

EDUARDO FONSECA ARELLO

ASPECTOS GERAIS DO COMPORTAMENTO "IN VITRO"
DE *Hielmoyera coriacea* Martius (Guttiferae): PRODUÇÃO E
ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Fitotecnia, para obtenção do grau de "MESTRE".

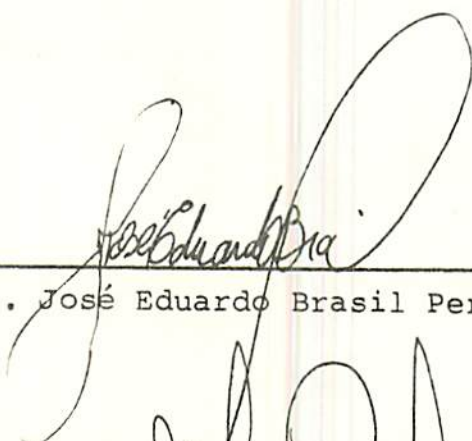
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

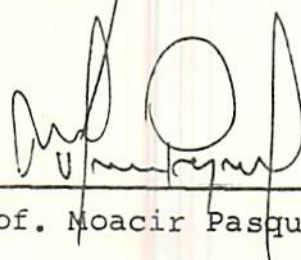
1991

ASPECTOS GERAIS DO COMPORTAMENTO "IN VITRO" DE Kielmeyera
coriacea Martius (Guttiferae): PRODUÇÃO E ENRAIZAMENTO
DE BROTAÇÕES

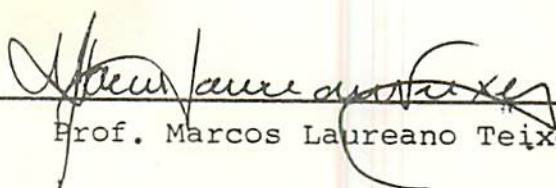
APROVADA:




Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto



Prof. Moacir Pasqual



Prof. Marcos Laureano Teixeira



Prof. Antônio Claudio Davide

Aos meus pais,
Newton e América;
e meus irmãos,
Ricardo e Bernadete
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura de Lavras na pessoa do Professor Juventino Júlio de Souza, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da ESAL na pessoa do Professor Fabiano Ribeiro do Vale, pelo apoio e incentivo aos pós-graduandos desta instituição.

À Coordenadoria de Pós-Graduação do Departamento de Agricultura na pessoa do Professor Moacir Pasqual, pelo apoio aos pós-graduandos deste Departamento e pela sua co-orientação e pessoal amizade.

Ao Orientador-Professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela paciência na transmissão dos ensinamentos e incentivo ao meu crescimento como profissional.

Aos professores dos Departamentos de Agricultura, Solos, Biologia, Ciências Exatas e Ciências Florestais, pelos ensiu

namentos transmitidos nas várias etapas do curso.

Aos funcionários dos Departamentos de Agricultura, Solos, Biologia, Centro de Processamento de Dados, Biblioteca Central e Oficina Gráfica, pela colaboração nas diversas etapas deste trabalho.

Aos colegas do curso de Fitotecnia e demais cursos de pós-graduação.

Aos amigos Raunira da Costa Araújo, Cássia Regina Moraes, Jussara, Rosana e Rosaura Gazzola, Márcio Henrique Pereira Barbosa, Márcio do Nascimento Ferreira, Sânia Lúcia Camargo, Lúcia Moraes Lira, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis e pelo carinho compartilhado em todos os momentos do nosso convívio.

A todos enfim,

muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A espécie <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius (Guttiferae).	4
2.2. Micropropagação vegetativa: produção e regeneração de plantas "in vitro"	11
2.3. Fontes de explantes e seu estabelecimento "in vi- tro"	16
2.4. Cultura de calos	19
2.5. Cultura de células em suspensão	22
2.6. Cultura de meristemas, ápices caulinares, etc	23
2.7. Cultura de embriões	25
2.8. Meios de cultura	26
2.9. Condições para o desenvolvimento da cultura	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Testes experimentais para micropropagação	40

