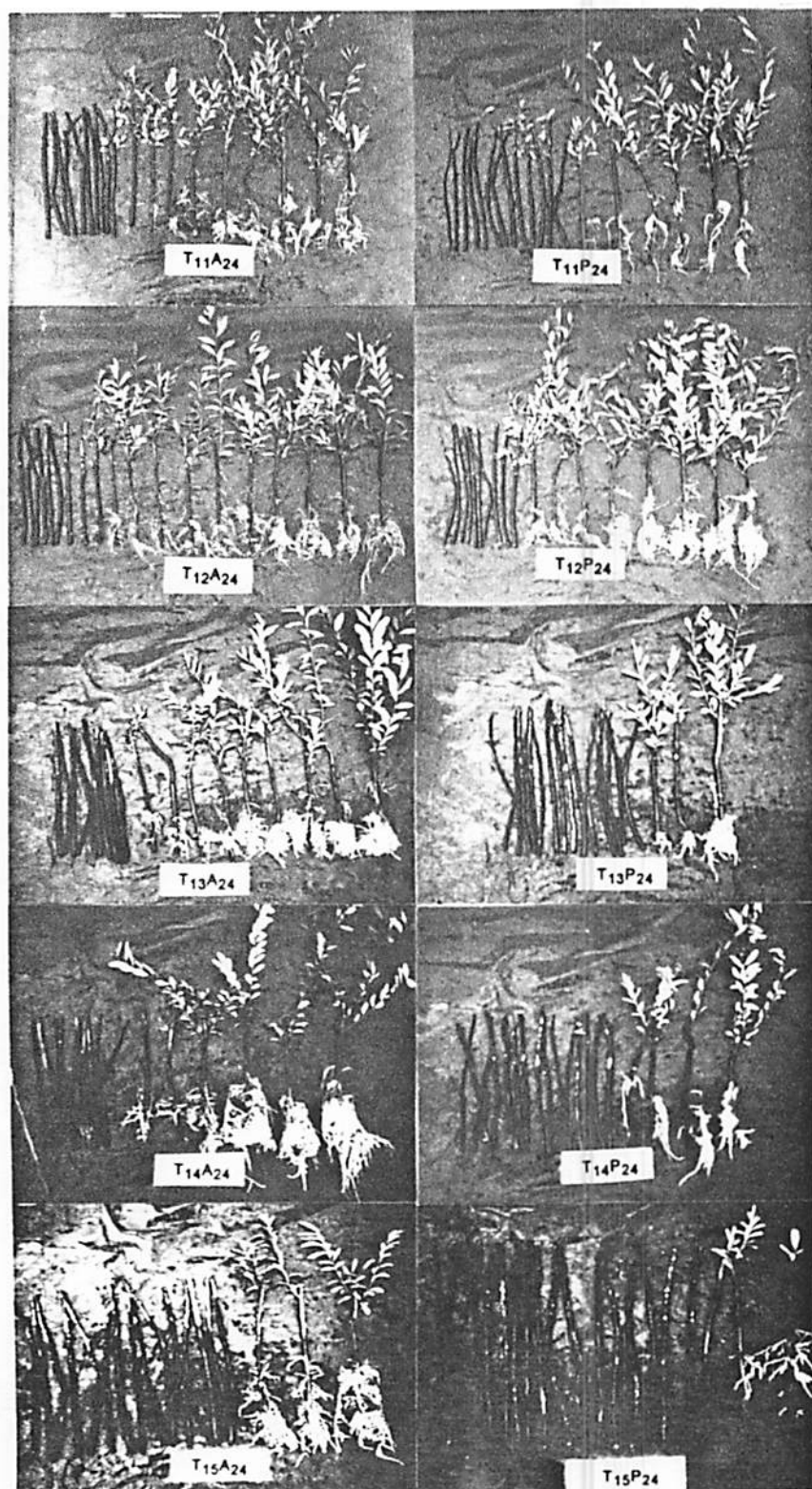


FIGURA 16. Estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) após 60 dias do plantio em areia e plantimax com pré-tratamento em imersão durante 24 horas em soluções contendo ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 1,2 (T12); 2,5 (T13); 4,9 (T14) e 9,8 (T15)mM e testemunha (T1). ESAL, Lavras - MG, 1993.

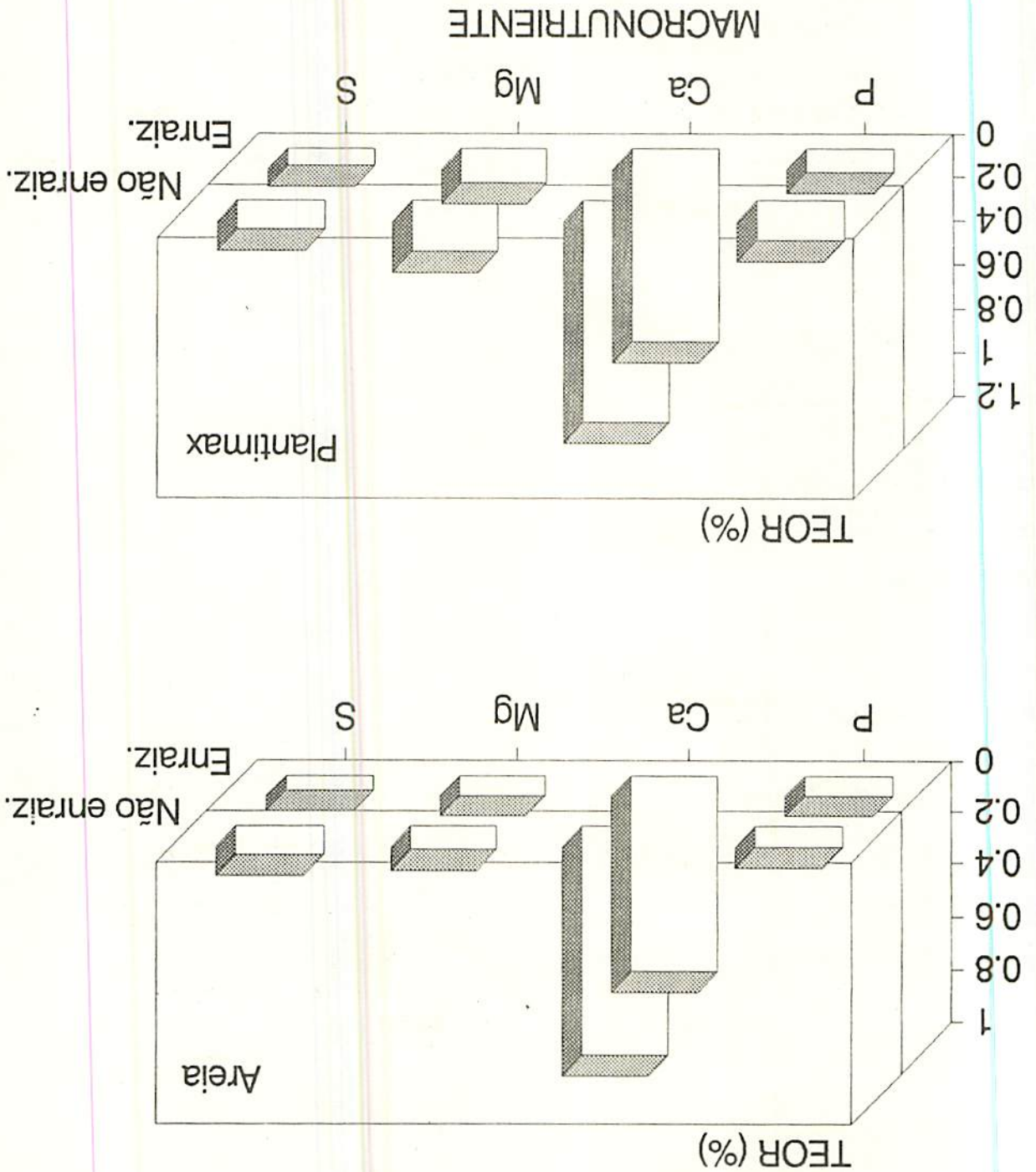
2.3.7. Nutrientes minerais

A partir da análise de nutrientes minerais das estacas estudou-se a correlação dos macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Zn, Fe e Mn) com todas as características de raiz e parte aérea avaliadas. Verificou-se, a nível de 1% de significância que o conteúdo dos macronutrientes Ca, Mg e S e do micronutriente B apresentaram correlação negativa para as características analisadas, com exceção do raio médio das raízes que não apresentou qualquer relação com os nutrientes minerais. Além desses elementos, P e Zn também apresentaram correlação negativa com a porcentagem de enraizamento, peso de matéria seca de raízes, relação raiz/parte aérea e número de ramos por estaca. Portanto, esses elementos apresentaram-se em menores teores em estacas enraizadas. As Figuras 17 e 18 mostram a comparação do conteúdo desses nutrientes entre estacas enraizadas e não enraizadas após imersão durante seis horas em solução contendo 4,9mM de IBA, com posterior plantio em areia e plantimax.

O plantio em areia proporcionou médias superiores nas características de raízes e parte aérea, sendo que nessas estacas verificaram-se menores teores de P, Ca, Mg, S, B e Zn, talvez em função da demanda do metabolismo desses nutrientes no processo de rizogênese, o que também foi constatado, quando comparado aos teores destes elementos em estacas enraizadas e não enraizadas de cada tratamento.

A participação do P no enraizamento de estacas está de acordo com o citado por BLAZICH et alii (1988), que verificaram

FIGURA 17. Teores médios de P, Ca, Mg e S em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) enraizadas e não enraizadas em areia e plantimax após tratamento com ácido indolbútrico (IBA) a 4,9mM em imersão durante seis horas. ESAL, Lavras - MG, 1993.



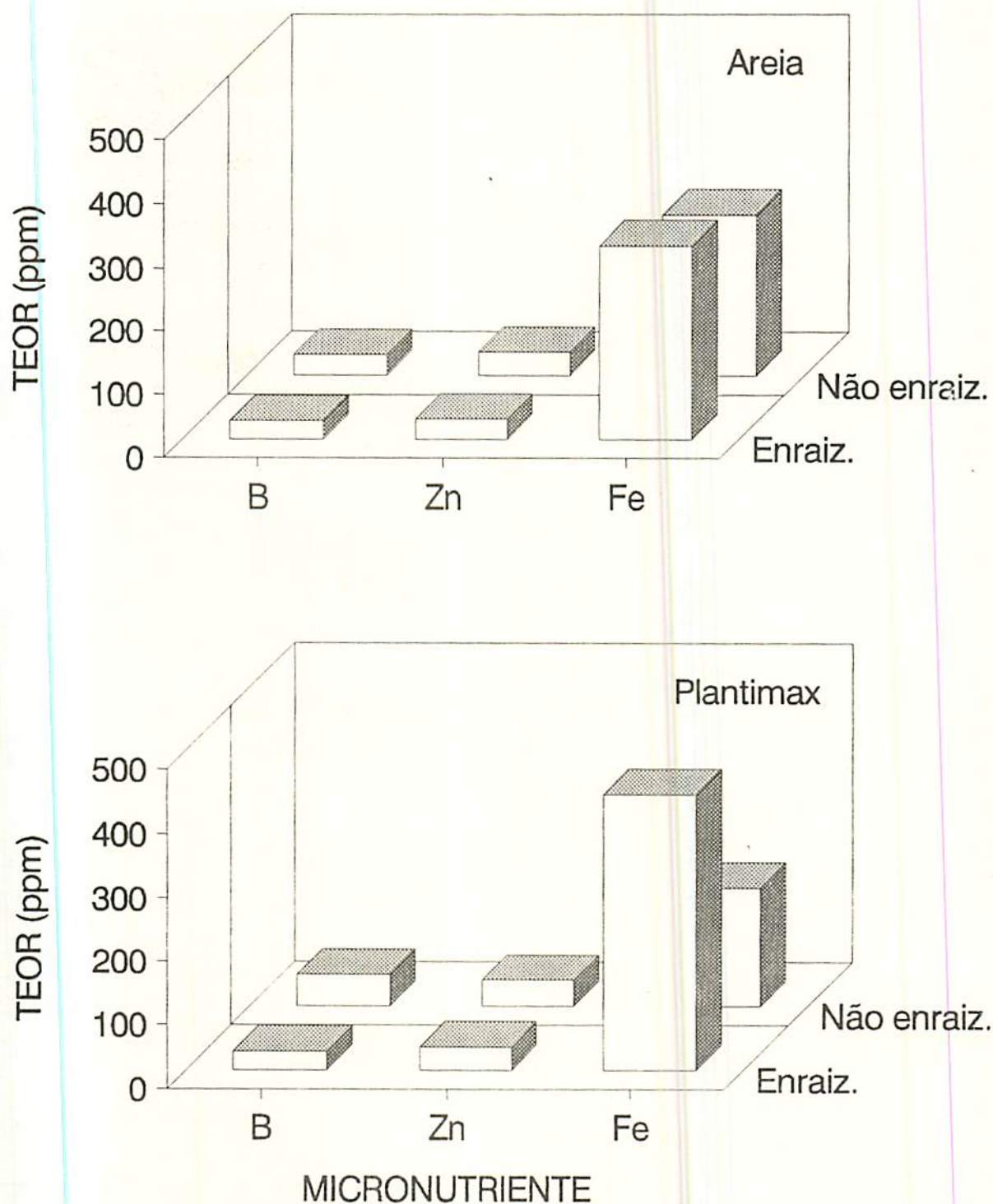


FIGURA 18. Teores médios de B, Zn e Fe em estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) enraizadas e não enraizadas em areia e plantimax após tratamento com ácido indolbutírico (IBA) a 4,9mM em imersão durante seis horas. ESAL, Lavras - MG, 1993.

maior mobilização desse nutriente em tecidos de *Ilex crenata* tratadas com IBA. Entretanto, os autores citam que os nutrientes Ca e Mg não influenciaram no enraizamento dessa espécie. A participação do Ca na regulação do crescimento de raízes é inibitória quando em concentrações citoplasmáticas elevadas (HASENSTEIN & EVANS, 1988). Os resultados dos teores de Ca estão de acordo com o observado por BONGA & DURZAN (1987) que relacionaram esse nutriente com a atividade de peroxidases antes da fase de iniciação. Os menores teores de B em estacas enraizadas podem estar associados aos diversos processos metabólicos citados por LEWIS (1980), ou ainda indiretamente através do controle da concentração de auxina nos primórdios radiculares pelo controle do sistema IAA oxidase (JARVIS et alii, 1984).

Os níveis de Zn apresentaram correlação negativa no enraizamento de estacas de Sarandi conforme verificado na fertilização de estacas de videira em que o nutriente estava associado ao aumento dos níveis de triptofano (Sariesh & Spigel, 1958 citados por BLAZICH, 1988).

O Fe foi o único nutriente que apresentou correlação positiva, ou seja, a concentração desse nutriente foi superior em estacas com melhor enraizamento, conforme as características analisadas. Os resultados obtidos sugerem que os maiores teores de Fe nas estacas são devidos ao maior envolvimento desse nutriente nas reações redox, conforme CLARKSON & HANSON (1980), durante o desenvolvimento das raízes e da parte aérea. Na Figura 18 encontram-se valores médios relativos desse nutriente em estacas enraizadas e não enraizadas após imersão durante seis,

horas em solução contendo 4,9mM de IBA, com posterior plantio em areia e plantimax.

2.4. CONCLUSÕES

O melhor substrato para o enraizamento de estacas de Sarandi foi a areia, proporcionando melhor desenvolvimento de raízes e parte aérea, levando-se em consideração todas as características analisadas.

A maior porcentagem de enraizamento e melhor desenvolvimento da parte aérea foram observados quando as estacas permaneceram em imersão por apenas seis horas em solução contendo 4,9mM de IBA.

O comprimento de raízes foi influenciado pela interação entre substrato e tempo de imersão.

Com relação à participação dos nutrientes minerais, verificou-se que a mobilização de nutrientes nas estacas influenciou o processo de rizogênese, tendo em vista a diferença dos teores encontrados em estacas enraizadas e não enraizadas. Os elementos P, Ca, Mg, S, B e Zn foram os que apresentaram efeito no enraizamento de estacas, enquanto essa correlação ocorreu em sentido contrário com o elemento Fe, em que os maiores teores foram verificados em estacas onde o enraizamento foi superior.

**CAPÍTULO III - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE SARANDI
(*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var.
Schottiana) DIRETAMENTE EM SUBSTRATO**

RESUMO

Brotações com até 100mm de comprimento foram divididas em duas microestacas de 40mm e testadas com relação à posição apical e basal, parte aérea (ausência ou presença de folhas pela metade) e imersão em água (sem imersão e com imersão por 15 e 30 minutos). Brotações com 200mm de comprimento foram divididas em quatro microestacas (apical, mediana superior, mediana inferior e basal) e levadas à imersão por 15 minutos em soluções com ácido indolbutírico 0,02; 0,1; 0,6 e 3,1mM. Após o período de 45 dias, avaliaram-se a porcentagem de microestacas enraizadas, comprimento e número de raízes. Nas brotações com 100mm de comprimento foi verificado que não houve interação entre os fatores posição, presença de folhas e imersão em água, no entanto, a imersão em água por 15 minutos e a presença de folhas proporcionaram os melhores resultados. Por outro lado, em brotações de 200mm, maior número de raízes foi obtido em microestacas basais sob concentração de 3,1mM de IBA. A porcentagem de microestacas enraizadas e o comprimento de raízes

foi superior a partir da base das brotações, com aumento linear até a concentração de 3,1mM de IBA, embora sem interação com o fator posição.

3.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO

Atualmente, várias pesquisas tem sido desenvolvidas para a indução da rizogênese "in vitro". Este sistema, além de viabilizar a propagação de microestacas em várias espécies, permite o estudo de fatores relacionados com o processo, como a influência de nutrientes minerais e do ambiente (luz e temperatura, por exemplo).

No entanto, o enraizamento de microestacas diretamente em substrato "in vivo" é uma técnica alternativa para algumas espécies que apresenta vantagens. Destaca-se, dentre elas, o custo final da produção de mudas. Na rizogênese "in vivo", a etapa de enraizamento ocorre simultaneamente à aclimação, não representando custo adicional, enquanto que o enraizamento "in vitro" pode, segundo Mc COWN et alii (1987), representar até 50% do custo total da muda.

Conforme a espécie, a sobrevivência na aclimação de microestacas enraizadas "in vitro" pode ser muito reduzida. Além do menor custo, o enraizamento "in vivo" aumenta a eficiência do sistema de micropropagação (PREECE & SUTER, 1991).

Mc CLELLAND et alii (1990) compararam os dois sistemas de produção de raízes em três espécies lenhosas, nas etapas de iniciação e aclimação. O comprimento das microestacas variou de 20 a 35mm, conforme a espécie e o enraizamento foi induzido com

adição de IBA ao meio de cultura ("in vitro"), ou com imersão rápida em solução contendo essa auxina ("in vivo"). A rizogênese "in vitro" e "in vivo" foi iniciada no período de quatro a seis dias e 10 dias, respectivamente, porém houve crescimento simultâneo da parte aérea "in vitro", o que não ocorreu na condição "in vivo". Os autores relataram ainda que a menor taxa de sobrevivência (50%) do material "in vitro" na aclimatação foi devida principalmente à formação de calos e conseqüentemente, dificuldade de transporte de água à parte aérea. O material sobrevivente demonstrou, anatomicamente, boa capacidade de reorganização dos tecidos com surgimento de novas raízes "in vivo". Apesar da superioridade do sistema radicular sob condições "in vivo", as condições de ambiente devem ser bem controladas.

O tipo de sistema radicular depende de características ambientais, da espécie e da qualidade do explante. Particular atenção deve ser dada à umidade, luz e temperatura (PREECE & SUTTER, 1991).

A qualidade do explante, segundo Mc COWN et alii (1987), tem maior influência no enraizamento "in vivo". Além disso, o tamanho do explante e manutenção de sua área foliar são aspectos importantes.

Na propagação de *Acacia senegal*, o enraizamento de microestacas com oito gemas (120-140mm de comprimento) ocorreu apenas quando foram mantidas as folhas (BADJI et alii, 1991). Na mesma espécie, DANTHU et alii (1992) compararam o enraizamento de microestacas com comprimentos de 70, 150 e 230mm, obtendo os melhores resultados em microestacas de comprimento de 150mm.

A influência da área foliar na rizogênese em *Terminalia spinosa* Engl., a partir de microestacas com 50mm de comprimento, foi avaliada por NEWTON et alii (1992). Nesse trabalho, os tratamentos envolveram a remoção das folhas e manutenção das mesmas com áreas equivalentes a 750, 1500 e 3000mm². As microestacas que tiveram suas folhas retiradas não enraizaram; entretanto nas que foram mantidas as áreas foliares acima descritas, o enraizamento obtido foi de 80%, após três semanas. Os autores verificaram ainda uma tendência de aumento da porcentagem de enraizamento e comprimento de raízes proporcionalmente ao aumento da área foliar.

O pré-tratamento com auxinas é necessário ao enraizamento em algumas espécies, sendo empregado também para aumentar a rapidez e uniformidade do enraizamento, bem como o número de raízes adventícias formadas (Mc COWN et alii, 1987).

O pré-tratamento de microestacas de espécies florestais com auxinas é citado em vários trabalhos, em que se procura estabelecer uma relação entre concentração da solução e tempo de imersão nas mesmas. RODRIGUES et alii (1988) regeneraram microestacas de *Corylus avellana* L. após imersão em 4,9mM de IBA durante dez segundos. Em *Sequoia sempervirens*, microestacas de 40 a 60mm de comprimento produziram maior número de raízes, quando mantidas por seis horas em solução de IBA 0,49mM (QUE, 1983).

A partir dos trabalhos citados, percebe-se a importância deste sistema de enraizamento de microestacas e a tendência em desenvolver esta técnica devido principalmente, à praticidade e economicidade. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo principal viabilizar o enraizamento de microestacas

de Sarandi, diretamente em substrato, avaliando-se a influência de diferentes tempos de imersão em água e soluções de IBA, bem como posição da microestacas em brotações com diferentes comprimentos.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Estacas coletadas às margens do Rio Grande, município de Perdões (MG) foram enraizadas após imersão da parte basal por um período de seis horas em solução de ácido indolbutírico (IBA) a 4,9mM. O plantio foi em profundidade de 100mm em areia fina acondicionada em sacos de polietileno com volume de 0,6L. As estacas foram então mantidas em casa de vegetação com controle de umidade e temperatura, sob sombrite 50%.