3.1.1. Uso de diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético.	40
3.1.2. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina	40
3.1.3. Efeitos do fotoperíodo e da temperatura ...	41
3.1.4. Uso de diferentes concentrações dos sais e de sacarose no meio	41
3.2. Testes experimentais para enraizamento de brotações "in vitro"	42
3.2.1. Uso de brotações de diferentes tamanhos em concentrações variadas de ácido indolbutírico	42
3.2.2. Uso de diversas concentrações dos sais e de ágar no meio	42
3.2.3. Efeitos do pH e diversos níveis de ágar no meio	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Proliferação de brotações	44
4.1.1. Uso de diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético.	44
4.1.2. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina	50
4.1.3. Efeitos do fotoperíodo e da temperatura ...	56
4.1.4. Uso de diferentes concentrações dos sais e de sacarose no meio	60
4.2. Enraizamento de brotações "in vitro"	66

4.2.1. Uso de brotações de diferentes tamanhos em concentrações variadas de ácido indolbutírico	66
4.2.2. Uso de diversas concentrações dos sais de ágar no meio	73
4.2.3. Efeitos do pH e diversos níveis de ágar no meio	80
4.3. Considerações finais	86
5. CONCLUSÕES	91
6. RESUMO	93
7. SUMMARY	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
1	Planta adulta de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, com aproximadamente 2,50 m de altura, fotografada nas proximidades do município de Lavras. ESAL, Lavras/MG, 1990	5
2	Flores de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius. ESAL, Lavras/MG, 1990	7
3	Aspecto geral do fruto maduro (à esquerda) e das sementes (à direita) de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius. ESAL, Lavras/MG, 1990	8
4	Planta jovem de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, cultivada em viveiro, onde se pode apreciar o desenvolvimento das partes aéreas e subterrânea (xilopódio). ESAL, Lavras MG, 1990	9

FIGURAS

PÁGINA

- 5 Em cima: casca suberificada de Kielmeyera coriacea Marius, após sua imediata retirada da planta adulta. Em baixo: corte transversal do tronco da planta adulta de K. coriacea (ao centro) e placas industrializadas de cortiça em granulometrias diferentes (nas laterais). ESAL, Lavras/MG, 1990 10
- 6 Plântula de Kielmeyera coriacea Martius proveniente da germinação de sementes "in vitro", aos 60 dias. ESAL, Lavras/MG, 1990 36
- 7 Segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius inoculados em meio "MS" suplementado com BAP e NAA em mg/l, aos 45 dias. ESAL, Lavras/MG, 1990 47
- 8 Segmentos apicais (SA) e segmentos nodais (SN) de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius inoculados em meio "MS" suplementado com BAP em mg/l. ESAL, Lavras/MG, 1990 52
- 9 Segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius inoculados em meio "MS" acrescido de 0,5 mg BAP/l e cultivados em diferentes fotoperíodos e temperaturas. ESAL, Lavras/MG, 1990 59

FIGURAS

PÁGINA

- 10 Segmentos nodais de plântulas de Kielmeye
ra coriacea Martius inoculados em meio
"MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/
l e cultivados em diferentes concentra -
ções de sais e de sacarose. ESAL, Lavras/
1990 63
- 11 Brotações micropropagadas de Kielmeyera
coriacea Martius inoculadas em meio "MS"
suplementado com diversas concentrações
de IBA em mg/l. ESAL, Lavras/MG, 1990 ... 71
- 12 Brotações micropropagadas de Kielmeyera
coriacea Martius inoculadas em meio "MS"
modificado e em diversas concentrações de
sais e ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990 75
- 13 Brotações micropropagadas de Kielmeyera
coriacea Martius inoculadas em meio "MS"
modificado e em várias concentrações de
ágar e pH diferentes. ESAL, Lavras/MG,
1990 82

LISTA DE QUADROS

QUADROS	PÁGINA
1 Requerimentos nutricionais e hormonais em cultura de tecidos, órgãos e células vegetais. ESAL, Lavras/MG, 1990	28
2 Composição básica do meio de cultura de <u>MURASHIGE & SKOOG</u> (1962) utilizado nos testes experimentais de micropropagação e de enraizamento de brotações "in vitro" de <u>K. coriacea</u> . ESAL, Lavras/MG, 1990	38
3 Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, em meio "MS" suplementado com BAP e NAA. ESAL, Lavras/MG, 1990	48

QUADROS

PÁGINA

4	Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius em meio "MS" suplementado com BAP e NAA. ESAL, Lavras/MG, 1990	50
5	Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais e apicais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, em meio "MS" suplementado com BAP. ESAL, Lavras/MG, 1990	53
6	Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais e apicais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, em meio "MS" suplementado com BAP. ESAL, Lavras/MG, 1990	56
7	Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, em meio "MS" suplementado com 0,5 mg BAP/l sob temperaturas diferentes. ESAL, Lavras/MG, 1990	58

QUADROS

PÁGINA

- | | | |
|----|--|----|
| 8 | Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, em meio "MS" suplementado com 0,5 mg BAP/l sob diferentes fotoperíodos e temperaturas. ESAL, Lavras/MG, 1990 | 58 |
| 9 | Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, em meio "MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/l e em diferentes concentrações de sais e sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1990 | 62 |
| 10 | Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, em meio "MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/l e em diferentes concentrações de sais. ESAL, Lavras/MG, 1990 | 65 |

QUADROS

PÁGINA

- 11 Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/l e em diferentes concentrações de sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1990 65
- 12 Número médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" suplementado com diversas concentrações de IBA. ESAL, Lavras/MG, 1990 68
- 13 Tamanho (cm) médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" suplementado com diversas concentrações de IBA. ESAL, Lavras/MG, 1990 70
- 14 Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" suplementado com diversas concentrações de IBA. ESAL, Lavras/MG, 1990 72

15	Número médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes concentrações de sais e ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990	77
16	Tamanho (cm) médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes concentrações de sais e ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990	79
17	Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes concentrações de sais. ESAL, Lavras/MG, 1990	79
18	Número médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de <u>Kielmeyera coriacea</u> Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras/MG, 1990	81

QUADROS

PÁGINA

- 19 Tamanho (cm) médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras/MG, 1990 84
- 20 Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras/MG, 1990 85

1. INTRODUÇÃO

A principal vegetação que caracteriza o estado de Minas Gerais é o cerrado, onde o gênero Kielmeyera ocorre naturalmente, ALMEIDA (1946). Esta vegetação é rica e variada e possui espécies que apresentam interesse econômico. Este interesse econômico surge na medida em que há produção de: 1) madeira, para a fabricação de pranchões, carvão e celulose; 2) tanino, para a indústria do couro; 3) cortiça, para a confecção de placas de revestimento acústico e isolamento térmico de interiores; 4) princípios farmacológicos, para a indústria química e farmacêutica. As espécies que possuem interesse econômico são acentuadamente exploradas. A exploração desordenada e a rápida transformação das áreas de cerrado em campos de produção agrícola, muito têm contribuído para a drástica extinção de algumas destas espécies. Torna-se necessário, portanto, a adoção de técnicas mais apropriadas e maiores estudos para racionalizar a exploração, garantindo maiores produções e a sua continuidade nos cerrados. Através da propagação vegetativa, espécimes desejáveis e selecionados pela sua produtividade e sanidade podem ser clonados.

Os métodos convencionais de propagação vegetativa exploram mecanismos naturais de reprodução assexual. O uso de estacas e enxertia, particularmente em árvores e arbustos, são exemplos destes métodos, muito embora, certas espécies vegetais apresentam sérios problemas quanto ao enraizamento de estacas ou quanto ao pegamento de enxertos. A micropropagação vegetativa, representada pela cultura de células e tecidos vegetais, igualmente, baseia-se em fenômenos naturais e, onde os métodos convencionais são muito demorados ou falhos, justifica-se o seu uso.

A cultura de células e tecidos vegetais oferece um método alternativo de propagação assexual para muitas plantas, sendo que, em determinados casos, seu uso já se faz em escala industrial. Suas vantagens surgem na medida em que é capaz de promover um maior grau de multiplicação, exigindo pouco espaço e tempo. É capaz de garantir, ainda, estoques de germoplasma em extinção, conservando espécies raras e importantes. Serve, também, como suporte ao melhoramento genético das espécies através da indução e seleção de mutantes e da hibridação via fusão de protoplasmas ou via cultura de embriões e óvulos.

A micropropagação vegetativa de espécies florestais tem sofrido significativos progressos durante os últimos anos. ABBOTT (1978 e 1977) elaborou uma extensa lista de espécies, das quais a grande maioria ocorre em florestas de clima temperado, que são propagadas atualmente por métodos de cultivo "in vitro". Vale destacar alguns trabalhos como os de LEE & RAO (1980) que estudaram a viabilidade de micropropagação de espécies florestais tropicais, assim como os de SHIPTON & JACKES (1986). MHATRE

et alii (1985), SITA et alii (1979) e VENKETESWARAN & GANDHI (1981) tendo, estes últimos, trabalhado com Copaífera multijuga oriunda do Brasil.