A partir do surgimento das brotações, foram realizadas pulverizações semanais com o fungicida Benlate ($1,5\text{g.L}^{-1}$) até a retirada de microestacas com comprimento e diâmetro homogêneos para a instalação dos experimentos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições composto por três microestacas cada, em ambos os experimentos. No primeiro, utilizaram-se brotações de 100mm que foram subdivididas em microestacas de 40mm, denominadas basais e apicais. Estas por sua vez foram submetidas ao plantio diretamente (sem imersão) ou então com imersão em água destilada (15 e 30 minutos). Além dos fatores posição e imersão em água, a influência da permanência de folhas pela metade também foi testada.

No experimento seguinte, utilizando-se brotações com comprimento máximo de 200mm, mantiveram-se as folhas pela metade em todos os tratamentos. O fator posição foi testado nas regiões apical, mediana superior, mediana inferior e basal, após imersão da base das microestacas em água destilada e em soluções de ácido indolbutírico (0,02; 0,1; 0,6 e 3,1mM) sob luminosidade natural, por quinze minutos.

Em ambos os experimentos, utilizou-se substrato areia em sacos de polietileno com volume de 0,6L, para o enraizamento de microestacas.

Após o período de 45 dias, avaliaram-se a porcentagem de microestacas enraizadas, comprimento e número de raízes. Para essas características, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) quanto aos fatores presença de folhas e posição. A regressão polinomial foi empregada quando o tempo de imersão e concentração de IBA foram os fatores testados.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Enraizamento "in vivo" de microestacas provenientes de brotações com 100mm

A posição do explante em brotações de até 100mm não influenciou significativamente o número médio de microestacas enraizadas e número e comprimento de raízes. Aparentemente, as brotações com 100mm de comprimento apresentavam um aspecto uniforme quanto a coloração entre microestacas apicais e basais. Isso talvez caracterize certa homogeneidade entre os compostos

metabólicos que atuam promovendo ou inibindo o enraizamento e também semelhanças quanto ao estágio de desenvolvimento do sistema vascular.

A imersão em água, bem como a presença de folhas pela metade, tiveram efeito significativo, embora sem interação, nas características avaliadas.

De acordo com a Figura 19, na imersão durante quinze minutos em água foram obtidos em média 37,74% de explantes enraizados, cujo número e comprimento de raízes foi 0,88 e 8,6mm respectivamente. Após 30 minutos de imersão, a porcentagem de enraizamento foi reduzida para 28,70%, o número de raízes para 0,6 e o comprimento para apenas 5,1mm. As menores médias entretanto ocorreram quando não se realizou imersão em água e as microestacas foram imediatamente plantadas após a divisão das brotações. A porcentagem de enraizamento caiu para 14,00%, com as microestacas apresentando, em média, número de raízes igual a 0,27 e comprimento 3,1mm. Conforme esses resultados, verificamos que há necessidade de um período de imersão das microestacas possivelmente para adequada hidratação e/ou exsudação de inibidores dos tecidos proporcionando melhor enraizamento.

A presença de folhas pela metade nas microestacas também apresentou efeito significativo nessas características, confirmando dados obtidos por BADJI et alii (1991) e NEWTON et alii (1992). Os resultados apresentados na Figura 20, mostram que em média 44% das microestacas enraizaram quando se mantiveram as folhas pela metade. O número médio de raízes por microestaca foi 1,05 com comprimento de 9,4mm. Portanto, a necessidade em manter-se a microestaca com folhas pode estar relacionada com a

$$\begin{aligned}
 Y1: & 1,127334 + 0,0282841X - 0,00070795X^2 & R^2 & = 1,0000 \\
 Y2: & 1,195060 + 0,0297163X - 0,00080257X^2 & R^2 & = 1,0000 \\
 Y3: & 1,147608 + 0,0260604X - 0,00077551X^2 & R^2 & = 1,0000
 \end{aligned}$$

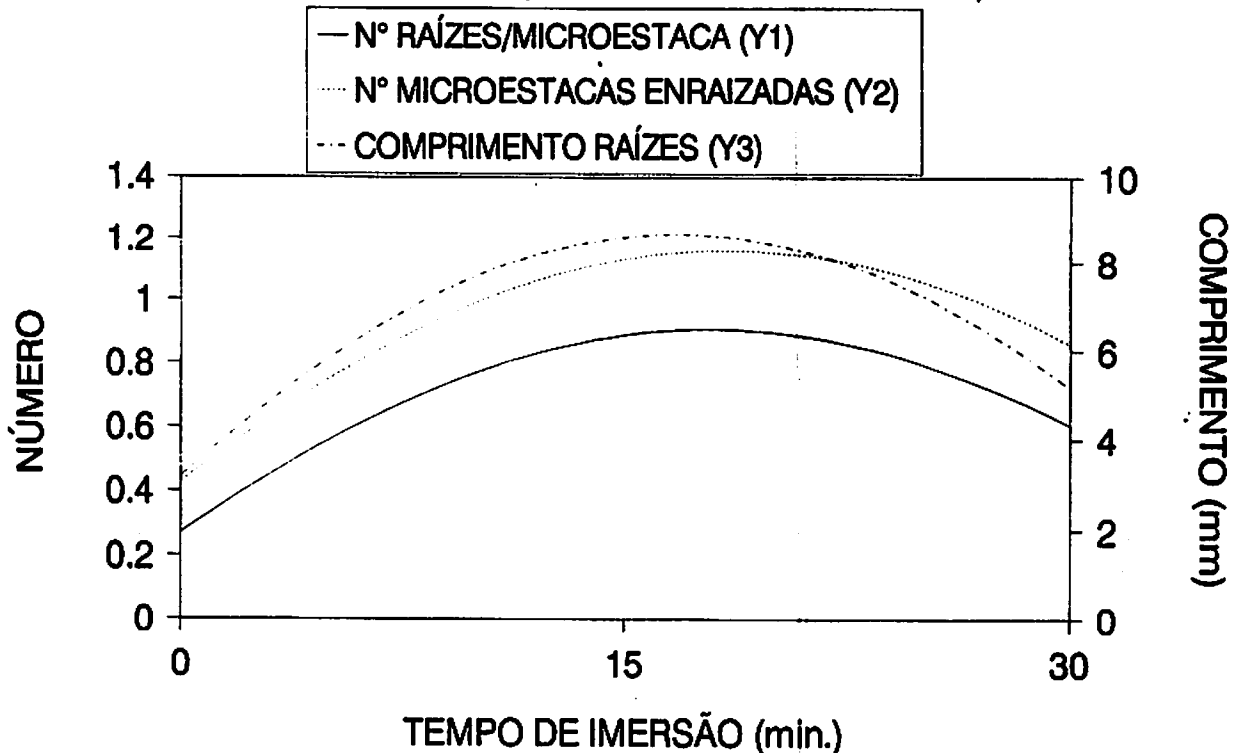


FIGURA 19. Efeito do tempo de imersão em água destilada sobre o número médio de raízes, microestacas enraizadas e comprimento médio de raízes em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

fonte contínua da produção de fotoassimilados, porquanto as reservas e as taxas fotossintéticas dos segmentos de brotações sem folhas são insuficientes para o processo de rizogênese. A concentração endógena de auxinas nas folhas também parece ter influenciado, e, além disso, na biossíntese de auxinas há necessidade de poder redutor produzidos na fotossíntese e respiração. A porcentagem de enraizamento obtida foi de apenas 44%, e outros estudos portanto, tornam-se necessários, tais como,

avaliações com diferentes tamanhos de microestacas, área foliar, etc., visando otimizar a rizogênese.

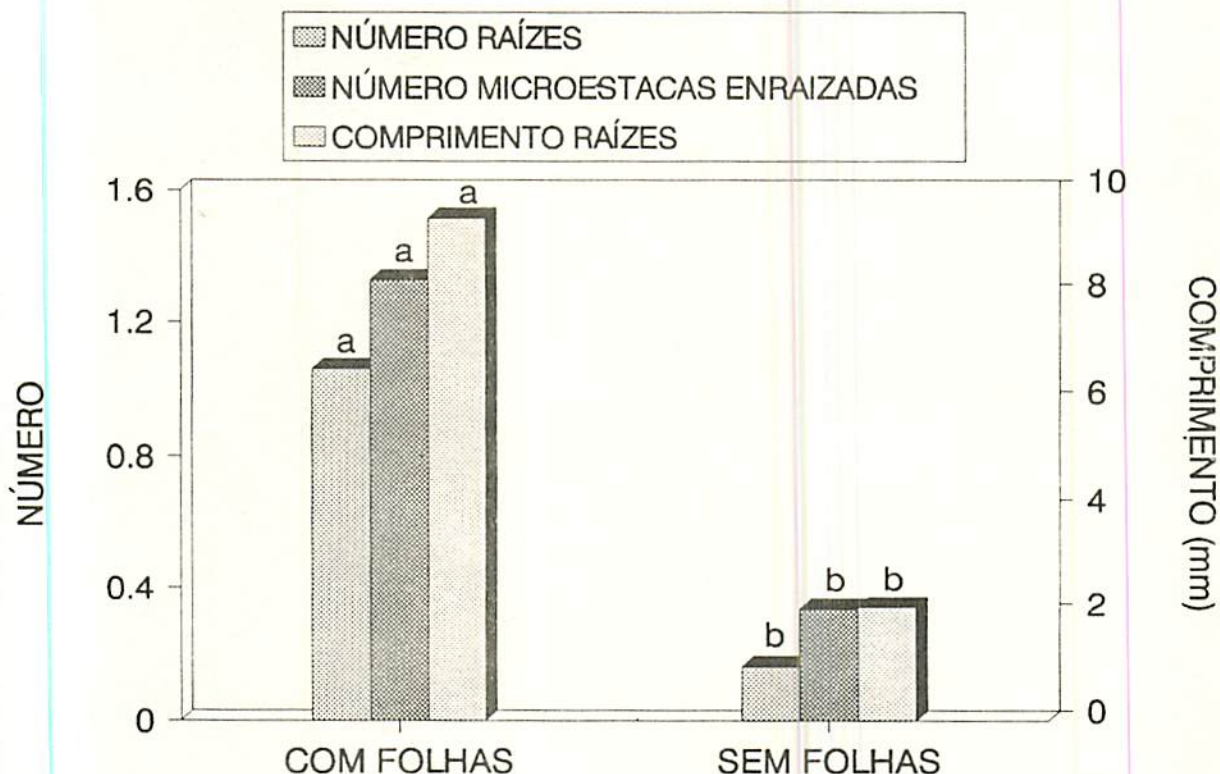


FIGURA 20. Efeito das folhas em relação ao número de raízes e de microestacas enraizadas e comprimento médio de raízes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

3.3.2. Enraizamento "in vivo" de microestacas provenientes de brotações com 200mm

Os resultados obtidos no enraizamento de brotações com até 200mm de comprimento, mostram que, a 1% de significância os fatores posição e concentração de IBA tiveram efeito positivo sobre a porcentagem de enraizamento e comprimento de raízes.

As maiores médias foram obtidas a partir da base das brotações, sendo menor na região apical. A Figura 21 mostra que 82,87% das microestacas enraizaram na região basal, apresentando

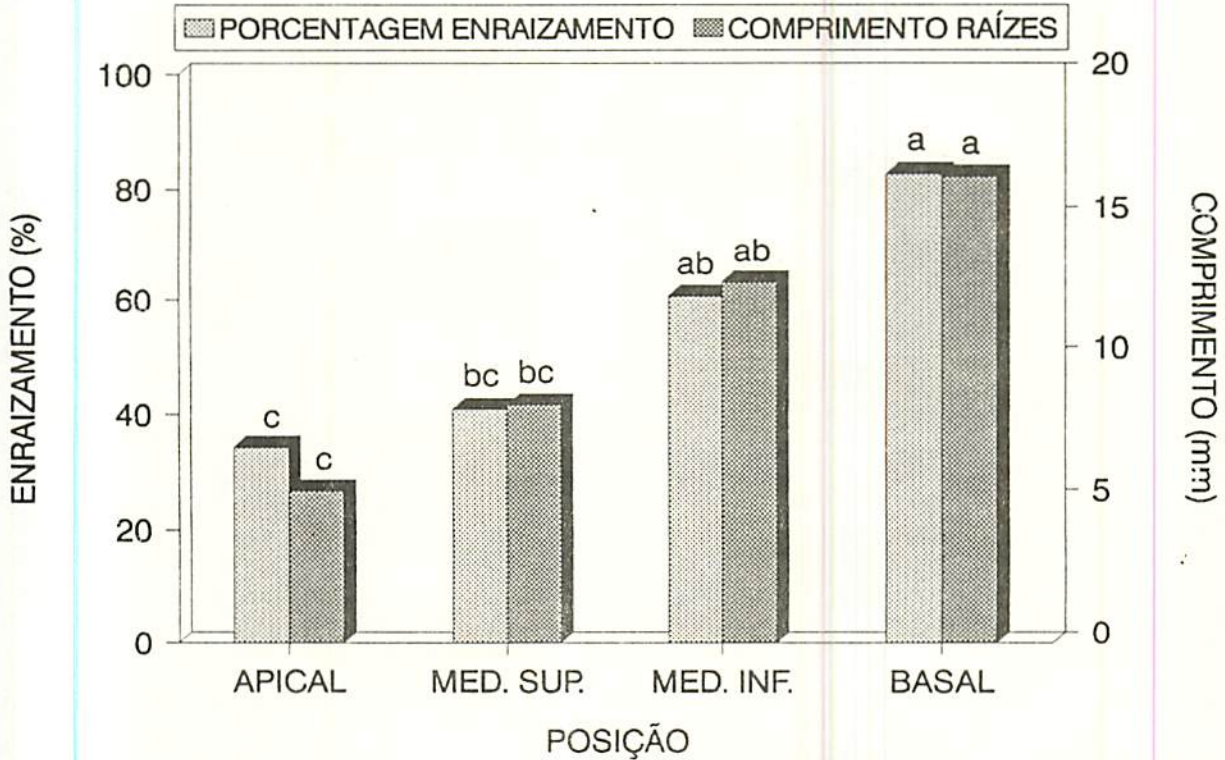


FIGURA 21. Efeito da posição sobre a porcentagem de microestacas enraizadas e comprimento médio de raízes em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

comprimento médio de raízes 16,4mm, enquanto, na região apical, a porcentagem de enraizamento foi 34,28% com comprimento de apenas 5,3mm. A diferença no enraizamento de microestacas retiradas de quatro posições pode ter sido devida às diferenças nas concentrações endógenas de auxinas ou indiretamente, através da regulação do sistema IAA oxidase ou pelo transporte de protetores (inibem a oxidação do IAA) de auxinas. MATO & VIEITEZ (1986) verificaram em *Castanea sativa*, que após o pré-tratamento de explantes basais e apicais com IAA, houve uma diminuição na atividade do IAA oxidase e aumento na atividade dos protetores de auxinas na região basal proporcionando melhor enraizamento. Conforme TORREY (1976), o transporte de auxinas ocorre

predominantemente no tecido vascular ou entre células do cilindro central. As diferenças observadas no enraizamento quanto as posições das microestacas, provavelmente sejam devidas aos diferentes estádios de desenvolvimento do tecido vascular, o que levaria a mudanças nas concentrações de IAA.

Nos tratamentos com IBA houve também uma resposta linear em função das concentrações utilizadas, sendo que as maiores médias na porcentagem de enraizamento e comprimento de raízes corresponderam as maiores concentrações de IBA (Figura 22).

$$Y1: 1,366195 + 0,0855040X \quad R^2 = 0,7015$$

$$Y2: 1,541932 + 0,0971054X \quad R^2 = 0,7995$$

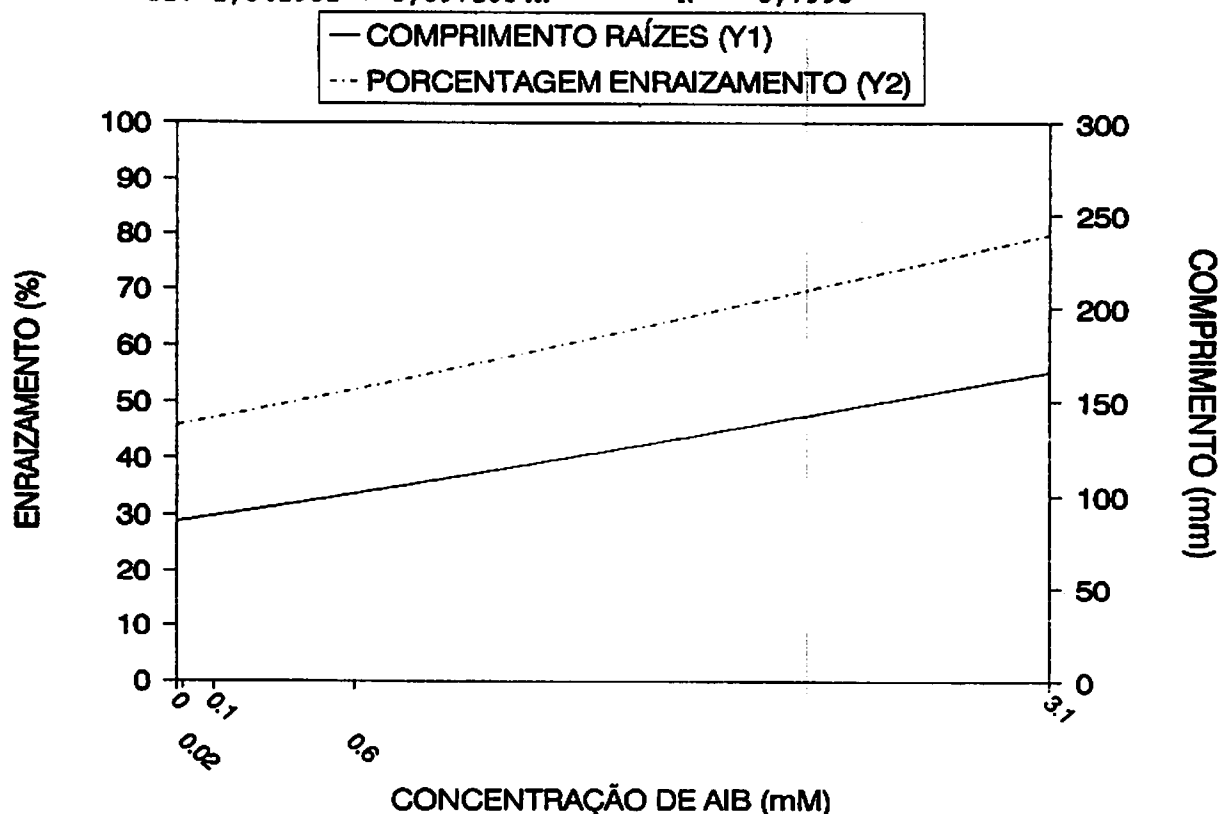


FIGURA 22. Efeito da concentração de ácido indolbutírico (IBA) na porcentagem de enraizamento e comprimento médio de raízes em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após imersão por 15 minutos. ESAL, Lavras - MG, 1993.

A imersão de explantes em solução contendo 3,1mM de IBA proporcionou o enraizamento de 79,83% das microestacas, enquanto que no tratamento testemunha (imersão em água destilada) apenas 45,80% das microestacas enraizaram. Da mesma forma, o comprimento das raízes aumentou de 13,7mm do tratamento testemunha para 16,3mm em solução 3,1mM de IBA. O efeito do pré-tratamento com imersão em IBA também proporcionou bons resultados no enraizamento de microestacas, conforme trabalhos de QUE (1983) e RODRIGUES et alii (1988).

O número médio de raízes nas microestacas foi influenciado pela interação entre os fatores posição e concentração de IBA. Com exceção das microestacas apicais, as de posição mediana superior e inferior e basais apresentaram resposta linear em relação ao aumento da concentração de IBA (Figura 23). Nessas posições, o número médio de raízes em microestacas, após a imersão em solução 3,1mM de IBA foi 5,78 em medianas superiores, 4,28 em medianas inferiores e 7,52 em microestacas basais, contra 1,55, 0,83 e 2,80, nas respectivas posições das testemunhas. Em microestacas apicais, a resposta foi diferenciada e a maior média do número de raízes (4,16) foi verificado após imersão em solução contendo 0,02mM de IBA, porém verificou-se menor percentual de sobrevivência das microestacas.

O aumento linear da porcentagem, número e comprimento de raízes, após imersão durante 15 minutos em solução de IBA a 3,1mM, sugere que outros estudos envolvendo maiores concentrações de IBA e/ou tempo de imersão devam ser realizados para maximizar o enraizamento das microestacas.

$$Y1: 1,358699 + 0,4022201X \quad R^2 = 0,8309$$

$$Y2: 1,600469 + 0,2259987X \quad R^2 = 0,9231$$

$$Y3: 1,954822 + 0,3111580X \quad R^2 = 0,7353$$

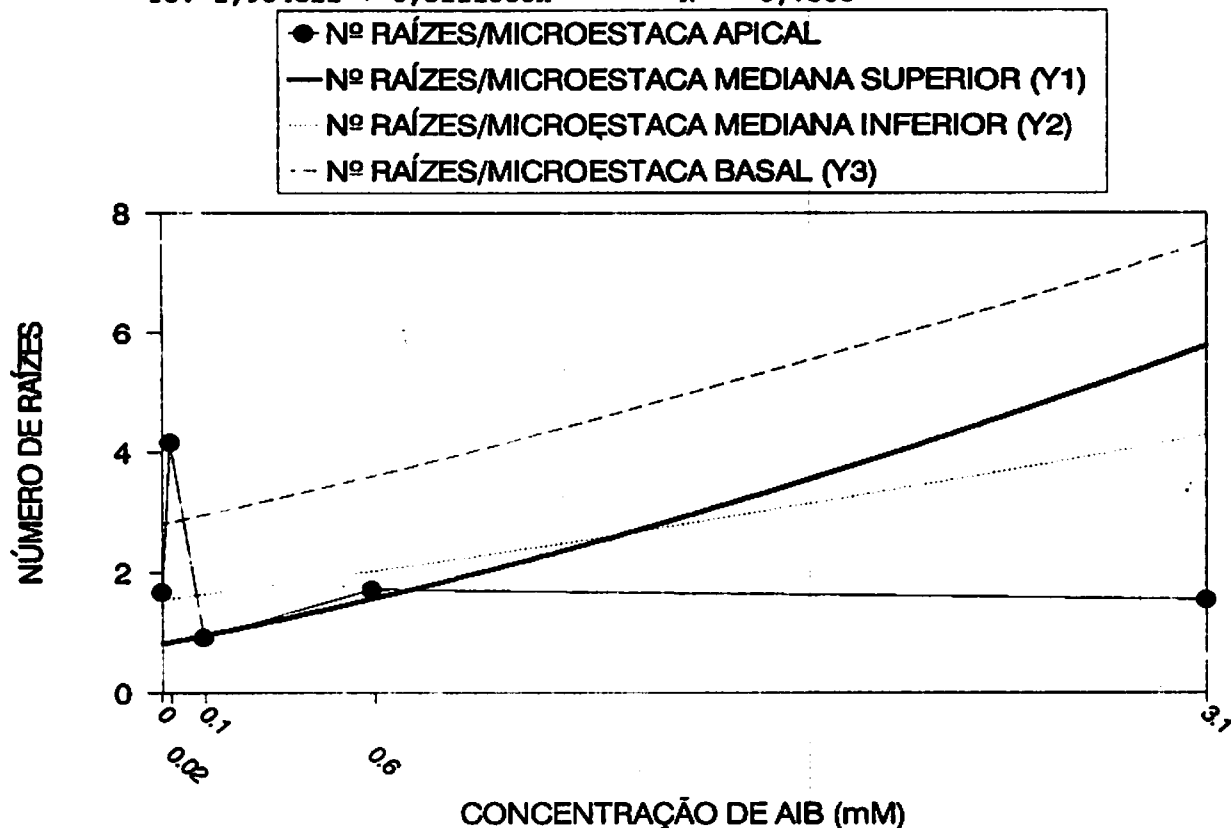


FIGURA 23. Efeito da concentração de ácido indolbutírico (IBA) sobre o número médio de raízes em microestacas apical, mediana superior, mediana inferior e basal de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após imersão por 15 minutos. ESAL, Lavras - MG, 1993.

3.4. CONCLUSÕES

Na propagação de Sarandi a partir do enraizamento de microestacas "in vivo", maiores porcentagens de enraizamento, comprimento e número de raízes foram alcançadas quando se mantiveram as folhas pela metade.

A imersão da base das microestacas em água destilada, durante quinze minutos, foi responsável por 37,74% de microestacas enraizadas. Utilizando-se brotações de 100mm, não

houve diferenças na posição das microestacas (apicais e basais). Por outro lado, a posição de microestacas obtidas a partir de brotações com 200mm de comprimento, influenciou a porcentagem de enraizamento, bem como o número e comprimento médio de raízes, sendo as microestacas basais as que proporcionaram maior porcentagem de enraizamento.

O enraizamento de microestacas através do pré-tratamento com IBA a 3,1mM mostrou-se efetivo, no tempo de imersão de 15 minutos.

CAPÍTULO IV - CONTROLE DE OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO "IN VITRO" DE BROTAÇÕES DE SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*)

RESUMO

Nas tentativas do estabelecimento "in vitro" de Sarandi, utilizaram-se explantes de plantas adultas (condições de campo) e de estacas mantidas em casa de vegetação. Os explantes de plantas adultas, inicialmente, foram mantidos por 12 horas em água-corrente e, após a inoculação em meios Murashige & Skoog (MS) e Wood Plant Medium (WPM), permaneceram por oito dias no escuro. Também avaliou-se o estabelecimento quando os explantes foram submetidos aos fatores tempo de imersão em água corrente (duas, 12, 18 e 24 horas), luminosidade (claro/escuro - seis dias) após inoculação em meios de cultura (MS e WPM). Com explantes de mudas mantidas em casa de vegetação, inicialmente, testaram-se diferentes períodos de tempo de imersão em água corrente (20 minutos, duas horas, 12 horas e testemunha) e o efeito de antioxidantes (PVP, ácido ascórbico + cisteína e testemunha) em meio WPM. O tipo de explante também foi avaliado quanto à sua posição na brotação (apical e basal) e à manutenção

ou não de folhas pela metade. Os resultados mostraram que explantes coletados de estacas mantidas em casa de vegetação apresentaram maior porcentagem de estabelecimento "in vitro", com redução das porcentagens de contaminação e oxidação fenólica. O melhor tipo de explante foi da região basal, que além do melhor estabelecimento, apresentou maior emissão de folhas.

4.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO

Os explantes utilizados na micropropagação "in vitro" podem ser obtidos de plantas matrizes, mantidas em casa de vegetação ou no campo. No entanto, segundo PIERIK (1987), maior é a chance de contaminação quando o material vegetal é proveniente do campo.

Explantes de *Prunus serotina* EHRH. coletados no campo foram tratados com o princípio ativo benomyl com imersão, por dez minutos, em solução contendo $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ (TRICOLI et alii, 1985), diminuindo a contaminação.

CARVALHO et alii (1990), procurando estabelecer uma metodologia para controle da contaminação fúngica em brotações de *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN crescidas no campo, utilizaram o princípio ativo benomyl suplementado em meio de cultura na concentração de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$. Essa prática mostrou-se eficiente na redução, em até 30%, da contaminação.

O tratamento com fungicidas foi dispensado em brotações de *Veronica spicata* L. espécie ornamental perene, quando as plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação (STAPPER et alii, 1985).

Em casos extremos, PIERIK (1987) sugere que sejam mantidas plantas matrizes em casa de vegetação com os seguintes cuidados:

- prevenção de infestação por insetos, evitando a transmissão de doenças;
- prevenção ao ataque de fungos e bactérias, utilizando-se fungicidas sistêmicos e bactericidas;
- controle da umidade, para evitar a reprodução e disseminação de microorganismos.

Outros autores (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990) sugerem ainda outras medidas na manutenção de plantas matrizes em casa de vegetação, tais como utilização de substrato esterilizado, de preferência sobre bancadas e com irrigação apenas no substrato sem molhar as folhas.

O estado fisiológico também influencia o estabelecimento da espécie "in vitro". GEORGE & SHERRINGTON (1984) afirmam que os melhores explantes são obtidos de plantas matrizes em crescimento ativo e sem estresse. Em casa de vegetação, é possível homogeneizar os explantes, quanto ao estágio de desenvolvimento e, além disso, conforme GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), novas brotações podem ser estimuladas continuamente, com o controle de fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura, independentemente da época do ano.

Outro problema no estabelecimento "in vitro" de espécies lenhosas está relacionado com a oxidação fenólica. Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), a oxidação de compostos fenólicos ocorre em tecidos lesionados devido à ação de enzimas oxidases. As extremidades dos tecidos escurecem rapidamente e são

liberados para o meio de cultura produtos tóxicos da oxidação. Esse problema é particularmente agravado no isolamento de explantes de espécies lenhosas, devido à maior síntese de lignina nos tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Várias medidas são citadas por GEORGE & SHERRINGTON (1984) na prevenção à oxidação fenólica.

A remoção de compostos fenólicos produzidos pode ocorrer através de água corrente como pré-tratamento de explantes e utilização de carvão ativado ou antioxidantes no meio de cultura.

O período de manutenção dos explantes em água é variável conforme a espécie. Assim, em *Riccia frostii* AUST., os explantes permaneceram por um período de três a quatro horas (VASHISTHA & CHORPA, 1987) enquanto que em *Prunus serotina* EHRH. o tratamento por uma hora em água corrente foi suficiente (TRICOLI et alii, 1985).

O antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) tem sido bastante empregado. CARVALHO et alii (1990) controlaram a oxidação em explantes de *Eucalyptus grandis* em até 90% suplementando com PVP 250mM em meio sólido. Na micropropagação de híbridos da mesma espécie, WARRAG et alii (1990) mantiveram as culturas iniciais no escuro em meio isento de reguladores obtendo bons resultados. Em *Eucalyptus tereticornis*, SUBBAIAH et alii (1990) preveniram a oxidação fenólica utilizando PVP a 12,5mM, cerca de 20 vezes menor a concentração utilizada por CARVALHO et alii (1990).

O carvão ativado tem sido empregado com êxito em várias espécies. No entanto, apesar da adsorção de compostos fenólicos

tóxicos e de impurezas do agar, também adsorve componentes do meio como vitaminas, citocininas, e auxinas.

DRUART & WULF (1993) verificaram que a hidrólise da sacarose na autoclavagem aumentou de 10 para 95% na presença de carvão ativado 1%. NISSEN & SUTTER (1990) por sua vez, avaliaram a estabilidade das auxinas IAA e IBA na presença do carvão ativado, constatando adsorção de 97% desses reguladores de crescimento quando adicionado ao meio na concentração de 5%.

Além da remoção dos compostos fenólicos, GEORGE & SHERRINGTON (1984) citam a modificação do potencial redox com antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína, mercaptoetanol, etc.) no meio de cultura ou em pré-tratamento de imersão dos explantes.

Para a inativação das enzimas oxidases são recomendados agentes quelantes como dietilditiocarbamato, EDTA, etc., e para a redução de suas atividades, diminuição de pH, meio de cultura, isento de reguladores, baixa concentração de sacarose e manutenção da cultura em ambiente escuro nos estádios iniciais. PIERIK (1987) cita ainda como medida de controle à oxidação fenólica, a adição de aminoácidos glutamato, arginina e asparagina ao meio de cultura, uso de meio líquido que dilui facilmente os produtos tóxicos, bem como a redução da concentração de sais desse meio. Na fase de iniciação da cultura "in vitro" de coqueiro, SIQUEIRA & INOUE (1991) utilizaram ácido ascórbico e ácido cítrico, além de PVP, alcançando 50% de explantes saudáveis. Essa taxa de estabelecimento foi aumentada, quando a fase inicial se desenvolveu em meio líquido.

A influência dos antioxidantes PVP e ácido cítrico no enraizamento de *Malus domestica* BORKH. é demonstrada por STANDARDI & ROMANI, (1990).

Conforme DEBERGH & READ (1991), alguns micronutrientes como Mn e Cu podem estimular a oxidação de fenóis e portanto meios com baixa concentração desses nutrientes são recomendados.

Em função das várias técnicas disponíveis na literatura, procurou-se, com este trabalho definir uma metodologia adequada para o estabelecimento "in vitro" de Sarandi, da procedência dos explantes até condições de crescimento "in vitro".

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

No estabelecimento "in vitro", utilizaram-se brotações de plantas adultas (condição de campo) e de estacas mantidas em casa de vegetação.

Durante e após a coleta no campo, as brotações foram mantidas em sacos plásticos com papel umedecido, evitando a desidratação dos tecidos no período que antecedeu o experimento. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã em brotações com até 100mm de comprimento. As brotações provenientes de estacas em casa de vegetação foram imediatamente utilizadas após a coleta, não necessitando, portanto, desse acondicionamento. Procedeu-se a toilette homogeneizando-se o comprimento do explante em 30 ± 2 mm.

Os experimentos seguiram delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, envolvendo diferentes fatores,

sendo cada tratamento constituído de quatro repetições, com cinco tubos de ensaio (150 x 20mm), por repetição.

Os explantes de plantas adultas, inicialmente, foram mantidos por 12 (doze) horas em água corrente, seguidos de um período de oito dias no escuro após inoculação em meio MS e WPM. Também avaliou-se o estabelecimento dos explantes quando submetidos aos efeitos isolados ou em interação dos fatores tempo de imersão em água corrente (duas, 12, 18 e 24 horas), luminosidade (claro/escuro - seis dias) após inoculação e meios de cultura (MS e WPM). Com brotações coletadas em estacas mantidas em casa de vegetação realizaram-se dois experimentos. No primeiro, testou-se a influência do pré-tratamento do explante em água corrente (períodos de 20 minutos, duas e 12 horas e testemunha), o efeito da utilização de antioxidantes - polivinilpirrolidona (PVP 40 - 25mM); ácido ascórbico (1,8mM) + cisteína (3,5mM) e testemunha - no meio de cultura WPM, e a interação desses fatores. Em outro experimento, o tipo de explante foi avaliado quanto ao estabelecimento, a partir da sua posição na brotação (apical e basal) e a manutenção ou não de folhas pela metade.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estabelecimento "in vitro" de explantes provenientes de plantas adultas, após imersão por 12 horas em água corrente seguidos de oito dias no escuro após a inoculação, é apresentado na Figura 24. No meio WPM, que apresenta menor concentração de sais, a porcentagem de oxidação foi próxima à obtida em meio MS,

porém maior porcentagem de necrose apical foi observada nos explantes. A Figura 24 mostra que a maior perda no estabelecimento foi devida a problemas de contaminação. No experimento envolvendo diferentes tempos de imersão, luminosidade e meios de cultura, verificou-se que essas práticas, isoladas ou em combinação, não foram suficientes ao estabelecimento "in vitro" (Figura 25). Para esse tipo de explante em que não havia um controle da idade, o meio WPM, embora com menor concentração de sais, conforme recomendação de PIERIK (1987), apresentou porcentagens de oxidação próximas daquelas obtida em meio MS. Outras medidas citadas por WARRAG et alii (1990), como manutenção das culturas iniciais no escuro em meio isento de reguladores, também não foram suficientes ao controle da oxidação. Da mesma forma, a imersão dos explantes em água corrente sugerida por GEORGE & SHERRINGTON (1984) não mostrou efeito.

Apesar do insucesso dessas tentativas, poderão ser desenvolvidos estudos para viabilizar o estabelecimento "in vitro", a partir de explantes provenientes do campo, tais como diminuição da concentração de micronutrientes nos meios de cultura, como Mn e Cu que, segundo DEBERGH & READ (1991), estimulam a oxidação de fenóis. Nesse sentido, CALDAS & TAKETONI (1993), após retirar a fonte de Fe em diferentes meios de cultura, eliminaram a oxidação de explantes de jaboticabeira e goiabeira, independentemente do meio utilizado. Esses mesmos autores também comentam que a melhor desinfestação ocorreu com adição de benomyl no meio e com tratamento térmico (40°C por 30 minutos), o que pode vir a ser testado no controle à contaminação nessa espécie.

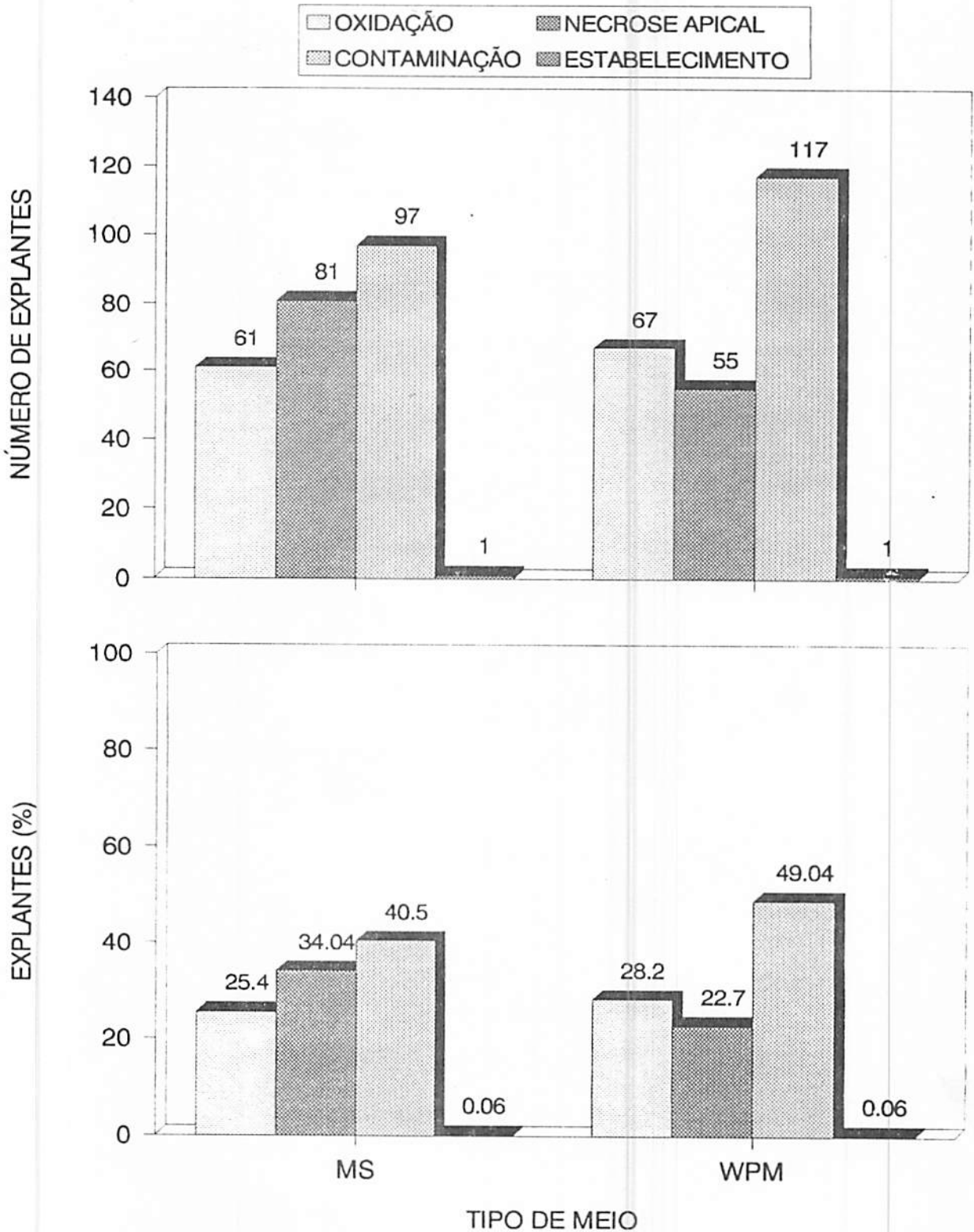


FIGURA 24. Número médio e porcentagem de explantes com oxidação, necrose apical, contaminação e estabelecidos em meio MS e WPM de plantas adultas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após imersão por 12 horas em água corrente e manutenção por oito dias no escuro após inoculação. ESAL, Lavras - MG, 1993.

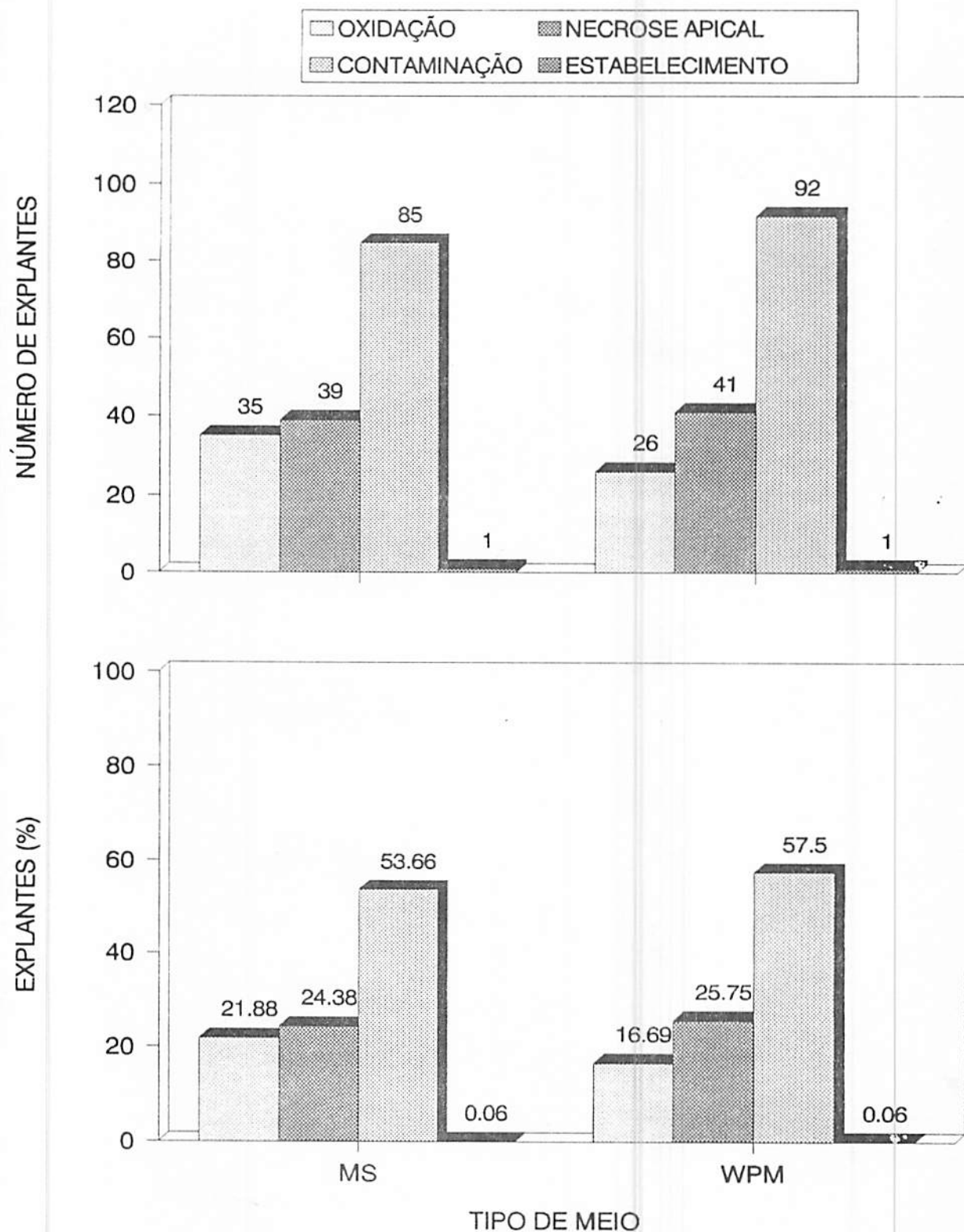


FIGURA 25. Número médio e porcentagem de explantes com oxidação, necrose apical, contaminação e estabelecimento em meio MS e WPM de plantas adultas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), após manutenção por diferentes períodos em água corrente e luminosidade após a inoculação (claro/escuro - seis dias). ESAL, Lavras - MG, 1993.