A espécie Kielmeyera coriacea Martius, Guttiferae, é bastante comum nos cerrados de Minas Gerais. Esta espécie tem um grande interesse econômico pois trata-se de uma fonte de produção potencial e alternativa de cortiça, razão pela qual é muito explorada. Esta exploração é predominantemente extrativista e, aliada à expansão da fronteira agrícola nos cerrados, causou o total desaparecimento desta espécie em muitas regiões onde, outrora, era abundante.

O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos de diversos componentes do meio de cultura MURASHIGE & SKOOG (1962) sobre o desenvolvimento de explantes de Kielmeyera coriacea Martius "in vitro", no que diz respeito à proliferação de brotações e ao enraizamento das mesmas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie Kielmeyera coriacea Martius (Guttiferae)

O gênero Kielmeyera é próprio dos cerrados e é facilmente encontrado em Minas Gerais, embora, em determinadas áreas já tenha quase desaparecido. As árvores, no geral, são de pequeno porte e seu caule de pequeno diâmetro. A espécie Kielmeyera coriacea é apontada por SADDI (1982) e por ALMEIDA (1946) como uma das mais típicas do cerrado e se dispersa desde o estado da Bahia até países limítrofes como o Paraguai e a Bolívia. SADDI (1982) aponta, ainda, a ocorrência desta espécie no Mato Grosso (imediações da Cachoeira Vêu da Noiva e Serra dos Parecis), em Goiás (nas proximidades de Caldas Novas), em Rondônia (nas adjacências de Porto Velho) e em São Paulo (na reserva de Emas, no município de Mogi-Guaçu). A Figura 1 retrata um espécime nas imediações do município de Lavras-MG. É vulgarmente conhecida por "pau-santo".

Os representantes desta espécie apresentam estatura variando de 1 a 4 m, com folhas obovais, coriáceas e espatulares.

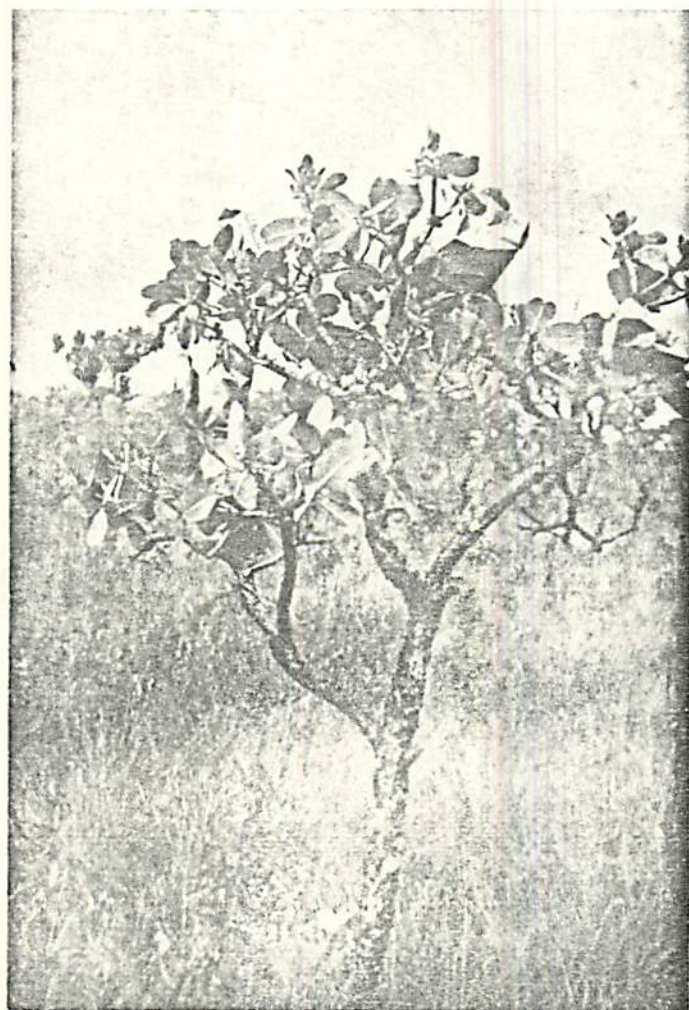


FIGURA 1 - Planta adulta de Kielmeyera coriacea Martius, com a -
proximadamente 2,50 m de altura, fotografada nas pro-
ximidades do município de Lavras. ESAL, Lavras/MG ,
1990.