O estabelecimento de explantes provenientes de estacas mantidas em casa de vegetação não foi influenciado pelos fatores tempo de imersão em água corrente e antioxidantes, muito embora vários trabalhos (CARVALHO et alii, 1990; SUBBAIAH et alii, 1990; SIQUEIRA & INOUE, 1991) demonstrem o efeito dos antioxidantes no controle à oxidação. Os explantes, como pertenciam à brotações novas (aproximadamente 20 dias), aparentemente não estavam em processo de lignificação ou síntese de pigmentos e outras substâncias fenólicas, e portanto, a oxidação desses compostos ocorreu em menor intensidade dispensando práticas de controle, tais como diferentes períodos de imersão e antioxidantes. A média geral de contaminação de explantes diminuiu para 28,14% e os sintomas de necrose apical e oxidação fenólica desapareceram, o que está de acordo com PIERIK (1987), que atribui maior contaminação em explantes provenientes do campo. Em função desses resultados, a porcentagem de explantes estabelecidos aumentou para 70,25%. A Figura 26 compara esses resultados com os obtidos em explantes provenientes de plantas adultas. Apesar do aumento da porcentagem de estabelecimento, a porcentagem de contaminação poderia diminuir com práticas adicionais tais como as citadas por CALDAS & TAKETONI (1993), tendo em vista que o tratamento com fungicidas foi realizado apenas em casa de vegetação e não no cultivo "in vitro".

Na determinação do tipo adequado do explante, constatou-se que o fator posição influenciou a ocorrência de necrose apical e o estabelecimento dos explantes. Os explantes basais apresentaram maior porcentagem de estabelecimento (89,67%), com menor porcentagem de explantes com necrose apical

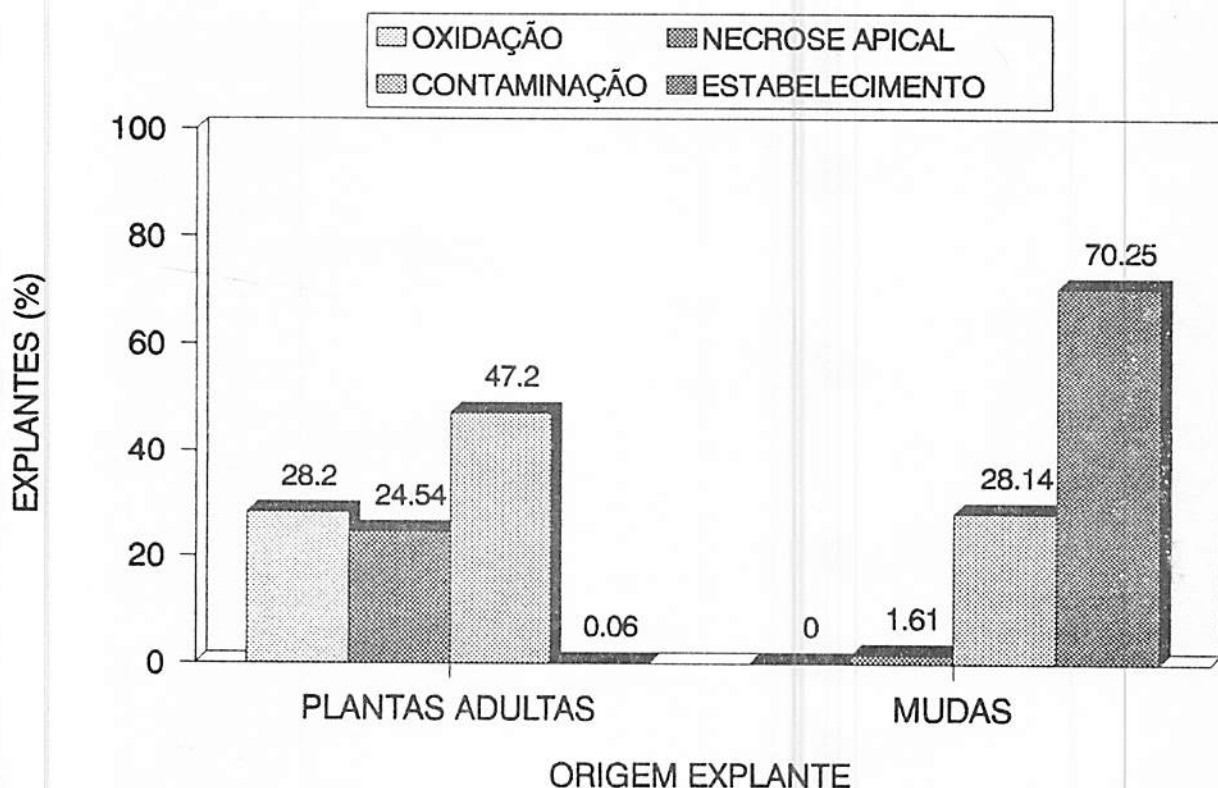


FIGURA 26. Porcentagem de explantes oxidados, com necrose apical, contaminados e estabelecidos de plantas adultas e de estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) mantidas em casa de vegetação. ESAL, Lavras - MG, 1993.

(1,59%). Além dessas médias, a Figura 27 mostra ainda a alta ocorrência de necrose em explantes apicais (74,86%) e, em consequência, menor a porcentagem de estabelecimento (22,55%). A atuação dos protetores de auxinas demonstrada por MATO & VIEITEZ (1986) nos explantes da região basal de brotações de *Castanea sativa* pode ter contribuído para o maior estabelecimento através da inibição da oxidação do IAA e provavelmente outras oxidações na diferenciação. Outro fator parece ter sido determinante, pois na região apical, os tecidos eram mais frágeis e talvez a assepsia adotada tenha influenciado na porcentagem de necrose apical.

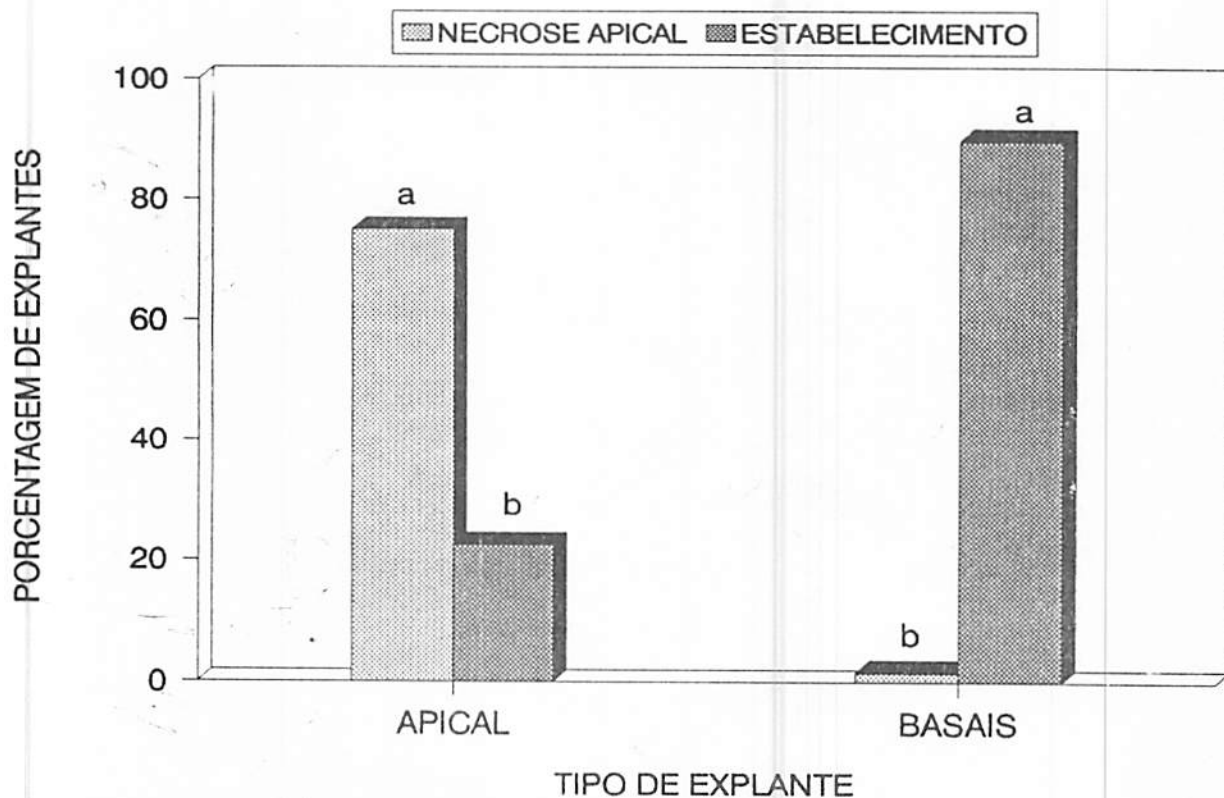


FIGURA 27. Porcentagem de explantes com necrose apical e estabelecimento de explantes apicais e basais de estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

Não houve influência da parte aérea nessas características avaliadas. Isso se deve possivelmente, ao suprimento de nutrientes orgânicos e minerais pelos meios de cultura.

Quanto à emissão de folhas, apenas em explantes basais isso foi observado. Os explantes em que não foram mantidas as folhas no momento da inoculação apresentaram, em média, maior número de folhas emitidas (Figura 28). Os explantes basais, dentre outras características que favorecem o estabelecimento, talvez apresentem, à nível de sistema vascular, melhor diferenciação contribuindo portanto, à emissão de folhas. O maior número de folhas emitidas em explantes sem folhas pode estar

relacionado à necessidade de desenvolvimento da parte aérea após a retomada dos processos metabólicos. Nos explantes que mantiveram as folhas, houve, em parte, sua manutenção e em outros casos, substituição, tendo em vista que o cultivo "in vitro" apresenta uma condição ambiental de crescimento (temperatura, luminosidade, nutrientes, etc.) diferente daquela verificada em casa de vegetação. Outros experimentos com condições controladas talvez expliquem a morfogênese.

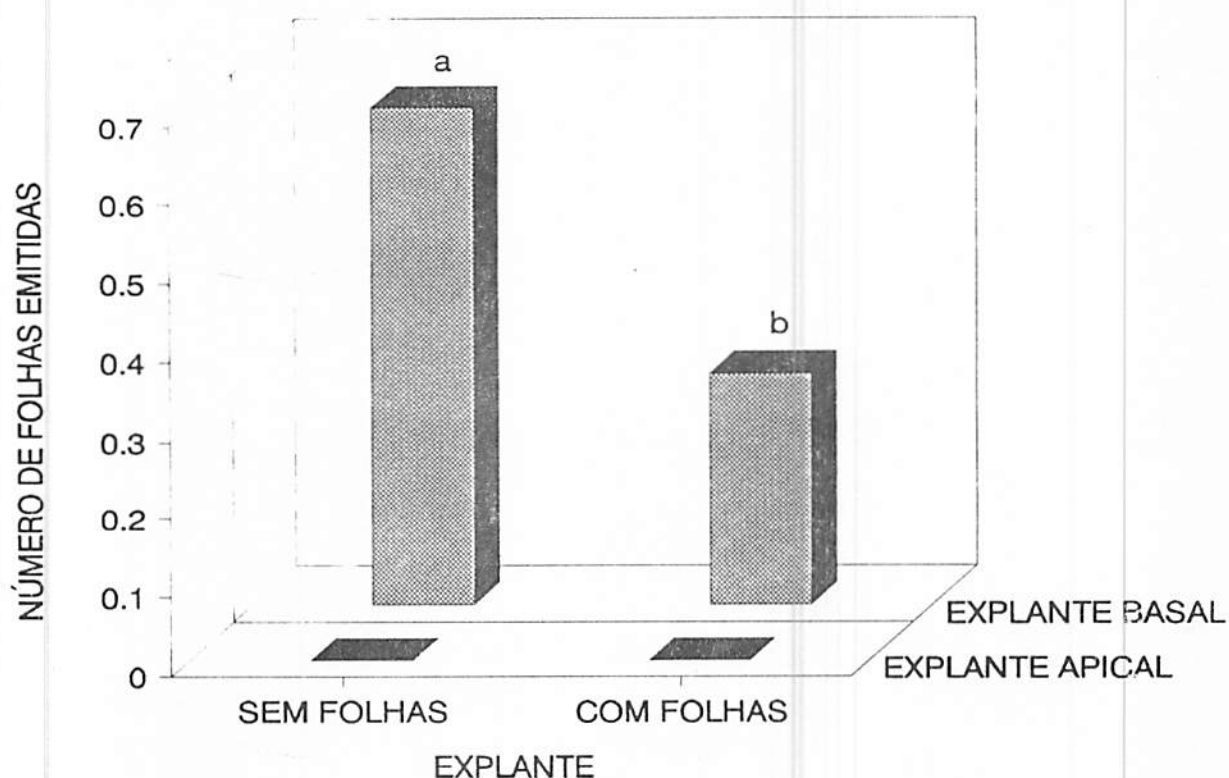


FIGURA 28. Número médio de folhas emitidas em explantes apicais e basais, com e sem folhas, proveniente de mudas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), mantidas em casa de vegetação. ESAL, Lavras - MG, 1993.

4.4. CONCLUSÕES

Os explantes provenientes de plantas adultas apresentaram um estabelecimento muito inferior aos explantes coletados de estacas mantidas em casa de vegetação. Além disso, a porcentagem de contaminação foi reduzida de 47,20 para 28,14%. A oxidação fenólica não representou problemas ao estabelecimento dos explantes obtidos de estacas. Diante desses resultados genéricos, pode-se concluir que a padronização do tamanho das brotações e o controle fitossanitário nas estacas são aspectos importantes que devem ser considerados no sentido de proporcionar maior porcentagem de explantes estabelecidos "in vitro".

**CAPÍTULO V - ENRAIZAMENTO "IN VITRO" DE MICROESTACAS E
MICROPROPAGAÇÃO DE GEMAS AXILARES DE SARANDI
(*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var.
Schottiana)**

RESUMO

Objetivando definir uma metodologia para multiplicação e enraizamento "in vitro" realizaram-se quatro experimentos. Na multiplicação, estudou-se o efeito de benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0; 2,2; 4,4 e 8,9 μ M em meios de cultura MS e WPM, utilizando um explante com uma gema por tubo de ensaio. O mesmo tipo de explante foi inoculado em número de 10 por frasco de 200mL com meio MS, suplementado com BAP (0; 0,04; 0,4 e 4,4 μ M) e ácido naftalenacético (NAA) nas concentrações 0; 0,1; 0,5 e 5 μ M. O último experimento envolveu o regulador BAP (0; 1,1 e 2,2 μ M) e o hormônio ácido giberélico (GA₃) a 0; 0,7 e 1,4 μ M, juntamente com carvão ativado (1%). Utilizou-se um explante de 40mm de comprimento, por tubo de ensaio. A indução da rizogênese "in vitro", por sua vez, foi testada em meio de cultura MS e WPM, líquido e sólido (0,6% ágar), suplementados com 0; 0,5; 2,5; 4,9 e 9,8 μ M de ácido indolbutírico (IBA). Os melhores resultados na multiplicação de gemas axilares ocorreram no terceiro

experimento, em que o GA₃ apresentou efeito linear até 1,1 μ M no número de explantes alongados, comprimento da parte aérea e número de gemas. O BAP influenciou essas características apenas quando o carvão ativado estava ausente no meio, neste caso 1,1 μ M foi a melhor concentração desse regulador. Quanto ao enraizamento, as maiores porcentagens de explantes enraizados e número de raízes foram obtidas em meio WPM, suplementado com 4,9 μ M de IBA, independentemente da presença de ágar.

5.1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVO

A capacidade de regeneração de tecidos "in vitro" é variável de acordo com o genótipo, condições ambientais e estágio de desenvolvimento das plantas matrizes. Segundo PIERIK (1987), as espécies lenhosas são mais difíceis de clonar "in vitro" que espécies herbáceas, devido à maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos tecidos, dificuldade às vezes, de rejuvenescimento, menor taxa de multiplicação, dormência das gemas, maior concentração de fenóis e dificuldade de se manter plantas matrizes em casa de vegetação.

A micropropagação "in vitro" de espécies florestais pode ser obtida através da multiplicação de gemas axilares, produção de gemas adventícias, ou ainda, a partir da embriogênese somática. A micropropagação via organogênese, que corresponde aos dois primeiros métodos anteriormente citados, é a mais empregada na regeneração de espécies lenhosas "in vitro" (THORPE et alii, 1991). Diferentes estádios correspondem à micropropagação na organogênese, ou seja, estabelecimento e/ou indução, proliferação

da parte aérea (multiplicação), alongamento enraizamento, e aclimatação.

O tipo, idade e tamanho dos explantes, época em que foram coletados e qualidade da planta matriz, são fatores que influenciam esses diferentes estádios da micropropagação.

IAPICHINO et alii (1991) estudaram em híbrido do gênero *Rhododendron*, o tipo de explante (apical, segmento caulinar e secção foliar) e sua procedência (plantas matrizes em casa de vegetação ou de culturas "in vitro"). Apenas culturas "in vitro" regeneraram novas plantas nos diferentes tipos de explantes, sendo que secções foliares mostraram-se superiores (77%). Em *Acacia auriculiformis*, o tipo de explante foi determinante na multiplicação de gemas axilares. Nesse trabalho, MITTAL et alii (1989) regeneraram novas plantas apenas a partir de gemas axilares, não obtendo resultados satisfatórios quando folhas de plântulas, cotilédones e segmentos de hipocótilo foram utilizados como explantes.

Os efeitos da época do ano e da posição do explante na planta matriz foram avaliados por LIN et alii (1991) para multiplicação de *Pinus ponderosa* Dougl ex Laws. Os explantes coletados em outubro formaram gemas axilares enquanto que a coleta realizada em fevereiro resultou em grande produção de calos. Os autores concluíram ainda que explantes da parte superior das árvores proporcionaram maior número de gemas axilares na multiplicação "in vitro" que aqueles localizados na região basal das matrizes.

A influência do tamanho do explante foi estudado por LAUZER et alii (1992) na propagação "in vitro" de inhames

selvagens (*Dioscorea abyssinica* Hoch. e *D. mangenotiana* Miége), em que verificaram que segmentos menores que 5mm foram menos apropriados à micropropagação.

Na fase de multiplicação propriamente dita, os componentes de meio de cultura, condições de ambiente e manipulação dos explantes na repicagem das culturas podem ser otimizados para que se obtenha melhores resultados.

ZHANG & STOLTZ (1989) verificaram que o aumento da concentração de sacarose (131,5mM) favoreceu a multiplicação "in vitro" de *Euphorbia fulgens* Karw ex Klostch, contrariamente, o mio-inositol reduziu a multiplicação em concentração maior que 1,1mM, e não teve efeito quando presente em 0,6mM.

O aumento na concentração de sacarose no meio de multiplicação também foi comparado em *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Neste trabalho, 72,9mM foi suficiente para dobrar a multiplicação obtida em 58,3mM e torná-la quatorze vezes superior à concentração normalmente utilizada que é de 87,5mM (DUNSTAN et alii, 1992). Além da sacarose, a adição de nitrato de amônia aumentou em 2,5 vezes a multiplicação dos explantes. Normalmente, o nitrato de amônio está ausente no meio de multiplicação, devido principalmente à problemas de vitrificação. SELBY et alii (1990) relatam que o NH_4 foi responsável pela necrose dos tecidos e inibição da indução das gemas de *Picea sitchensis*. Nesse sentido, LININGTON (1991) empregou meio WPM sem nitrato de amônio, na propagação "in vitro" de espécies do gênero *Dipterocarpus*. Com relação ao pH, os autores afirmam que em pH 5,3 houve maior proliferação, enquanto que valores inferiores de pH estimularam o crescimento da parte aérea. O efeito do pH

inicial (anterior à autoclavagem) ajustado entre 2,6 e 5,7 foi observado por LEIFERT et alii (1992) em diversas espécies cultivadas "in vitro", constatando-se diferentes requerimentos de pH na obtenção de melhores taxas de crescimento.

As citocininas correspondem aos reguladores de crescimento mais empregados na quebra da dominância apical em gemas axilares. Diferentes tipos e concentrações de citocininas tem sido utilizadas na proliferação de partes aéreas. Apesar de a 6-benzilaminopurina ser a citocinina mais empregada, bons resultados têm sido obtidos com outros compostos como tidiazuron (TDZ), cinetina e zeatina. ELLIS et alii (1991) compararam o efeito da BAP, zeatina e TDZ na formação de gemas adventícias em *Picea glauca*. A maior sobrevivência e desenvolvimento da parte aérea ocorreu quando se utilizaram a combinação de zeatina (50 μ M) e TDZ (0,01 μ M). O TDZ foi mais eficiente na embriogênese somática de *Acer saccharinum* do que a BAP, cinetina e 2-isopenteniladenina (PREECE et alii, 1991). A cinetina por sua vez, proporcionou a formação de gemas axilares em *Populus deltoides* (COLEMAN & ERNST, 1990).

A influência da BAP tem sido discutida em diversos trabalhos. HAMMATT & RIDOUT (1992) multiplicaram *Fraxinus excelsior* a partir de gemas axilares em meio suplementado com BAP. No entanto, o excesso de citocinina pode ser tóxico ao desenvolvimento das culturas. Esta toxidez é verificada através de sintomas como encurtamento de entrenós, diminuição do tamanho das folhas, entumescimento e vitrificação. JOHNSON et alii (1991) verificaram que o aumento da concentração da BAP (3 a 6,6 μ M) levou a formação de maior número de brotações em *Quercus lobata*,

porém, os entrenós eram mais curtos e com maior número de folhas. Quando uma menor concentração ($1,3\mu\text{M}$) foi adicionada ao meio, os entrenós aumentaram no comprimento, permanecendo com apenas duas ou três folhas. Em *Pinus caribaea* Morelet, altas concentrações de BAP e tempo de exposição elevado foram responsáveis pela menor taxa de sobrevivência da espécie ao cultivo "in vitro" (SATURNINA & NANCY, 1993).

As auxinas são também empregadas ao meio de multiplicação em adição às citocininas com objetivo de estimular o desenvolvimento da parte aérea e/ou anular o efeito inibitório das citocininas. Geralmente, as auxinas são adicionadas em baixas concentrações, sendo o NAA mais empregada (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Combinações de BAP e NAA são citadas, por exemplo, na multiplicação de espécies florestais como *Populus tremula* (WANN et alii, 1988), *Pinus ponderosa* (LIN et alii, 1991) e *Pinus virginiana* Mill. (CHANG et alii, 1991).

Embora com menor frequência, as giberelinas são utilizadas na fase de multiplicação devido ao efeito no alongamento de partes aéreas. OFFORD et alii (1992) suplementaram o meio de cultura com BAP ($1,25\mu\text{M}$) e GA_3 ($1,0\mu\text{M}$) na multiplicação de *Telopea speciosissima* R. Br.

Alguns trabalhos relatam o uso de citocininas, giberelinas e auxinas, nessa etapa da micropropagação. Assim, NADEL et alii (1991) obtiveram, a partir da combinação BAP, IAA e GA_3 , explantes mais alongados e com maior expansão foliar em *Fagus sylvatica* L.

Além dos reguladores de crescimento, o meio de multiplicação poderá conter carvão ativado, conforme mencionado

para *Pinus canariensis* (PULIDO et alii, 1991), *Pinus strobus* (KAUL, 1990), *Dipterocarpus alatus* e *D. intricatus* (LININGTON, 1991) e *Quercus robur* (VOLKAERT et alii, 1990).

Outro estágio da micropropagação via organogênese diz respeito ao enraizamento "in vitro" em que as características dos explantes, condições de ambiente e meio de cultura apresentam grande influência. Um tamanho mínimo é necessário para manter a uniformidade e altas taxas de enraizamento devido principalmente à maior sobrevivência. Com relação a idade e estágio de desenvolvimento da planta matriz, na maioria dos casos, a indução à rizogênese é maior em plantas jovens com crescimento vegetativo (PIERIK, 1987). Dentro de espécies e cultivares, diferentes respostas à indução ao enraizamento são verificadas e, além disso, na própria planta, a idade dos tecidos em diferentes regiões determina diferenças na capacidade de regeneração dos tecidos.

Os efeitos da luz no enraizamento "in vitro" foram estudados dentre várias espécies, em macieira, ameixeira e pessegueiro em relação aos efeitos benéficos do ambiente escuro por determinados períodos, após a inoculação. FUERNKRANZ et alii (1990) avaliaram o enraizamento de *Prunus serotina* Ehrh., após tratamentos com diferentes qualidades de luz. A luz branca apresentou efeito negativo nas características avaliadas (porcentagem de enraizamento, número de raízes por explante e peso de matéria seca das raízes e parte aérea). Entre 15 e $22\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ a luz azul retardou a formação de raízes, sob $36\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ inibiu completamente. Os explantes tratados com luz

amarela apresentaram, por sua vez, os melhores resultados nas características citadas.

A participação de compostos fenólicos no enraizamento de *Vitis vinifera* L. cv. Albariño é relatado por MATO et alii (1988). Alguns compostos fenólicos atuaram como protetores de auxinas em razão do aumento de peroxidases com atividades oxidativas do ácido indolilacético (IAA). LEE (1980), trabalhando com peroxidases, evidenciou que, em geral, monofenóis e m-difenóis causaram estímulo à oxidação do IAA, enquanto difenóis e polifenóis inibiram a mesma reação.

Os níveis endógenos e exógenos de aminoácidos podem influenciar no enraizamento. Em *Pinus pinaster* foram avaliados os efeitos do glutamato como fonte de nitrogênio (FAYE et alii, 1989). Os melhores resultados foram obtidos quando o meio de cultura continha nitrato, sendo que o glutamato inibiu completamente o enraizamento. ORLIKOWSKA (1992) afirma que entre os vários aminoácidos envolvidos no enraizamento, a arginina é mais eficiente. O autor constatou que em porta-enxerto de macieira, a influência desse aminoácido foi maior quando o IBA e o nitrogênio estavam ausentes ou em baixas concentrações no meio, além disso, o número de raízes foi resultado da interação entre arginina, floroglucinol e ambiente escuro.

THORPE et alii (1991) afirmam que meios de cultura como Wood Plant Medium (WPM) e Cresshoff & Doy (CD), que apresentam baixa concentração de sais, aumentam a porcentagem de enraizamento. A alta concentração salina prejudica todas as fases do enraizamento, especialmente a de crescimento de raízes. Além

de diferentes meios, é comum a diluição de meio Murashige & Skoog em 50%.

Em espécies lenhosas, o meio líquido tem sido empregado em detrimento do meio sólido em função da menor concentração de oxigênio e diluição de produtos da oxidação fenólica. Há também uma vantagem econômica já que os custos do meio (sem ágar) são menores e o tempo necessário para preparar o meio é diminuído. RATHORE et alii (1991) e LININGTON (1991) relatam em seus trabalhos o enraizamento de explantes em meio isento de ágar.

A atuação das auxinas no enraizamento "in vitro", de acordo com o tipo e concentrações no meio de cultura, corresponde talvez ao fator de maior importância. As auxinas mais utilizadas são o IAA, IBA e NAA, sendo que o IBA e NAA têm preferência, devido aos problemas de catabolismo do IAA.

A indução à rizogênese "in vitro" pode ser realizada através de auxinas suplementadas ao meio (individualmente ou em combinação de duas ou mais auxinas) ou pré-tratamento com imersão em soluções concentradas. BANKO & STEFANI (1989) promoveram o enraizamento de *Oxydendron arboreum* com meio WPM contendo IBA. Espécies e híbridos de eucaliptos foram enraizadas por ROUX & STADEN (1991) utilizando a mesma auxina mas em meio MS, com a metade da concentração de sais. As auxinas IBA e NAA foram testadas com sucesso por UPADHYAYA et alii (1985) em *Chrysothamnus nauseosus* (Pallas) Britt. No entanto, o comprimento e o número médio de raízes foi superior em meio contendo IBA.

O pré-tratamento dos explantes em soluções com IBA foi realizado em *Quercus crispula* Blume. (SENGI, 1990) e *Pinus halepensis* Mill. (LAMBARDI et alii, 1991), proporcionando bom

enraizamento, o que não aconteceu em *Pinus strobus* L. (KAUL, 1990), em que o pré-tratamento com NAA e IBA não teve efeito.

Outras espécies enraizam-se facilmente em meio de cultura sem os reguladores de crescimento, conforme relatado por CACHO et alii (1992) e FIGUEIREDO & ESQUIBEL (1991) no enraizamento "in vitro" de *Digitalis thapsi* L. e *Datura insignis* Barb. Rodr., respectivamente.

Portanto, nesse trabalho procurou-se definir as condições ideais para a micropropagação de Sarandi nas etapas de multiplicação de gemas axilares e enraizamento de microestacas "in vitro".

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Enraizamento de microestacas "in vitro"

Os explantes utilizados no enraizamento "in vitro" partiram de brotações obtidas do enraizamento de estacas, conforme metodologia descrita no capítulo II.

Após a coleta, as brotações com até 100mm de comprimento permaneceram em água corrente durante um período de 12 horas. Em seguida, retirou-se aproximadamente 20mm da região apical, padronizando-se o comprimento do explante em 30mm, mantendo-se as folhas pela metade.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 5 com quatro repetições por tratamento (quatro tubos/repetição), correspondendo aos seguintes fatores: meios de cultura (MS - Murashige & Skoog e WPM - Wood Plant Medium), meios líquido e sólido (0,6% de ágar) com

0; 0,5; 2,5; 4,9 e 9,8 μ M de ácido indolbutírico, respectivamente. Todos os tratamentos tiveram pH ajustado em 5,8. Os meios foram então esterilizados em autoclave de vapor úmido com 121°C de temperatura e uma atmosfera de pressão por 20 minutos.

A inoculação dos explantes ocorreu em fluxo laminar, após assepsia com imersão em álcool 70% por 20 segundos, água sanitária 20%, durante 10 minutos e, finalmente, em água autoclavada por quatro vezes. Em meio líquido, os explantes foram mantidos em "pontes" de papel de filtro evitando a imersão completa desses.

O experimento foi mantido por 30 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e irradiância aproximada de $40\mu\text{molcm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Decorrido esse período, avaliaram-se o número de microestacas enraizadas e número de raízes por microestacas.

Multiplicação "in vitro" de gemas axilares

Os explantes utilizados na multiplicação "in vitro" foram procedentes de estacas mantidas em casa de vegetação. Nos experimentos realizados, adotou-se a metodologia descrita no capítulo III com relação ao período em água corrente, assepsia, bem como tempo de permanência e condições na sala de crescimento. O pH do meio foi ajustado em 5,8 em todos os tratamentos dos experimentos, e posteriormente esterilizados em autoclave de vapor úmido por 121°C e uma atmosfera de pressão por 20 minutos.

Experimento I: o efeito da benzilaminopurina (BAP) em tubos de ensaio (150 x 20mm) foi avaliado, utilizando-se explantes com apenas uma gema lateral nos meios de cultura. As

concentrações de BAP nos meios MS e WPM foram 0; 2,22; 4,44 e 8,88 μ M, correspondendo a oito tratamentos com cinco repetições (seis tubos/repetição), resultante do esquema fatorial 2 x 4 no delineamento inteiramente casualizado.

Experimento II: estudou-se a influência da interação entre as concentrações do ácido naftalenacético (0; 0,1; 0,5 e 5,4 μ M) e da belzilaminopurina (0; 0,04; 0,4 e 4,4 μ M) na multiplicação em frascos (200mL) contendo meio MS. Foram inoculados 10 explantes, também com uma gema lateral, por frasco, sendo cada tratamento composto por quatro repetições (dez explantes/repetição). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4.

Experimento III: realizou-se experimento em esquema fatorial 2 x 3 x 3, com quatro repetições por tratamento (cinco tubos/repetição), correspondendo respectivamente, a presença ou não de carvão ativado (0,1%) no meio MS e à interação da benzilaminopurina e ácido giberélico, ambos nas concentrações de 0; 1,1 e 2,2 μ M e 0; 1,3 e 2,7 μ M, respectivamente. Os explantes, dessa vez com três a quatro gemas laterais e comprimento de 35 a 40mm, foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 20mm) contendo 10mL de meio de cultura.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Enraizamento de microestacas "in vitro"

A interação entre concentrações de ácido indolbutírico e meio de cultura afetou significativamente a porcentagem de

explantes enraizados "in vitro", bem como o número de raízes formadas.

A Figura 29 mostra que, no meio MS, não houve formação de raízes. Porém, quando o meio WPM, acrescido de $4,9\mu\text{M}$ de IBA, foi utilizado, 37,8% do total de explantes enraizaram e 54,20% sobreviveram. Esses resultados concordam com a recomendação de THORPE et alii (1991), quanto ao emprego, em espécies lenhosas, de meio com baixas concentrações de sais. Nessa condição também obteve-se, em média, o maior número de raízes por explante (1,51). Portanto, os melhores resultados podem estar relacionados com a menor concentração de nitrato de amônio (NH_4/NO_3) ou sacarose no meio WPM ou ainda, a eliminação do suprimento de nitrato através do potássio (KNO_3), substituído pelo sulfato de potássio (K_2SO_4).

Apesar de o enraizamento "in vitro" ter ocorrido, sugere-se otimizar os tratamentos através de um melhor ajuste na relação NH_4/NO_3 e concentração de sacarose. Outra fonte nitrogenada como o aminoácido glutamato pode vir a ser testada, conforme FAYE et alii (1989), já que em estudos preliminares, não houve efeito favorável da arginina. Além desses estudos talvez seja oportuno avaliar o efeito de diferentes auxinas submetidas a diferentes qualidades de luz, tendo em vista os resultados obtidos por FUERNKRANZ et alii (1990) com a utilização de luz amarela no enraizamento "in vitro" de *Prunus serotina*.

Em ambas as características, a presença do ágar não mostrou efeito significativo, possivelmente, devido à não ocorrência de oxidação na base dos explantes.

$$\begin{aligned}
 Y1: & 0,768180 + 0,0642815X - 0,00609113X^2 & R^2 & = 0,5974 \\
 Y2: & 1,049371 + 0,1974099X - 0,01809247X^2 & R^2 & = 0,8443 \\
 Y3: & 1,197556 - 0,0210793X & R^2 & = 0,9408
 \end{aligned}$$

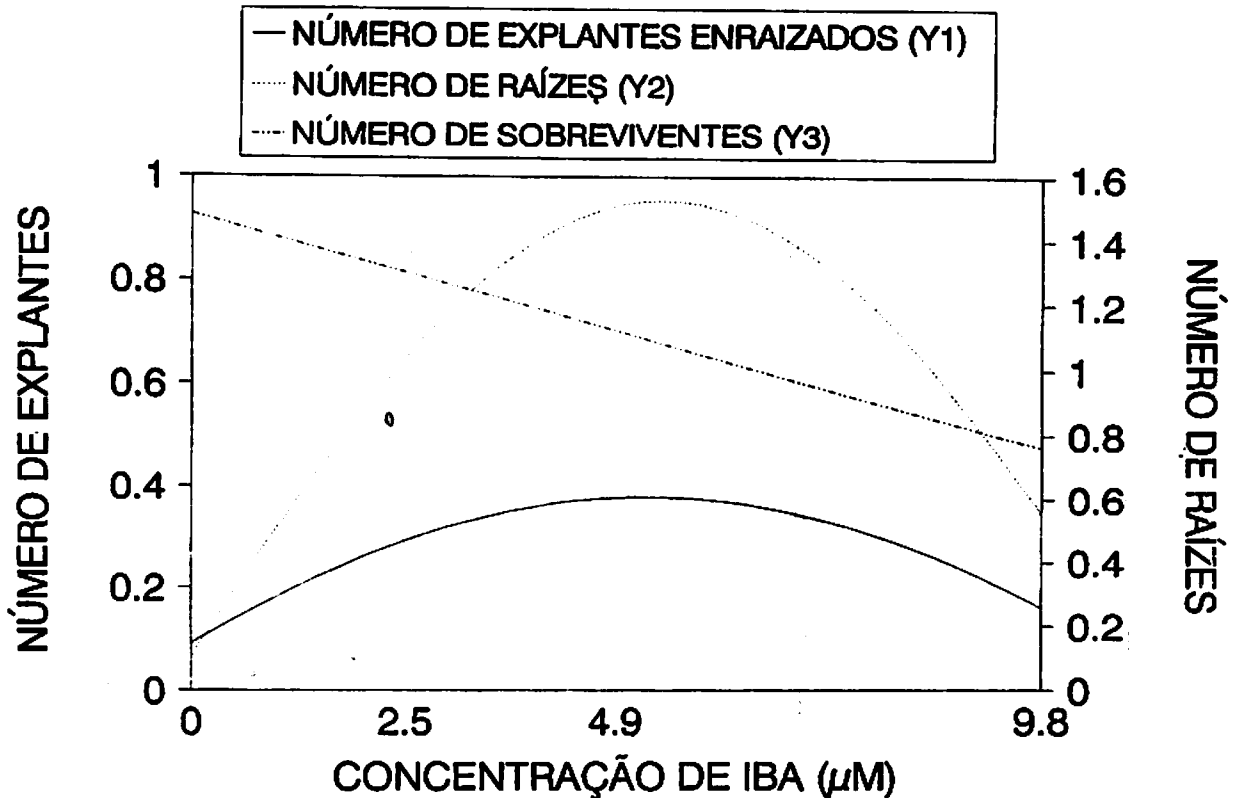


FIGURA 29. Número médio de explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) enraizados em meio WPM contendo diferentes concentrações de IBA. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Em relação à sobrevivência desses explantes, verificam-se pelos resultados apresentados na Figura 30 que a ausência de ágar em meio MS proporcionou melhores médias. Entretanto, em meio WPM, não houve efeito desse fator. Esses dados sugerem efeitos da concentração de sais e de oxigênio no meio de cultura. A maior disponibilidade de oxigênio no meio sólido possivelmente tenha contribuído para maior absorção do nitrato, o que foi prejudicial ao explante. A presença de IBA no meio reduziu a sobrevivência dos explantes de 93,33% (testemunha) para 69,75% (4,9µM IBA),

5.3.2. Multiplicação "in vitro" de gemas axilares

5.3.2.1. Efeito de BAP nos meios MS e WPM

O desenvolvimento da parte aérea ocorreu principalmente pela formação de folhas, de acordo com a interação entre meio de cultura e concentrações de BAP. DUNSTAN (1992) afirma que a adição de BAP ao meio nem sempre proporciona adequado alongamento e que nitrato de amônio e sacarose podem aumentar o potencial de multiplicação.

Em média, 45,61% dos explantes desenvolveram parte aérea em meio MS contendo $4,4\mu\text{M}$ de BAP, enquanto que em meio WPM, maior percentual (45,71%) foi alcançado na ausência desse regulador de crescimento (Figura 32). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por HAMMAT & RIDOUT (1992) que verificaram o desenvolvimento de brotações maiores em WPM, com baixas concentrações de BAP, constatando portanto, um efeito tóxico dessa citocinina no desenvolvimento das brotações em meio WPM. A redução do alongamento dos explantes sob a concentração de $8,9\mu\text{M}$ de BAP foi registrada por SINHA & MALLICK (1993), que verificaram além da inibição no alongamento, maior formação de calos sob essa concentração. Quanto ao número de folhas por explante, a Figura 33 mostra que as médias em meio MS foram superiores (2,87) sob $4,4\mu\text{M}$ de BAP. No meio WPM, a BAP foi responsável pela redução do número de folhas por explante. O comprimento das brotações obtidas nesse experimento foi reduzido e as folhas apresentavam aspectos de vitrificação em ambos os meios, talvez em função da toxidez do BAP sob concentrações elevadas, conforme verificado

$$Y1: 0,753622 + 0,1002068X - 0,01119092X^2$$

$$R^2 = 0,5975$$

$$Y2: 0,977514 - 0,0298702X$$

$$R^2 = 0,9531$$

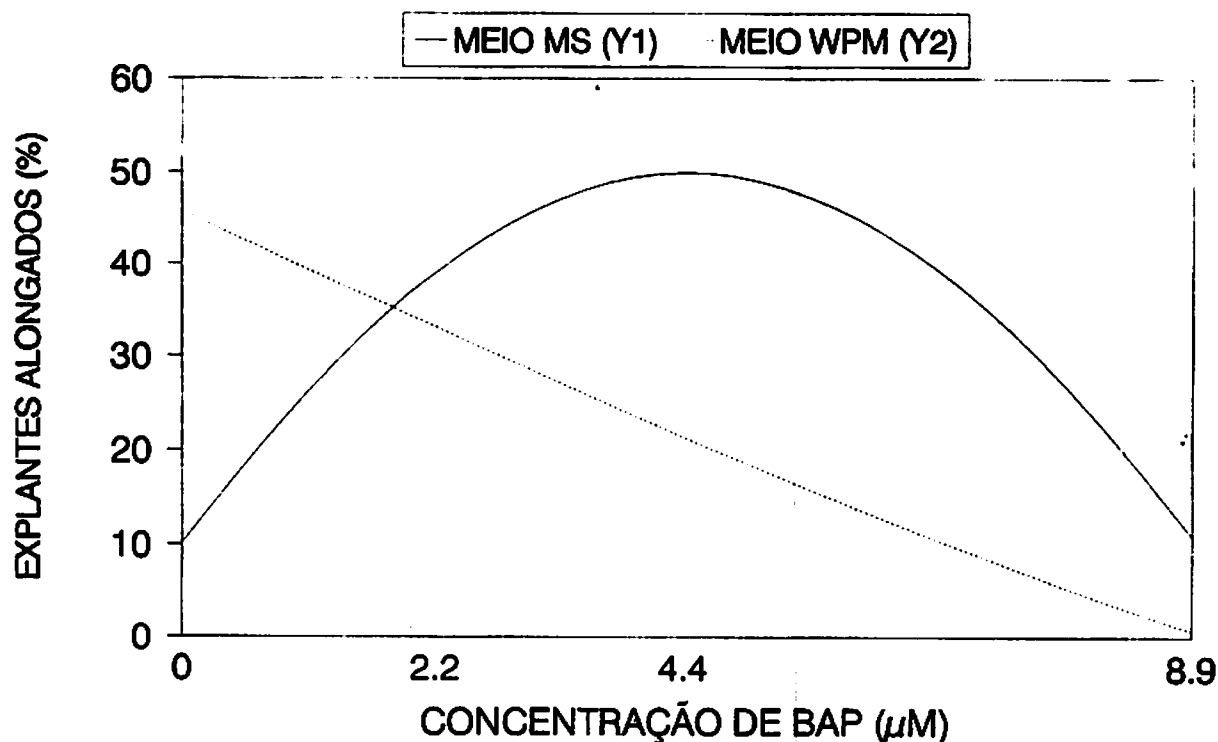


FIGURA 32. Porcentagem de explantes com gemas axilares alongadas em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) a partir de meios contendo diferentes concentrações de BAP. ESAL, Lavras - MG, 1993.

por WYSOKINSKA (1993), onde a concentração de $4,4\mu\text{M}$, apesar de proporcionar o maior número de brotações por explante, o comprimento dessas foi inferior a 10mm, devido ao encurtamento dos internódios.

$$Y1: 0,869382 + 0,4383680 - 0,04960768x^2$$

$$R^2 = 0,7079$$

$$Y2: 1,263896 - 0,0533657X$$

$$R^2 = 0,5625$$

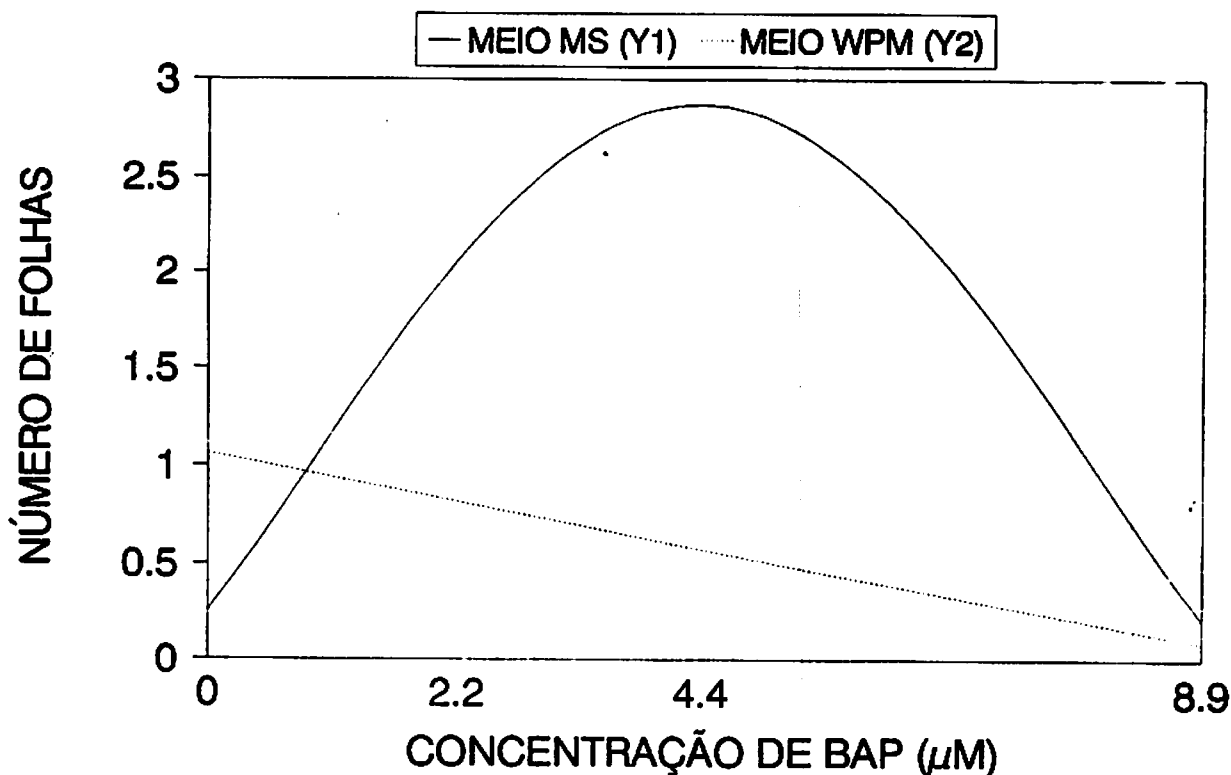


FIGURA 33. Número médio de folhas na parte aérea de explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) em meio contendo BAP. ESAL, Lavras - MG, 1993.