Tem de 20 a 60 cm² de área foliar. As flores são carnosas e possuem de 6 a 8 cm de diâmetro e passam do branco ao rosa à medida que senescem (Figura 2). Os frutos também são carnosos, alongados e ásperos, mas, à medida que amadurecem tornam-se lenhosos (Figura 3), ALMEIDA (1946). As flores e os frutos são utilizados, segundo relatos feitos por FERREIRA (1974), por floricultores para a confecção de alguns arranjos ornamentais denominados popularmente de "Flores do Planalto". Nos trabalhos de DIONELLO & BASTA (1980) e DIONELLO (1978) informações mais detalhadas sobre os caracteres quantitativos e qualitativos dos frutos, assim como das sementes, podem ser conseguidas.

A espécie Kielmeyera coriacea, assim como a grande maioria das espécies de cerrado, apresenta suas partes subterrâneas muito mais desenvolvidas que sua parte aérea. A Figura 4 mostra mais detalhadamente esta característica assim como o xilópódio, uma estrutura subterrânea especializada em armazenamento de água e apontada por FERRI (1979) como comum à muitas outras espécies típicas do cerrado.

Outra característica marcante da Kielmeyera coriacea, apontada por SOUZA (1947), é a sua casca fortemente suberificada (Figura 5) da qual extrai-se a cortiça, principal matéria prima para a fabricação de placas utilizadas em revestimentos acústicos, térmicos e decorativos de ambientes.

A literatura cita o gênero Kielmeyera como produtor de uma grande variedade de compostos orgânicos do grupo das xantonas, compostos estes determinados por GOTTLIEB (1971, 1970 e

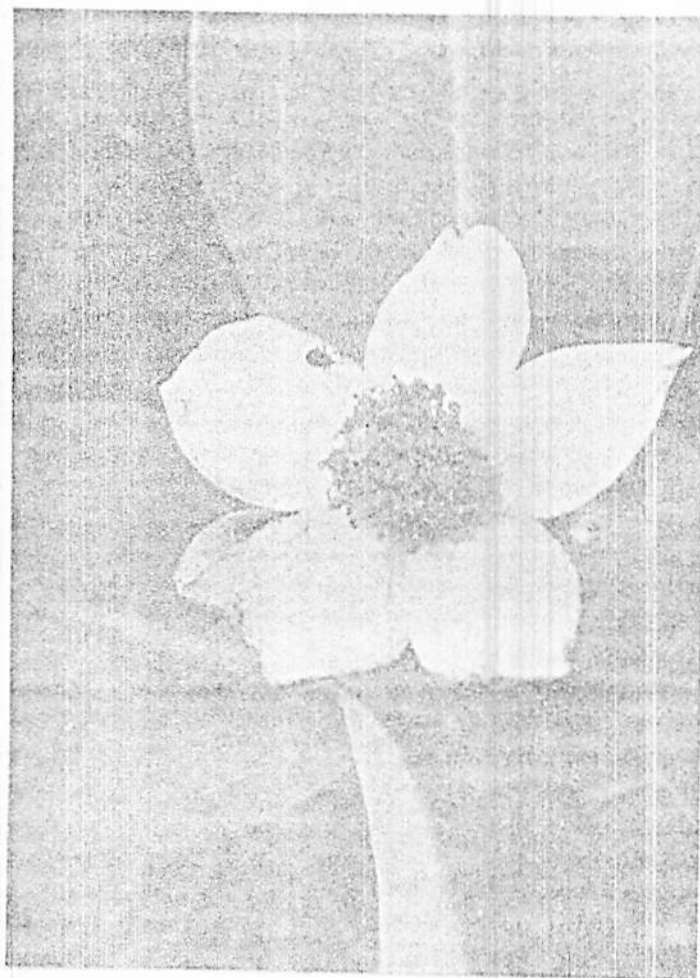


FIGURA 2 - Flores de Kielmeyera coriacea Martius. ESAL, Lavras/
MG, 1990.