5.3.2.2. Efeito da interação NAA e BAP

Na multiplicação de gemas axilares em frascos verificou-se que, para todas as características analisadas, apenas o ácido naftalenacético (NAA) apresentou efeito significativo. Como mostra o Figura 34, a ausência de NAA no meio de cultura proporcionou em média 62,30% de explantes com mais de cinco folhas. Esse percentual diminuiu para 54% sob 0,1µM de NAA, sendo que sob as concentrações de 0,4 e 4,4µM não houve regeneração de folhas. Por outro lado, verificou-se que a maior média de explantes com cinco folhas ou menos, ocorreu na presença

$$Y1: 1,086191 - 0,8703972X + 0,14818908X^2 \quad R^2 = 0,9052$$

$$Y2: 0,693492 + 0,3153466X - 0,05792970X^2 \quad R^2 = 0,9625$$

$$Y3: 0,882342 - 0,3965261X + 0,06742278X^2 \quad R^2 = 0,9505$$

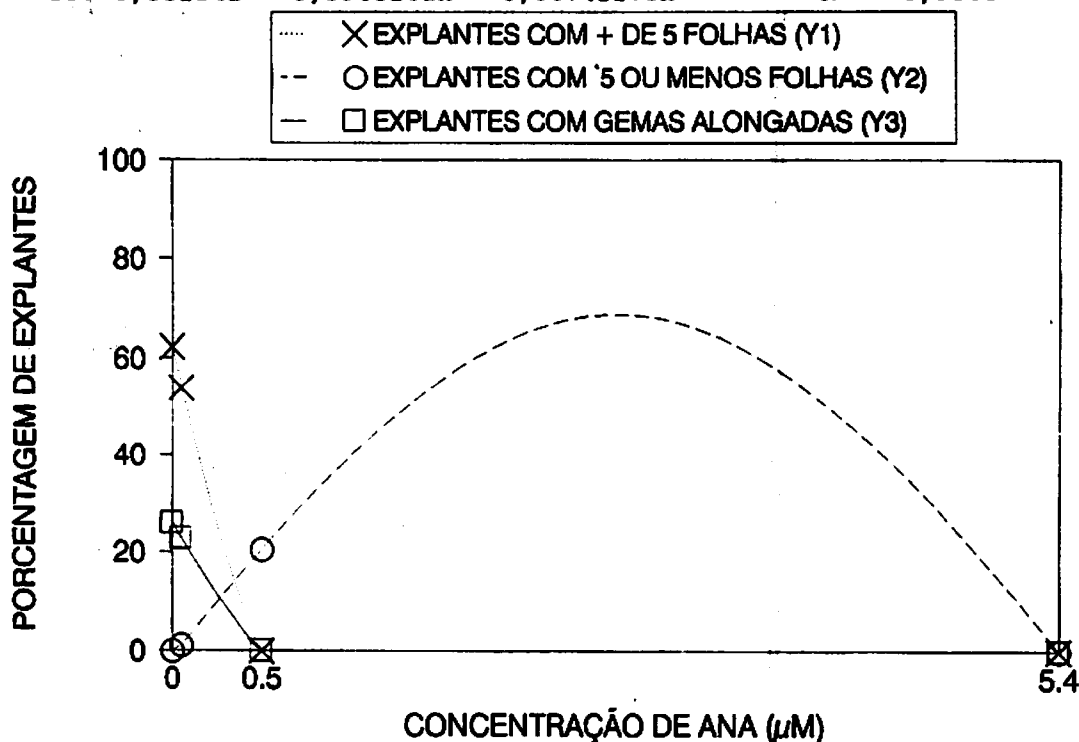


FIGURA 34. Porcentagem de explantes com mais de cinco e com cinco ou menos folhas e de explantes com gemas alongadas em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) em meio MS contendo NAA. ESAL, Lavras - MG, 1993.

de $0,1\mu\text{M}$ de NAA (20,48%). Esses resultados sugerem que o NAA foi responsável pela diminuição do número de folhas nos explantes.

No alongamento das gemas axilares o NAA demonstrou toxidez nas concentrações utilizadas e a maior média foi de 25,86% em meio isento dessa auxina. Sob as concentrações de $0,4$ e $4,4\mu\text{M}$ de NAA os explantes não apresentaram alongamento. Em *Datura insignis*, FIGUEIREDO & ESQUIBEL (1991) relatam que o desenvolvimento de gemas axilares a partir de segmentos nodais foi observado em meios contendo baixas concentrações de NAA.

Outros trabalhos citam o aumento do número (RAHMAN, 1993) e comprimento das brotações (WYSOKINSKA, 1993) a partir da interação entre citocininas e auxinas. Porém, de acordo com os dados obtidos, a BAP não mostrou efeito no cultivo em frascos, sendo que o NAA inibiu a formação de folhas e alongamento das brotações. LIN (1991) e ISLAM et alii (1993) verificaram, em seus trabalhos, que o NAA proporcionou um aumento da formação de calos e menor formação de brotos. Além da influência do NAA, a atmosfera interna dos frascos contendo explantes para a multiplicação talvez tenha contribuído para o acúmulo de gases (CO_2 , etileno) prejudicando o desenvolvimento das gemas.

5.3.2.3. Efeito do carvão ativado e da interação BAP e GA_3

Os resultados da Figura 35 demonstram o efeito do ácido giberélico sobre o número médio de explantes com gemas alongadas, comprimento médio das brotações bem como número médio de gemas por brotação. A melhor concentração de GA_3 no meio de cultura para essas características analisadas foi $2,7\mu\text{M}$, em que se obtiveram, em média, 43,49% dos explantes alongados. Essas brotações, por sua vez, apresentaram médias de comprimento (em mm) e número de gemas iguais a 5,3 e 1,9, respectivamente. Para multiplicação de *Telopea speciosíssima* R. BR., as melhores taxas de multiplicação foram obtidas com $1,0\mu\text{M}$ de GA_3 em interação com $1,25\mu\text{M}$ de BAP (OFFORD et alii, 1992), o que não ocorreu nesse experimento. O GA_3 , apesar de mostrar um efeito sem interagir com BAP, proporcionou uma resposta linear nas características

$$Y1: 0,816038 + 0,0562296X \quad R^2 = 1,0000$$

$$Y2: 0,828314 + 0,0699442X \quad R^2 = 0,9936$$

$$Y3: 1,260160 + 0,1084218X \quad R^2 = 0,9699$$

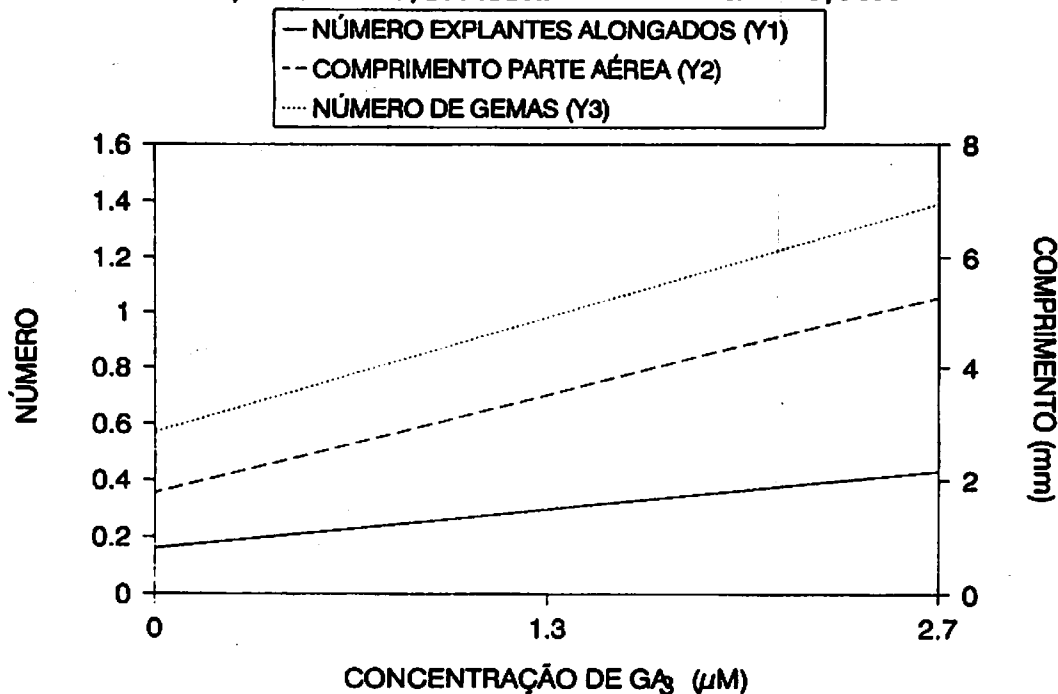


FIGURA 35. Número médio de explantes alongados, comprimento no alongamento de gemas axilares e número de gemas nos explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) em meio contendo GA₃. ESAL, Lavras - MG, 1993.

analisadas o que equivale dizer que outros estudos talvez conduzam a melhores taxas de multiplicação.

Houve interação significativa entre as concentrações de BAP e o carvão ativado adicionado ao meio de cultura. Na ausência de carvão ativado, e presença de 1,1µM da BAP, observou-se efeito favorável no alongamento dos explantes. Nessa condição, 53,29% dos explantes apresentaram em média brotações com 7,4mm de comprimento e 3,1 gemas (Figuras 36 e 37). As menores médias obtidas em meio contendo carvão ativado podem ser devidas a adsorção da BAP, conforme demonstraram EBERT et alii (1993). Os

autores verificaram que 10 dias após o preparo do meio, os níveis de BAP disponível (não adsorvido) foram aproximadamente 0,3 a 0,4% em meio líquido e 0,8 a 1,0% em meio sólido ($6g.L^{-1}$). Portanto, apesar do efeito benéfico do carvão ativado na remoção de substâncias inibidoras produzidas pela autoclavagem do meio ou pelo próprio tecido vegetal, ele também atua na adsorção de citocininas e auxinas, reduzindo ou eliminando seus efeitos.

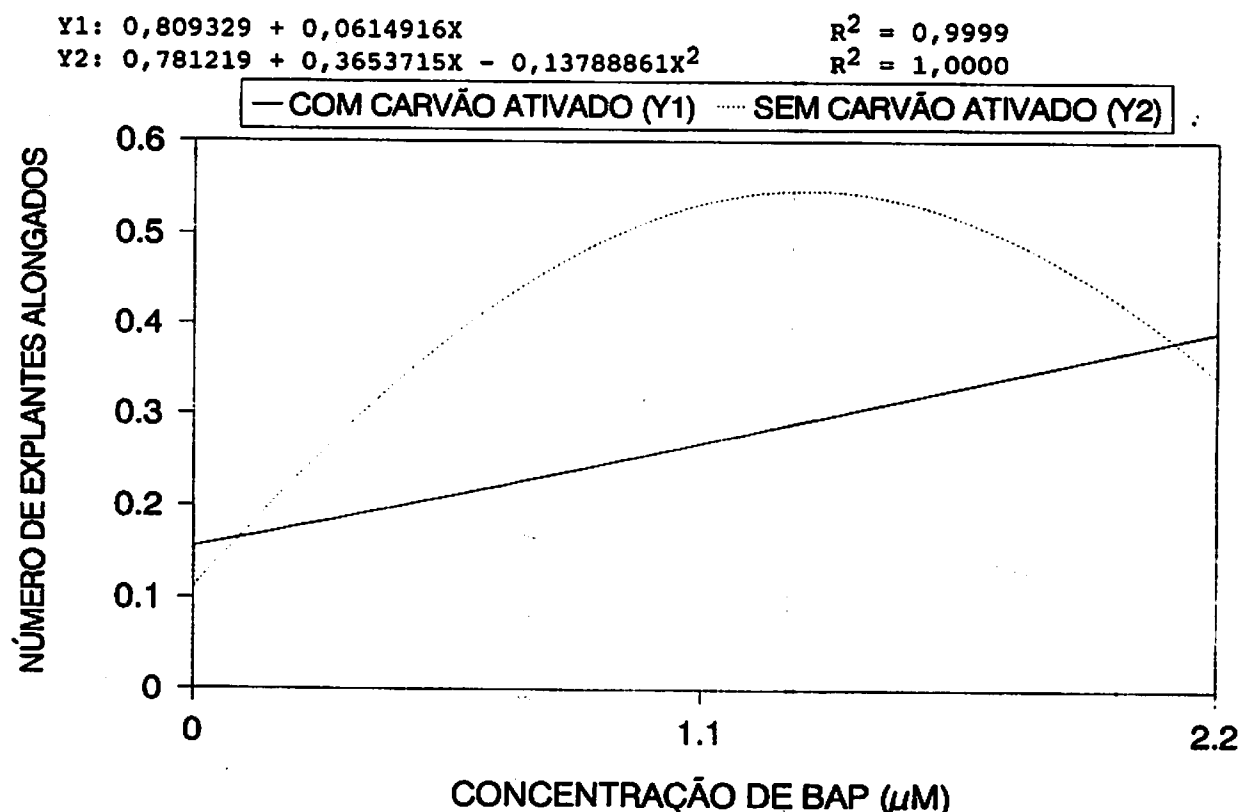


FIGURA 36. Número médio de explantes alongados em meio contendo carvão ativado (0,1%) e BAP na multiplicação "in vitro" de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

$$\begin{aligned}
 Y1: & 0,781219 + 0,3653715X - 0,13788861x^2 & R^2 & = 0,9999 \\
 Y2: & 0,851286 + 0,4549861X - 0,19537696X^2 & R^2 & = 1,0000 \\
 Y3: & 1,221557 + 1,1231745X - 0,46982527X^2 & R^2 & = 1,0000
 \end{aligned}$$

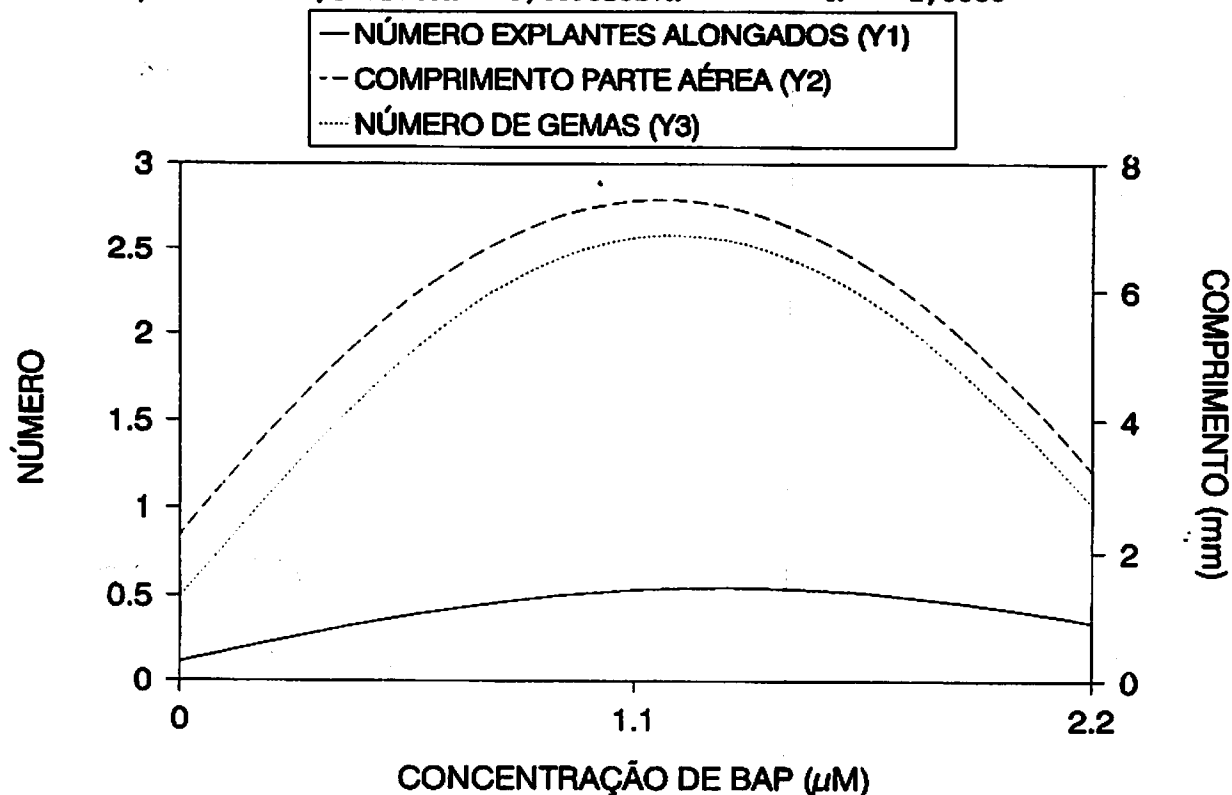


FIGURA 37. Número médio de explantes alongados, número de gemas e comprimento no alongamento de gemas axilares de explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) em meio contendo BAP sem carvão ativado. ESAL, Lavras - MG, 1993.

A BAP em $2,2\mu\text{M}$ adicionada ao meio proporcionou médias inferiores nas características analisadas, demonstrando toxidez nessa concentração. Entretanto, quando o meio continha carvão ativado e BAP, apenas a média de explantes alongados foi influenciada pela interação desses fatores. O comprimento e número de gemas das brotações apresentaram conforme Figuras 38 e 39 tendências nesse sentido, embora significativas apenas a 18 e 9%, respectivamente.