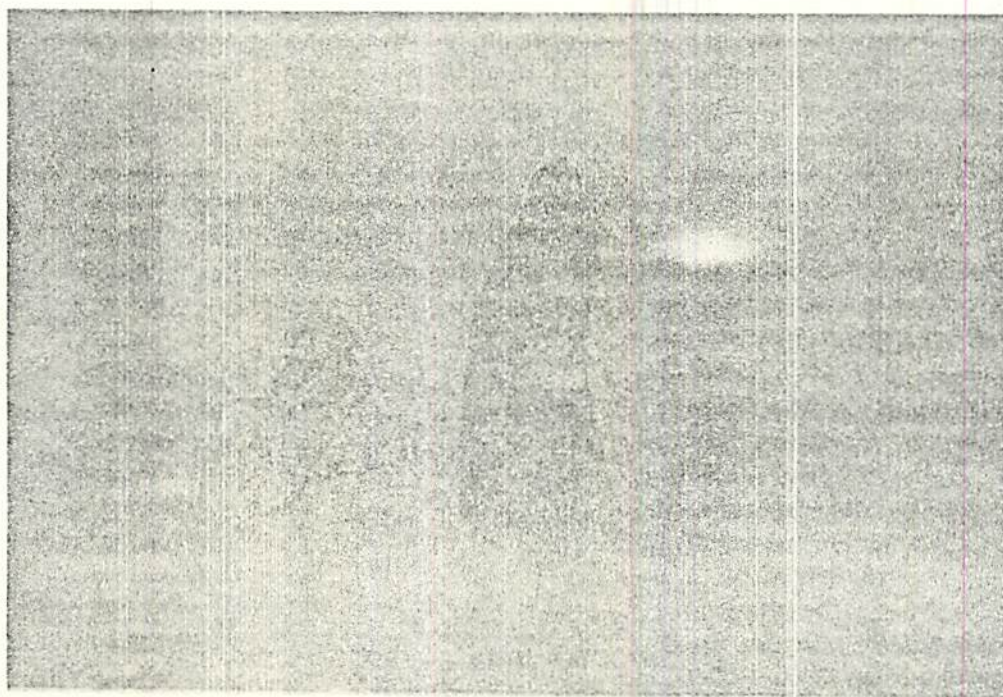


FIGURA 3 - Aspecto geral do fruto maduro (à esquerda) e das se-
mentes (à direita) de Kielmeyera coriacea Martius.
ESAL, Lavras/MG, 1990.

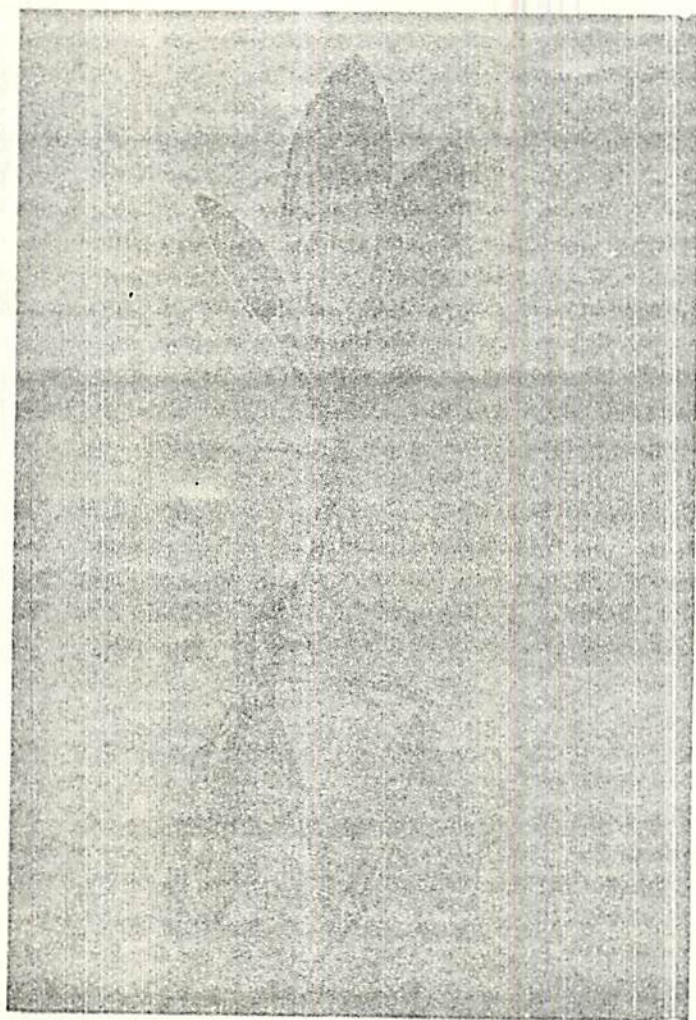


FIGURA 4 - Planta jovem de Kielmeyera coriacea Martius, cultivada em viveiro, onde se pode apreciar o desenvolvimento das partes aérea e subterrânea (xilopódio). ESAL, Lavras/MG, 1990.

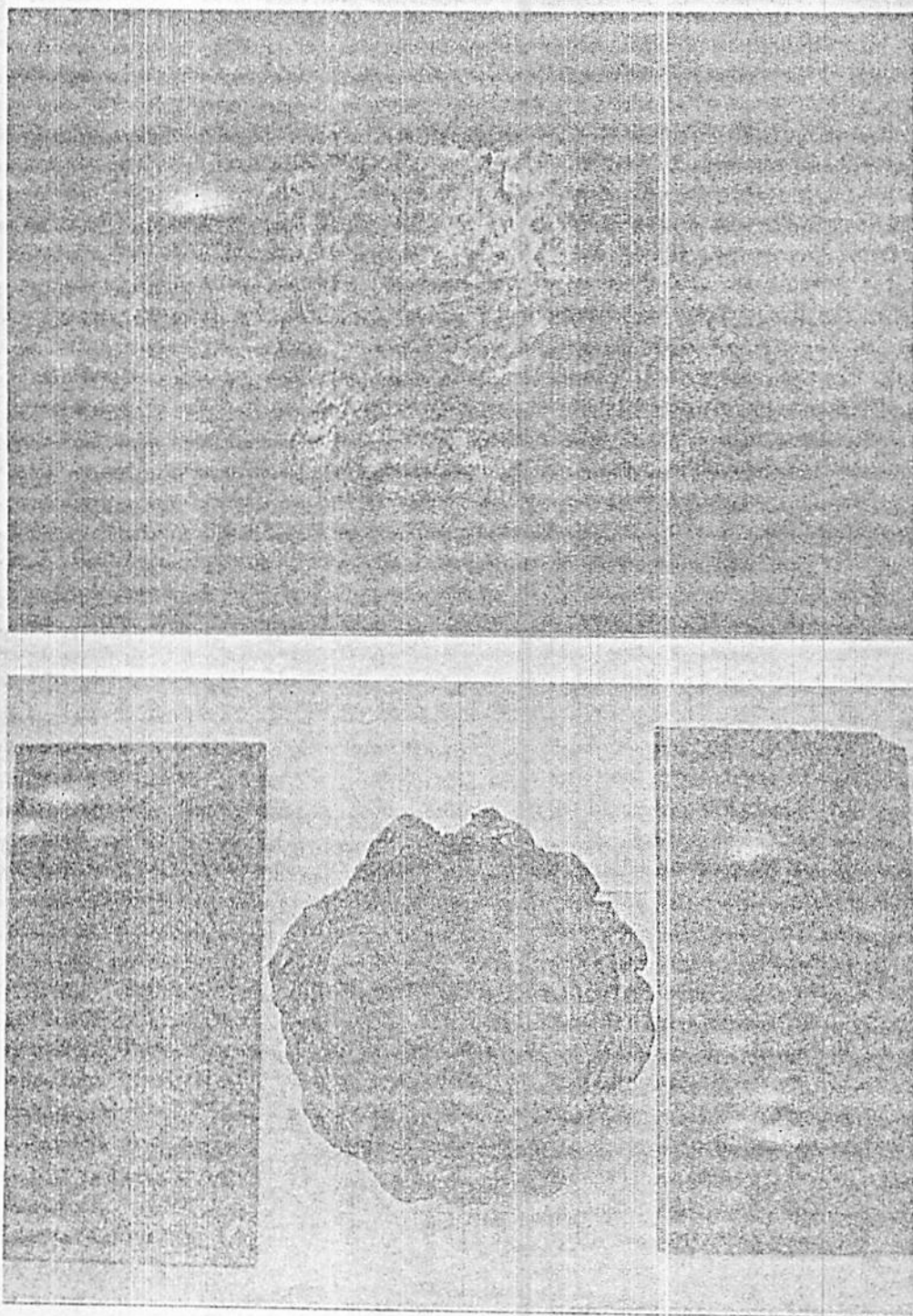


FIGURA 5 - Em cima: casca suberificada de Kielmeyera coriacea Martius, após sua imediata retirada da planta adulta. Em baixo: corte transversal do tronco da planta adulta de K. coriacea (ao centro) e placas industrializadas de cortiça em granulometrias diferentes (nas laterais). ESAL, Lavras/MG, 1990.

1969). Um trabalho foi feito por LOPES et alii (1977) e que determinou a presença de uma xantona particular em Kielmeyera coriacea, a osajaxantona. Trabalhos preliminares citados por este mesmo pesquisador atestam que a osajaxantona possui propriedades cercaricidas, bem como, de repelente das cercárias de Schistosoma mansoni, causador da "barriga d'água", doença que aflige milhões de brasileiros. Ainda sob o ponto de vista de planta medicinal, a Kielmeyera coriacea produz uma resina que, segundo PIO CORRÊA (1926), é usada na medicina popular contra a dor-de-dentes, como tônico e como emoliente.