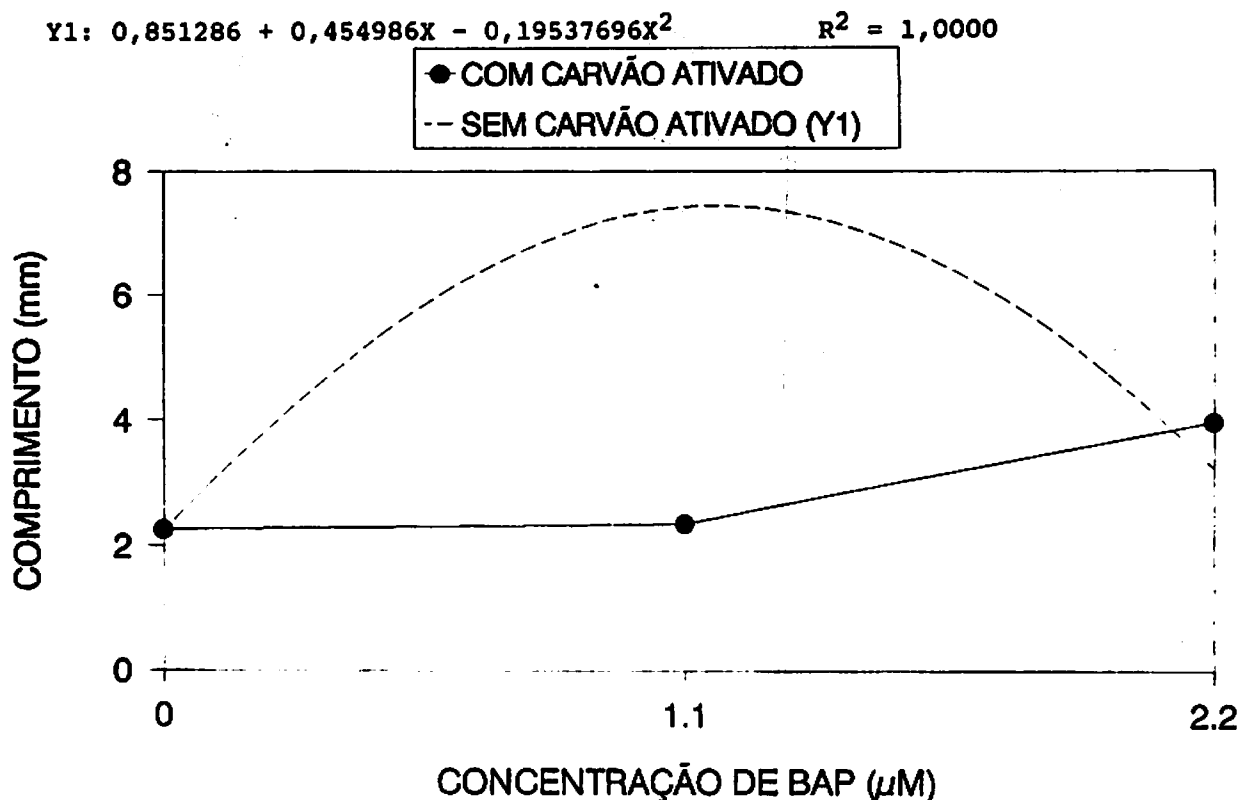


FIGURA 38. Comprimento médio de gemas axilares alongadas em meio contendo diferentes concentrações de BAP nos explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

Um aspecto importante nesse experimento foi a influência do tamanho do explante, porquanto em experimentos anteriores utilizando-se explantes com apenas uma gema axilar, o desenvolvimento das brotações foi inferior comparado a explantes com três a quatro gemas. O melhor desenvolvimento das brotações em explantes contendo de três a quatro gemas axilares pode ter sido devido a um maior nível de reservas. LAUZER et alii (1992) verificaram que na propagação "in vitro" de *Dioscorea abyssinica* Hoch., um tamanho mínimo dos explantes é necessário para o sucesso da micropropagação. Com relação ao tipo de explante, diferentes posições nas brotações podem vir a ser testadas bem como a idade do material utilizado.

$$Y1: 1,221557 + 1,1234745X - 0,46982527X^2 \quad R^2 = 1,0000$$

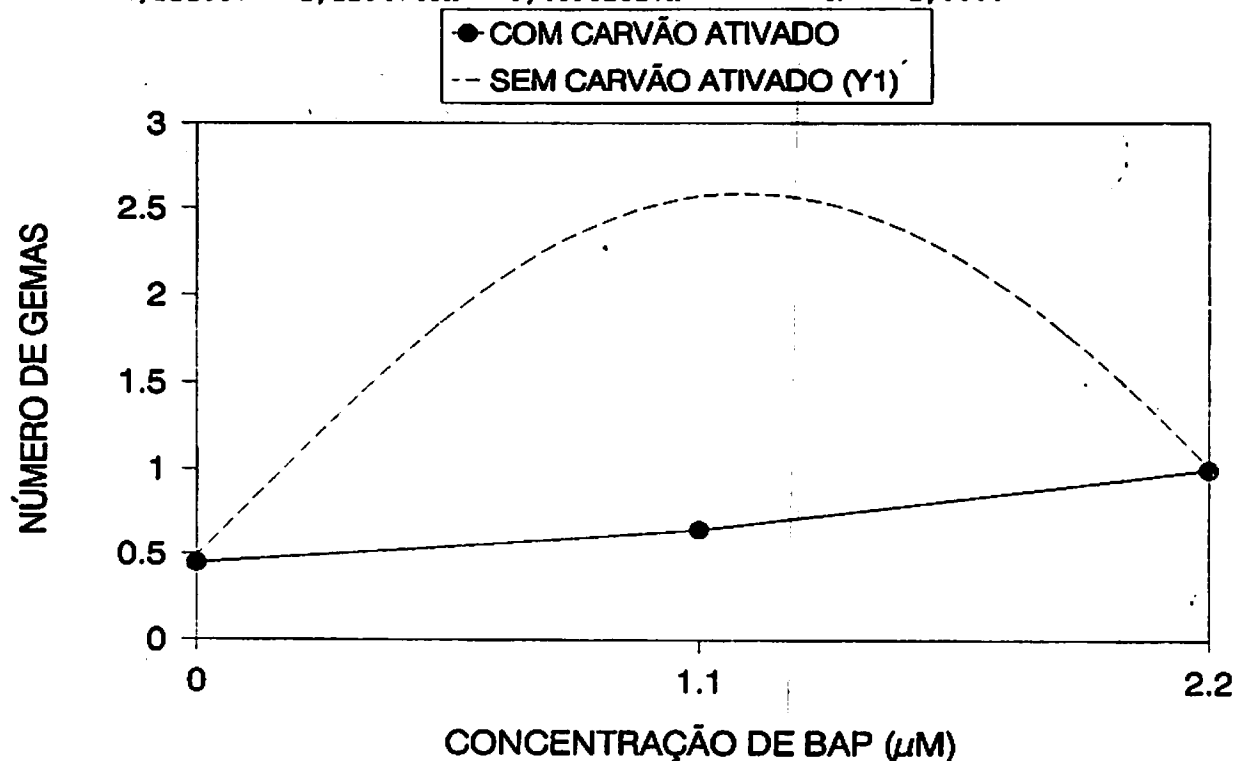


FIGURA 39. Número médio de gemas em meio contendo ou não carvão ativado (0,1%) e BAP nos explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*). ESAL, Lavras - MG, 1993.

Outro estudo que talvez proporcione melhores resultados, diz respeito ao ajuste dos nutrientes no meio de cultura, buscando níveis adequados de sacarose (ZHANG & STOLTZ, 1989 e DUSTAN et alii, 1992) e da relação nitrato/amônio (SELBY et alii, 1990). Os reguladores tidiazuron (TDZ), cinetina e zeatina podem também vir a ser comparados quanto aos efeitos na multiplicação do material em estudo.

Na Figura 40 pode-se observar o aspecto dos explantes alongados.

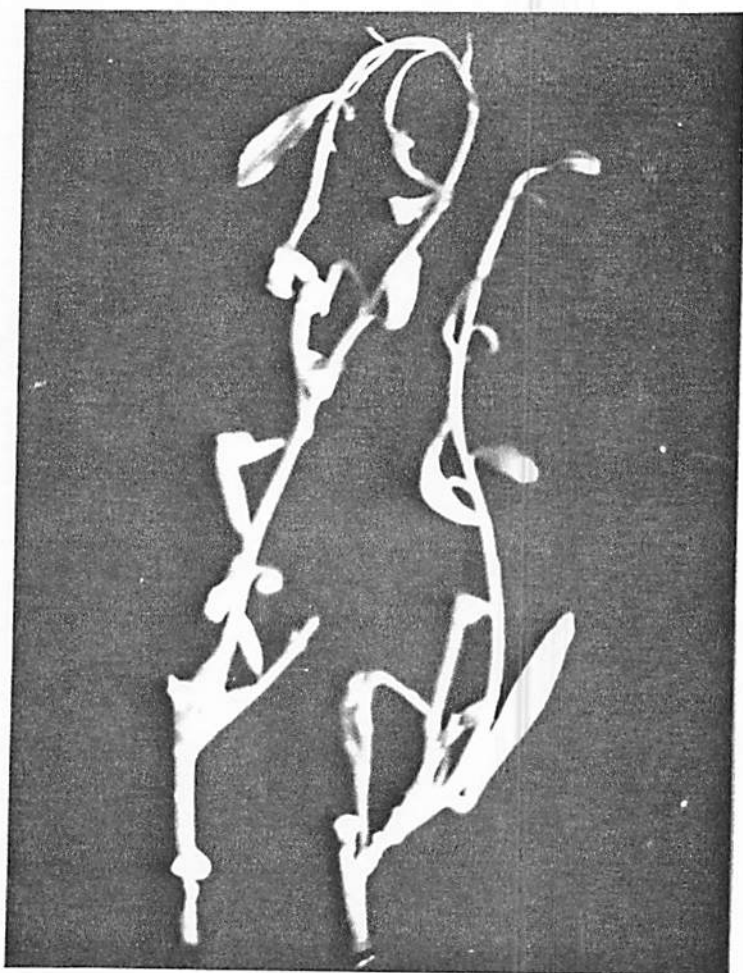


FIGURA 40. Explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), com gema axilar alongada. ESAL, Lavras - MG, 1993.

5.4. CONCLUSÕES

Enraizamento de microestacas "in vitro":

A menor concentração de sais do meio WPM mostrou efeito benéfico no enraizamento "in vitro".

O emprego de ágar ao meio de cultura foi dispensável em relação à porcentagem de enraizamento e número médio de raízes. Entretanto, as médias de sobrevivência de explantes em meio MS líquido foi superior ao MS sólido, sendo que no meio WPM a presença de ágar também não influenciou.

Embora a presença de IBA no meio WPM tenha contribuído favoravelmente ao enraizamento, essa por sua vez, diminuiu a porcentagem de sobrevivência dos explantes.

Multiplicação "in vitro" de gemas axilares:

Na multiplicação "in vitro" não houve alongamento dos explantes contendo apenas uma gema lateral.

O meio MS contendo BAP ($4,4\mu\text{M}$) estimulou a formação de maior número de folhas por explante, o que não ocorreu em meio WPM, em que o maior número de folhas foi verificado no tratamento testemunha (sem BAP).

O mesmo tipo de explante cultivado em frasco (200mL) contendo meio MS suplementado com BAP e/ou NAA não apresentou resposta interativa entre esses fatores. Apenas o NAA influenciou negativamente os parâmetros da parte aérea, de forma que o meio de cultura isento dessa auxina proporcionou melhores porcentagens de alongamento (25,86%).

Com explantes contendo de três a quatro gemas axilares cultivados em tubos de ensaio o regulador de crescimento BAP e o hormônio GA₃ não apresentaram interação. Entretanto, ambos apresentaram efeitos isolados na indução ao alongamento das gemas axilares, apesar de a BAP haver proporcionado alongamento em 53,29% dos explantes.

CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com esse trabalho tornou-se possível desenvolver uma metodologia para a propagação "in vitro" e "in vivo" de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*) com o objetivo de produzir mudas para o plantio às margens de rios e represas. Como não havia nenhuma pesquisa de propagação da espécie, comparou-se a propagação por cultura de tecido e por estacas devido à dificuldade de obterem-se sementes viáveis para a propagação.

O presente trabalho iniciou com a utilização de brotações provenientes do campo para a multiplicação "in vitro". No início, notou-se que havia um grande escurecimento do meio de cultura, devido à exsudação de fenóis e conseqüentemente oxidação. O estabelecimento também foi difícil devido à maior contaminação e desuniformidade do material. Visando solucionar esse problema, partiu-se para o cultivo de plantas em casa de vegetação, como forma de fornecer brotações mais uniformes e com melhor estado ^{fito} sanitário para propagação "in vitro". É interessante notar que o explante proveniente do campo apresenta oxidação mais intensa e portanto, há necessidade de água corrente por um período mais longo, isto é, mais de 12 horas, enquanto que para explantes provenientes de casa de vegetação esse período

pode ser menor (15 a 20 minutos). Apesar de não ter sido realizada análise de substâncias endógenas nos explantes, é provável que a ocorrência dessa oxidação seja devida as diferentes concentrações de fenóis nos dois tipos de materiais.

Um outro ponto interessante é que a indução do explante para a multiplicação foi melhor quando se utilizou o meio MS, sendo que, para o enraizamento, o meio WPM foi superior. Isto talvez seja devido à maior concentração de nitrato no meio MS do que no WPM. Portanto, estudos na relação NO_3/NH_4 são necessários para confirmar essa especulação. Observou-se que a multiplicação "in vitro" de Sarandi regenera brotações pequenas e pouco desenvolvidas, ocorrendo até mesmo o processo de vitrificação. O processo chamado de tufo, ou seja, um explante originando vários brotos adventícios parece não ser o mais interessante para multiplicação de Sarandi "in vitro". Notou-se ainda que a cultura nodal, isto é, o alongamento da gema axilar e, posterior repicagem dessa brotação alongada em diversos explantes secundários para originarem novas plantas, é mais promissora.

No estudo usando estacas e microestacas, encontrou-se evidências para a propagação, em grande escala, de Sarandi. A utilização de estacas em diferentes substratos é muito importante para obtenção do enraizamento. O substrato areia foi muito superior ao substrato plantimax, sendo também mais barato, de fácil manuseio e obtenção. Acredita-se não ser necessário maiores estudos com diferentes substratos, devido às razões expostas acima. Entretanto, se for o caso, um estudo com palha de arroz carbonizada pode ser interessante. Um ponto interessante observado no processo de enraizamento de Sarandi foi a umidade

relativa do ar, principalmente com microestacas. Verificou-se também que o sucesso no enraizamento de microestacas "in vivo" depende da manutenção de folhas com metade da área foliar e da posição das microestacas, ou seja, microestacas sem folhas e apicais apresentam uma maior porcentagem de morte. Outro ponto que merece atenção é a utilização do sombrite para o sucesso no enraizamento, confirmado nesse trabalho, tanto para estacas como microestacas, todavia, após o enraizamento, a retirada do sombrite é importante para um melhor desenvolvimento da parte aérea da futura muda. A utilização de estacas, em diferentes épocas do ano, é possível para obtenção do enraizamento e formação de mudas. Entretanto, sugere-se um estudo mais profundo usando diferentes estacas durante o ano, apenas para determinar a melhor época de enraizamento, ou seja, um estudo básico, tendo em vista a necessidade de obtenção de mudas independente da época do ano.

A experiência obtida nesse trabalho, indica que outras linhas de pesquisa devam ser desenvolvidas, sobretudo em cultura de tecidos, visando determinar a melhor relação NO_3/NH_4 na multiplicação "in vitro" de gemas adventícias; o estudo de um novo regulador de crescimento (Tidiazuron) na micropropagação, além de diferentes meios de cultura, juntamente com reguladores de crescimento e nitrogênio (nitrato). Quanto a propagação de estacas e microestacas sugere-se estudos com boro e sacarose em interação com reguladores de crescimento. Um outro ponto importante é estudar alguns aspectos bioquímicos, quais sejam a atividade de enzimas envolvidas no enraizamento (peroxidases, e

polifenoloxidasas) em relação às estacas e microestacas enraizadas, posições do material e idade.

Baseado em informações geradas nesse trabalho, acredita-se que a propagação vegetativa do Sarandi para o repovoamento das margens de rios e represas é viável com certo grau de facilidade. Nesse caso, a cultura de tecido vegetal não é necessária devido à facilidade no enraizamento de estacas e microestacas. Além disso, a obtenção de mudas a partir da cultura de tecidos apresenta um custo muitas vezes superior aos métodos de propagação vegetativa "in vivo" não justificando portanto o uso dessa técnica para essa espécie.

RESUMO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "IN VITRO" E "IN VIVO" DE SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*): ESPÉCIE FLORESTAL DE MATA CILIAR.

Na propagação vegetativa por estacas e microestacas adotaram-se o pré-tratamento com imersão em soluções contendo IBA. Quando as estacas foram mantidas por seis horas em solução contendo 4,9mM de IBA, 70% delas enraizaram. O melhor substrato foi a areia.

O comprimento, número de raízes e número de microestacas enraizadas foram superiores quando se mantiveram as folhas pela metade, realizando como pré-tratamento, a imersão das microestacas por 15 minutos, em água destilada. Houve ainda um aumento das médias dessas características, após imersão, também por 15 minutos, em solução contendo 3,1mM de IBA.

O estabelecimento "in vitro" foi possível a partir de explantes provenientes de mudas mantidas em casa de vegetação, com controle fitossanitário. O material vegetal coletado no campo apresentou alta taxa de contaminação e oxidação fenólica, inviabilizando o cultivo "in vitro". Na multiplicação "in vitro" constatou-se que o tamanho do explante teve influência nas

características avaliadas, assim, melhores médias foram alcançadas em explantes contendo de três a quatro gemas axilares, em meios suplementados com BAP ($1,1\mu\text{M}$) e GA_3 ($1,4\mu\text{M}$), sem interação desses fatores. O enraizamento de explantes "in vitro" ocorreu em meio WPM contendo $4,9\mu\text{M}$ de IBA sem necessidade da utilização da ágar. Comparativamente, melhores resultados foram alcançados no enraizamento de estacas e microestacas sendo que a multiplicação "in vitro" pode ser incrementada a partir de novos estudos.

SUMMARY

"IN VITRO" AND "IN VIVO" VEGETATIVE PROPAGATION OF SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*): A GALLERY FOREST SPECIES

Propagation of *Sebastiania schottiana* MUELL. ARG. by stem cuttings and microcuttings was performed by pre-treatment of the material by dipping in IBA solutions. When the cuttings were treated for six hours in solutions containing 4,9mM IBA, the rooting percentage was 70%. The best substrate was sand. The greater mains of root length, root number and rooted microcuttings were obtained when the leaves had a half area with pre-treatment by dipping for 15 minutes in destiled water. The increase of these parameters mains after dipping for too 15 minutes was in solutions with 3,1mM IBA.

The "in vitro" stablishment was possible by explants from younger plants maintained in greenhouse with disease prevent control. The vegetal material colected in the field showed greater contamination and browning rates damaging "in vitro" cultures. The "in vitro" multiplication was influenced by size explant, so best mains were obtained when the explants had three or four axillary buds, on MS medium with BAP (1,1 μ M) and GA₃

(1,4 μ M), without interaction. The rooting of explants "in vitro" was in WPM medium with 4,9 μ M IBA, and it was not necessary to use agar.

Comparatively, greater mains were on rooting of stem cuttings and microcuttings and "in vitro" multiplication may be increase through news researches.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABEDINI, W.I. & MORLATS, R.M. Vegetative propagation of selected ecotypes of *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. *Acta Horticulturae*, La Plata, 227:284-6, 1988.
02. BADJI, S; DANTHU, P. & COLONNA, J.P. Vegetative propagation studies of gum trees. 1. Propagation of *Acacia senegal* (L.) WILD using lignified cuttings of small diameter with eight nodes. *Agroforestry Systems*, Senegal, 14(3):183-91, 1991.
03. BANKO, T.J. & STEFANI, M.A. "In vitro" propagation of *Oxydendrum arboreum* from mature trees. *HortScience*, Mont Vernon, 24(4):683-5, 1989.
04. BERTONI, J.E. de A. Comparação fitossociológica das principais espécies de florestas de terra firme e ciliar na Reserva Estadual de Porto Ferreira (SP). *Silvicultura em São Paulo*, São Paulo, 16A(2):565-71, 1982.
05. BLAZICH, F.A. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: DAVIS, T.D. *Advances in plant sciences; Adventitious root formation in cuttings*. Oregon, Dioscorides Press, 1988. v.2, p.132-49.
06. _____; WRIGHT, R.D. & SCHAFFER, H.E. Mineral nutrient status of 'convexa' holly cuttings during intermittent mist propagation as influenced by exogenous auxin application. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 108:425-9, 1983.

07. BOHM, W. **Methods of studying root systems**. Berlin, Springer Verlag, 1979. 189p.
08. BONAMINIO, V.P. Comparison of IBA quick-dips with talc for rooting cuttings. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society, Carolina**, 33:565-8, 1984.
09. BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry - specific principles and methods: growth and developments. **Forestry Sciences, Washington**, 2:202-15, 1987.
10. CACHO, M.; MORÁN, M.; HERRERA, M.T.; TÁRRAGO, J.F. & CORCHETE, M.P. Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured "in vitro". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague**, 25:117-23, 1992.
11. CALDAS, L.S. & TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de jabuticabeira e goiabeira para cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, São Carlos**, 5(1):107, jan/jun. 1993.
12. CARTER, K.K. Rooting of tamarack cuttings. **Forest Science, Washington**, 30(02):392-4, 1984.
13. CARVALHO, D. de, PINTO, J.E.B.P. & PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura "in vitro" de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN. **Ciência e Prática, Lavras**, 14(1):97-106, 1990.
14. CHANG, S.; SEN, S.; MCKINLEY, C.R.; AIMERS-HALLIDAY, J. & NEWTON, R.J. Clonal propagation of Virginia pine (*Pinus virginiana* MILL.) by organogenesis. **Plant Cell Reports, New York**, 10(3):131-4, 1991.

15. CLARKSON, D.T. & HANSON, J.B. The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 31:239-98, 1980.
16. COLEMAN, G.O. & ERNST, S.G. Axillary shoot proliferation and growth of *Populus deltoides* shoot cultures. *Plant Cell Reports*, New York, 9(3):165-7, 1990.
17. CORRÊA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Brasília, Ministério da Agricultura/IBDF. 1969. v.4, 197p.
18. CURIR, P.; VAN SUMERE, C.F.; TERMINI, A.; BARTHE, P.; MARCHESINI, A. & DOLCI, M. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiology*, Washington, 92:1148-53, 1990.
19. DANTHU, P.; LEBLANC, J.M.; BADJI, S. & COLONNA, J.P. Vegetative propagation studies of gum arabic trees 2. The vegetative propagation of adult *Acacia senegal*. *Agroforestry Systems*, Senegal, 19(1):15-25, 1992.
20. DEBERGH, P.C. & READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.1-13.
21. DEOL, G.S.; KHOSLA, P.K. Effect of size of stem cuttings on juvenile growth of *Populus ciliata* WALL. Ex ROYLE. *Indian Journal of Forestry*, Nauni, 6(3):205-7, 1983.
22. DRUART, Ph. & WULF, O.Dc. Activated Charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 32:97-9, 1993.

23. DUSTAN, D.I.; LASHTA, D.P., KIKCIO, S.I. & THORPE, T.A. Factors affecting recurrent shoot multiplication "in vitro" cultures of 17- to 20 - year-old douglas fir trees. "In vitro" Cell Development Biology, Columbia, 28:33-8, 1992.
24. EBERT, A.; TAYLOR, F. & BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurina and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague, 33:157-62, 1993.
25. ELLIS, D.D.; BARCZYNSKA, H.; MC COWN, B.H. & NELSON N.A. comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague, 27(3):281-7, 1991.
26. FAYE, M., OURRY, A.; SAIDALI-SAVI, C.; DARGENT, R.; BOUCAUD, J. & DAVID, A. Effects of glutamine and k-glutamate on assimilation of [¹⁵N]-nitrate during auxin treatment for root formation "in vitro" (*Pinus pinaster*). Physiologia Plantarum, Copenhagen, 76:227-82, 1989.
27. FIGUEIREDO, S.F.L. & ESQUIBEL, M.A. Callogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura insignis* BARB. RODR. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasília, 3(2):63-8, 1991.
28. FUERNKRANZ, H.A.; NOWAK, C.A. & MAYNARD, L.A. Light effects on "in vitro" adventitious root formation in axillary shoots of mature *Prunus serotina*. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 80:337-41, 1990.

29. GASPAR, T. & HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D. **Advances in Plant Sciences**. Adventitious root formation in cuttings. Oregon, Dioscorides Press, 1988. v.2, p.117-31.
30. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eastern Press, England, 1984. 709p.
31. GIBBS, P.E. & LEITÃO FILHO, H.F. Floristic composition of an area of gallery forest near Mogi Guaçu, State of São Paulo, S.E. Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, 1:151-6, 1978.
32. GILL, W.R. & MILLER, R.D. A method for study of the influence of mechanical impedance and aeration on the growth of seedling roots. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, 20:154-7, 1956.
33. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas; Parte II Técnicas Básicas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p.99-170.
34. GUPTA, B.B.; ADARSH, K. & NEGI, D.S. Rooting response of branch cuttings of *Melia azedarach* L. **Indian Journal of Forestry**, Índia, 12(3):188-90, 1989.
35. HAISSIG, B.E. Influence of aryl esters of indole 3 acetic and indole-3-butyric acids on adventitious root primordium initiation and development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 47:29-33, 1979.
36. _____. Metabolic process in adventitious rooting of cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.141-190.

37. HAISSIG, B.E. & RIEMENSCHNEIDER, D.E. Genetic effects on adventitious rooting. In: DAVIS, T.D. **Advances in plant sciences; Adventitious root formation in cuttings.** Oregon, Dioscorides Press, 1988. v.2, p.47-60.
38. HAMMATT, N. & RIDOUT, M.S. Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, 13:67-74, 1992.
39. HARTMAN & KESTER, D.E. **Plant propagation: principles and practices.** 3.ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1975. 661p.
40. HASENSTEIN, K.H. & EVANS, M.L. The influence of calcium and pH on growth in primary roots of *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 72:466-70, 1988.
41. HOSTALÁCIO, S.; SOARES, A; & COELHO, J. Enraizamento de estacas de azaléa (*Rhododendron* spp), três marias (*Bougainvillea spectabilis*) e mimo de vênus (*Hibiscus rosa sinensis*) sob influência de ANA e IBA. **Ciência e Prática**, Lavras, 1(1):30-5, 1977.
42. IAPICHINO, G.; CHEN, T.H.H. & FUCHIGAMI, L.H. Plant regeneration from somatic tissue os *Rhododendron laetum x aurigenarum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, 27:37-43, 1991.
43. IGBOANUGO, A.B.I. Rooting of lignotubers of some *Eucalyptus* with indole 3 butiric acid. **Pakistan Journal of Forestry**, Nigeria, 37(3):121-4, 1987.
44. ISLAM, R.; ZAMAN, A.; JOARDER, O.I. & BARMAN, A.C. "In vitro" propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* WALL. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, 33:339-42, 1993.

45. JARVIS, B.C.; YASMIN, S.; ALI, A.H.N. & HUNT, R. The interaction between auxin and boron in adventitious root development. *New Phytologist*, Cambridge, 97:197-204, 1984.
46. JOHNSON, K.R. & WALKER, R.F. Micropropagation of valley oak shoots from seedling explantes. *New Forests*, 4(4):271-79, 1991.
47. JOLY, C.A. & CRAWFORD, R.M.M. Variation in tolerance and metabolic responses to flooding in some tropical trees. *Journal of Experimental Botany*, London, 33(135):799-809, 1982.
48. KAUL, K. Factors influencing "in vitro" micropropagation of *Pinus strobus* L. *Biologia Plantarum*, The Hague, 32(4):266-72, 1990.
49. KLING, G.J.; MEYER, M.M.Jr. Effects of phenolic compounds and indoleacetic acid on adventitious root initiation in cuttings of *Phaseolus aureus*, *Acer saccharinum*, and *Acer griseum*. *HortScience*, Mont Vernon, 18(3):352-4, 1983.
50. KUMAR, P. Vegetative propagation in palas (*Butea monosperma*) through air layering. *Indian Journal of Forestry*, India, 12(3):188-90, 1989.
51. LAMBARDI, M.; SHARMA, K.K. & THORPE, T.A. "In vitro" regeneration of shoot buds and plantlet formation from mature embryos of *Pinus halepensis* MILL. *Acta Horticulturae*, La Plata, 289:123-4, 1991.
52. LAUZER, D.; LAUBLIN, G.; VINCENT, G. & CAPPADOCIA, M. "In vitro" propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* HOCH. and *D. mangelotiana* MIÉGE. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 2B:215-23, 1992.

53. LEE, T.T. Effects of phenolic substances on metabolism of exogenous indole-3-acetic acid in maize stems. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 50:107-12, 1980.
54. LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J. & WAITES, W.M. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing "in vitro". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 30:171-9, 1992.
55. LEONARD, R.T. & HEPLER, P.K. Calcium in plant growth and development. *Current topics in plant physiology: an American Society of Plant Physiology Series*. University of California, Riverside, USA, 1990. v.4, 205p.
55. LEOPOLD, A.C. & KRIEDEMANN, P.E. *Plant growth and development*. 2.ed. New York, Mc Graw-Hill, 1975. 109-35.
57. LEWIS, D.H. Lignification and the origin of vascular plants - a unified hypothesis. *New Phytologist*, Cambridge, 84:209-30, 1980.
58. LIN, Y.; WAGNER, M.R. & HEIDMANN, L.J. "In vitro" formation of axillary buds by immature shoots of *Ponderosa pine*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 26:161-6, 1991.
59. LININGTON, I.M. "In vitro" propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 27:81-8, 1991.
60. LIRA, L.M. Efeito de substratos e do superfosfato simples no limoeiro (*Citrus limonia* Osbeck cv. cravo) até a repicagem. Lavras, ESAL, 1990. 86p. (Tese MS).

61. LOACH, K. Controlling environmental conditions to improve adventitious rooting. In: DAVIS, T.D. **Advances in plant sciences**, Adventitious root formation in cuttings. Oregon, Dioscorides Press, 1988. v.2, p.248-73.
62. Mc CLELLAND, M.T., SMITH, M.A.L. & CAROTHERS, Z.B. The effects of "in vitro" and "ex vitro" root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, 23:115-23, 1990.
63. Mc COWN, D.D. & Mc COWN, B.H. North american hardwoods. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.247-60.
64. MATO, M.C.; RÚA, M.L. & FERRO, E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in vitis cultured "in vitro". **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 72:84-8, 1988.
65. _____ & VIEITEZ, A.M. Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots "in vitro". **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 66:491-4, 1986.
66. MILLER, N.F.; HINESLEY, L.E. & BLAZICH, F.A. Propagation of fraser fir by stem cuttings: effects of type of cutting, lenght of cutting, and genotype. **HortScience**, Mont Vernon, 17(5):827-9, 1982.
67. MITTAL, A.; AGARWAL, R. & GUPTA, S.C. "In vitro" development of plantels from axillary buds of *Acacia auriculiformis* - a leguminous tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, 19(1):65-70, 1989.

68. NADEL, B.L.; ALTMAN, A.; PLEBAN, S. & HUTTERMANN, A. "In vitro" development of mature *Fagus sylvatica* L. Buds. The effect of medium and plant growth regulators on bud growth and protein profiles. *Journal of Plant Physiology*, New York, 138(5):596-601, 1991.
69. NEWTON, A.C.; MUTHOKA, P.N. & DICK, J.M. The influence of leaf area on the rooting physiology of leafy stem cuttings of *Terminalia spinosa* ENGL. *Trees: Structure and Function*, 6(4):210-5, 1992.
70. NISSEN, S.J. & SUTTER, E.G. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. *HortScience*, Mont Vernon, 25(7):800-2, 1990.
71. OFFORD, C.A.; CAMPBELL, L.C. & MULLINS, M.G. Micropropagation of *Telopea speciosissima* R.Br. (Proteaceae) 1: Explant establishment and proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 29:215-21, 1992.
72. ONO, E.O.; RODRIGUES, J.O. & RODRIGUES, S.D. Interação entre auxinas e boro no enraizamento de estacas de camélia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, 4(2):107-12, 1992.
73. ORLIKOWSKA, T. Influence of arginine on "in vitro" rooting of dwarf apple rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 31:9-14, 1992.
74. PIERIK, R.L.M. "In vitro" culture of higher plants. Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
75. PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; ASHBY, W.C. & ROTH, P.L. Micro and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 116(1):142-8, 1991.

76. PREECE, J.E. & SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: tecnology and aplications**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.71-93.
77. PROEBSTING, W.M. Rooting of douglas-fir stem cuttings: relative activity of IBA and NAA. **HortScience**, Mont Vernon, 19(6):854-6, 1984.
78. PULIDO, M.; HARRY, I.S. & THORPE, T.A. "In vitro" regeneration of plantlets of Canary Island pine. **Acta Horticulturae**, La Plata, 289:131-2, 1991.
79. QUE, G.N. Propagation of *Sequoia sempervirens* by "in vitro" cultured shoots. **Forest Science an Technology**, China, 1:4-6, 1983.
80. RAHMAN, S.M.; HOSSAIN, M.; BISWAS, B.K.; JOARDER, O.I. & ISLAM, R. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of mature tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, 32:363-5, 1993.
81. RATHORE, T.S., SINGH, R.P. & SHEKHAWAT, N.S. Clonal propagation of desert teak (*Tecomella undulata*) through tissue culture. **Plant Science**, Limerick, 79(2);217-22, 1991.
82. REUVENI, O. & RAVIV, M. Importance of leaf retention to rooting of avocado cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, 106:127-30, 1981.
83. RODRIGUES, R.; DIAZ-SALA, C. & ANCORA, G. Sequential cultures of explants taken from adult *Corylus avellana* L. **Acta Horticulturae**, La Plata, 227:460-3, 1988.

84. ROUX, J.J.L. & STADEN, J.V. Micropropagation of *Eucalyptus* species. *HortScience*, Mont Vernon, 26(2):199-200, 1991.
85. SÃO JOSÉ, R.; LOPES, P.M.F.; SOUZA, I.V.B.; LIMA, E.M.; VILARES, A.S.; MORAIS, O.M. & REBOUÇAS, T.N.H. Efeitos de diferentes concentrações de IBA no enraizamento de estacas de urucueiros (*Bixa orellana* L.), tipo cultivado Bico de Pato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS, 1. Viçosa, 1992. *Anais...* Viçosa, UFV, 1992. p.
86. SATURNINA, C.H. & NANCY, E.G. Micropropagation of *Pinus caribaea* MORELET. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 32:47-53, 1993.
87. SELBY, C. & HARVEY, B.M.R. The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured sitka spruce (*Picea sitchensis*) tissues. *Annals of Botany*, Belfast, 65(4):395-407, 1990.
88. SENGI, Y. "In vitro" plantlet regeneration from axillary buds of an adult mizunara (*Quercus crispula* BLUME.). *Journal of the Japanese Forestry Society*, Japan, 72(2):143-6, 1990.
89. SHENK, M.K. & BARBER, S.A. Root characteristics of corn genotypes as related to P uptake. *Agronomy Journal*, Madison, 71:921-4, 1979.
90. SINHA, K.R. & MALLICK, R. Regeneration and multiplication of shoot in *Albizia falcataria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 32:259-61, 1993.
91. SIQUEIRA, E.R. de & INOUE, M.T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 26(7):949-53, 1991.

92. SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. & KLEIN, R.M. Euforbiáceas. In: REITZ, R. *Flora ilustrada catarinense*. Itajaí, EMPASC/Department of Botany (U.S.A.), 1988. 408p.
93. SPURR, S.H. & BARNES, B.Y. *Forest ecology*. New York, The Ronald Press, 1973. 571p.
94. STADFER, R.E.; HEUSER, C.W. & DENEKE, C.F. Rapid multiplication of veronica Red Fox propagated "in vitro". *HortScience*, Mont Vernon, 20(5):866-7, 1985.
95. STANDARDI, A. & ROMANI, F. Effects of some antioxidants on "in vitro" rooting of apple shoots. *HortScience*, Mont Vernon, 25(11):1435-6, 1990.
96. STRUVE, D.K. & BLAZICH, F.A. Comparison of three methods of auxin application on rooting of eastern white pine stem cuttings. *Forest Science*, Washington, 28(2):337-44, 1982.
97. SUBBAIAH, M.M. & MINOCHA, S.C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus teresicornis*. *Plant Cell Reports*, New York, 9(7):370-3, 1990.
98. TAYLOR, G.M. Root behavior as affected by soil structure and strength. In: CARSON, E.W. *The plant root and its environment*. Charlottesville, University Press of Virginia, 1974. p.272-91.
99. TENANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *The Journal of Ecology*, Oxford, 63:995-1001, 1975.
100. THORPE, T.A.; HARRY, I.S. & KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: tecnology and application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-36.

101. TOLEDO, A.R.M. de. Efeito de substratos na formação de mudas de laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera Rio] em vaso. Lavras, ESAL, 1992. 88p. (Tese MS)
102. TORREY, J.G. Root hormones and plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 27:435-59, 1976.
103. TRICOLI, D.M.; MAYNARD, C.A. & DREW, A.P. Tissue culture of propagation of mature trees of *Prunus serotina* Ehrh. I. Establishment, multiplication and rooting "in vitro". *Forestry Science*, Washington, 31(1):201-8, 1985.
104. UPADHYAYA, A.; SANKHLA, N.; DAVIS, T.D.; WEBER, D.J. & SMITH, B.N. "In vitro" propagation of a rubber producing desert shrub. *HortScience*, Mont Vernon, 20(5):864-5, 1985.
105. VASHISTA, B.D. & CHORPA, R.N. Effect of some aminoacids and complex organic nitrogenous substances on vegetative growth and gametangial formation in the female clone of riccia. *Plant Science*, Berkeley, 48:175-80, 1987.
106. VOLKAERT, H.; SCHOOPS, J.; PIETERS, A. & LANGHE, E.D. Influence of explant source on "in vitro" axillary shoot formation in oak seedlings. *Tree Physiology*, 6(1):87-93, 1990.
107. WANN, S.R.; WYCKOFF, G.W. & WYCKOFF, J.L. A tissue culture solution to a forestry problem - the propagation of a tetraploid european aspen. *Tree Planter's Note*, Washington, 39(3):28-30, 1988.
108. WARRAG, E.I.; LESNEY, M.S. & ROCKWOOD, D.L. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. *New Forests*, 4(2):67-79, 1990.

109. WYSSOKINSKA, H. Micropropagation of *Penstemon serrulatus* and iridoid formation in regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 33:171-80, 1993.
110. ZHANG, B. & STOLTZ, L.P. Shoot proliferation of *Euphorbia fulgens* "in vitro" affected by medium components. *HortScience*, Mont Vernon, 24(3):503-4, 1989.

APÉNDICE

QUADRO 1A. Resumo do quadro de análise de variância para número de estacas enraizadas ($\sqrt{x + 0,5}$), peso fresco da raiz ($\sqrt{x + 0,5}$), peso fresco da parte aérea ($\sqrt{x + 1}$), peso fresco da raiz ($\sqrt{x + 0,5}$), peso seco da parte aérea ($\sqrt{x + 0,5}$), comprimento de raiz [$\log(x + 20)$], ratio médio ($\sqrt{x + 0,3}$), número de ramos por estaca ($\sqrt{x + 1}$), relação raiz/parte aérea ($\sqrt{x + 0,7}$) no enraizamento de estacas. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	GL	Peso Fresco		Peso Seco		Comprimento médio	Ramo médio	Relação Nº de ramos Raiz/estacas	Nº de estacas enraizadas	
		Raiz	P. aérea Raiz	P. aérea Raiz	P. aérea Raiz					
Substrato (A)	1	0,78**	0,11	0,025**	0,163**	17,53**	0,0010*	3,11**	0,23**	
Tempo Imersão (B)	2	0,10	0,33*	0,001	0,073	3,54	0,0004	1,87**	0,04	
Conc. AIB (C)	4	0,28**	0,61**	0,005**	0,137**	9,06**	0,0002	1,08**	0,02	
A x B	2	0,14	0,01	0,002	0,005	4,46*	0,0001	0,29	0,01	
A x C	4	0,09	0,04	0,001	0,009	1,93	0,0001	0,06	0,03	
B x C	8	0,05	0,42**	0,001	0,060*	2,05	0,0001	0,50**	0,01	
A x B x C	8	0,06	0,11	0,001	0,028	1,50	0,0002	0,15	0,03	
Erro	90	0,05	0,10	0,001	0,024	1,27	0,0002	0,17	0,02	
C.V. (%)		20,90	21,11	4,07	16,43	20,33	2,47	23,12	14,05	12,45

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.
 ** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 2A. Resumo do quadro de análise de variância para explantes contaminados ($\sqrt{x + 0,5}$) e explantes sobreviventes ($\sqrt{x + 0,5}$) no estabelecimento "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Explantes contaminados	Explantes sobreviventes
Tempo	3	0,017	0,010
Antioxidantes	2	0,003	0,004
Tempo x Antioxidantes	6	0,021	0,012
Erro	36	0,014	0,010
C.V. (%)		13,44	9,23

QUADRO 3A. Resumo do quadro de análise de variância para explantes contaminados ($\sqrt{x + 0,5}$), explantes sobreviventes ($\sqrt{x + 0,5}$), explantes com necrose apical ($\sqrt{x + 0,5}$) e explantes com folhas novas ($\sqrt{x + 0,5}$) no estabelecimento "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios			
		Explantes			
		Contami- nados	Sobrevi- ventes	com necro- se apical	com folhas novas
Posição	1	0,00885	0,545**	0,7968**	0,368**
Folhas	1	0,00196	0,008	0,0005	0,038**
Pos. x Folhas	1	0,00003	0,008	0,0053	0,038**
Erro	16	0,00365	0,004	0,0024	0,002
C.V. (%)		8,17	6,55	5,35	5,01

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 4A. Resumo do quadro de análise de variância para número de microestacas enraizadas ($\sqrt{x+1}$), número de raízes ($\sqrt{x+1}$) e comprimento de raízes ($\sqrt{x+1}$) no enraizamento de microestacas "in vivo". ESAL, Lavras -MG, 1993.

Fontes de Variação	Quadrados Médios			
	GL	Nº de microestacas enraizadas	Nº de raízes	Comprimento de raízes
Água (A)	2	0,2884	0,245**	0,1905*
Posição (B)	1	0,0006	0,003	0,0001
Área foliar (C)	1	1,6341**	1,531**	1,0344**
A x B	2	0,0372	0,050	0,0708
A x C	1	0,0090	0,017	0,0010
B x C	2	0,0573	0,069	0,0050
A x B x C	2	0,0974	0,046	0,0320
Erro	36	0,0619	0,043	0,0512
C.V. (%)		18,57	16,48	18,14

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 5A. Resumo do quadro de análise de variância para número de microestacas enraizadas ($\sqrt{x+1}$), número de raízes ($\sqrt{x+1}$) e comprimento de raízes ($\sqrt{x+1}$) no enraizamento de microestacas "in vivo". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	Quadrados Médios			
	GL	Nº de microestacas enraizadas	Nº de raízes	Comprimento de raízes
Posição	3	0,79**	1,17**	0,58**
Conc. de IBA	4	0,33**	1,50**	0,29**
Pos. x IBA	12	0,17*	0,54**	0,10
Erro	60	0,07	0,16	0,07
C.V. (%)		16,52	21,64	18,33

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 6A. Resumo do quadro de análise de variância para número de explantes enraizados ($\sqrt{x + 0,5}$), número de raízes ($\sqrt{x + 1}$) e número de sobreviventes ($\sqrt{x + 0,5}$) no enraizamento "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação				GL	Nº de explantes enraizados	Nº de raízes	Nº de sobreviventes
Meio de cult. (A)				1	0,263**	1,383**	0,356**
Conc. de IBA (B)				4	0,039**	0,254**	0,034**
Agar (0,6%) (C)				1	0,005	0,026	0,852**
A x B				4	0,033**	0,199**	0,034**
A x C				1	0,001	0,004	0,582**
B x C				4	0,014	0,107	0,023
A x B x C				4	0,002	0,039	0,003
Erro				60	0,007	0,050	0,009
C.V. (%)					10,72	19,37	9,05

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 7A. Resumo do quadro de análise de variância para número de sobreviventes ($\sqrt{x + 0,5}$), número de explantes com folhas ($\sqrt{x + 0,5}$) e número de folhas ($\sqrt{x + 0,5}$) na multiplicação (I) "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação				GL	Nº de sobre-viventes	Nº de explantes com folhas	Nº de folhas
Meio de cult.				1	0,007	0,001	0,52*
Conc. de BAP				3	0,001	0,085**	1,61**
Meio x BAP				3	0,007	0,091**	0,57**
Erro				32	0,006	0,008	0,12
C.V. (%)					6,59	10,53	29,80

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.
** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 8A. Resumo do quadro de análise de variância para explantes com mais de 5 (cinco) folhas ($\sqrt{x + 0,5}$), menos de 5 (cinco) folhas ($\sqrt{x + 0,5}$) e explantes alongados ($\sqrt{x + 0,5}$) na multiplicação (II) "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		Explantes		
		com mais de 5 folhas	com menos de 5 folhas	Alongados
Conc. de ANA	3	0,727**	0,071**	0,146*
Conc. de BAP	3	0,135	0,018	0,032
ANA x BAP	9	0,086	0,018	0,019
Erro	48	0,071	0,018	0,035
C.V. (%)		30,71	17,63	23,81

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 9A. Resumo do quadro de análise de variância para explantes ($\sqrt{x + 0,5}$), comprimento das brotações ($\sqrt{x + 0,5}$) e número de gemas ($\sqrt{x + 1}$) na multiplicação (III) "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		Explantes alongados	Comprimento das brotações	Nº de gemas
Conc. de GA ₃	2	0,138**	0,215**	0,530**
Conc. de BAP	2	0,166**	0,109*	0,838**
Carvão ativado	1	0,014	0,094	0,796**
GA ₃ x BAP	4	0,009	0,008	0,030
GA ₃ x Carvão	2	0,002	0,027	0,089
BAP x Carvão	2	0,056*	0,158**	0,707**
GA ₃ x BAP x Carvão	4		0,003	0,017 0,019
Erro	54	0,016	0,031	0,096
C.V. (%)		14,10	19,08	22,01

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.