2.2. Micropropagação vegetativa: produção e regeneração de plantas "in vitro"

MINOCHA (1980) sugere e discute três grandes caminhos para a propagação vegetativa de plantas, em geral, através da técnica de cultura de tecidos. São eles:

a) a produção de calos e suspensão de células a partir de pedaços de partes da planta, denominados explantes, seguida pela indução de embriogênese;

b) a produção de brotações adventícias e gemas diretamente a partir de pedaços de partes da planta ou de um calos pré-existente, com posterior enraizamento;

c) a indução de proliferação de brotações e gemas axi

lares para a produção de brotos múltiplos que podem, eventualmente, ser enraizados.

De acordo com as discussões deste autor, os dois primeiros caminhos, aos quais muitos pesquisadores se dedicaram, não trouxeram benefícios significativos para a propagação de muitas plantas. Ao contrário, o terceiro caminho tem proporcionado a obtenção de um grande número de material clonal que se caracteriza pela sua uniformidade, característica difícil de se conseguir, principalmente, quando se pretende produzir clones a partir de um calo ou de uma suspensão celular. A produção de clones via proliferação de gemas ou brotações axilares é rápida e parece ter uma larga aplicação. Este método de clonagem provou ser eficiente para a propagação de Betula papyrifera e B. alleghaniensis, embora alguns resultados satisfatórios tenham sido conseguidos com a formação de calos e a diferenciação de algumas plantas a partir deste calos.

De maneira semelhante, VON ARNOLD (1989) descreve, também, três caminhos ou maneiras principais para se regenerar plantas "in vitro". São eles:

- a) a regeneração a partir de meristemas pré-existent;
- b) a regeneração a partir de meristemas adventícios e
- c) a regeneração via embriões somáticos.

O método mais comumente empregado para a propagação clonal de espécies florestais consiste em regenerar plantas a

partir de meristemas pré-existentes. O emprego de citocininas é uma constante e são requeridas durante todo o processo de regeneração. VOGELMANN et alii(1984) estudaram a absorção de benziladenina (BA), uma das citocininas mais empregadas em cultura de tecidos, em explantes de Picea abies e Pinus sylvestris e verificaram, durante o processo de regeneração, que a sua absorção era diretamente proporcional à sua concentração no meio de cultura. Segundo BERGMAN et alii(1985) a regeneração via meristemas pré-existentes é dependente não só de citocininas como, também, do genótipo e do número de subculturas prévias do material. VON ARNOLD (1989) ressalta, ainda, que brotações regeneradas, quando expostas à citocininas por períodos longos de tempo, tem seu desenvolvimento afetado e podem adquirir formas anormais com o aparecimento de folhas pequenas e aciculadas. A sua redução ou completa eliminação do meio de cultura é usualmente requerida para a alongação dos brotos e no enraizamento dos mesmos.

A indução e o desenvolvimento de gemas adventícias também é um método bastante utilizado na multiplicação "in vitro" e tem sido descrito em tecidos jovens de coníferas, DURZAN (1980) e THORPE (1988). As gemas adventícias podem ser formadas diretamente do explante ou indiretamente de um calo. VON ARNOLD (1989) alerta para os riscos de aberrações cromossômicas que podem ser induzidas na fase de calos, o que pode comprometer a uniformidade das brotações dele originadas. Para BALL (1987); CHALUPA (1987) e AHUJA (1987), no entanto, a constituição morfológica e genética de plântulas regeneradas a partir de calo tem sido idênticas às da planta mãe, no caso de Sequoia sempervirens, Be -

tula pendula e Populus sp, respectivamente. A regeneração via meristemas adventícios envolve a indução de meristemóides que se dá através do emprego de reguladores do crescimento. Os meristemóides induzidos transformam-se em primórdios de gemas, gemas propriamente ditas, brotações e, finalmente, plântulas. Uma descrição mais detalhada desta transformação poderá ser vista em THORPE (1988), que a demonstra em Pinus radiata, em VON ARNOLD & HACKMAN (1988) e BORNMAN (1987), que a demonstram em Picea abies e em OKA et alii(1982), que a demonstram em Eucalyptus globulus.

Os meristemóides constituem-se em locais ativos e potenciais de desenvolvimento, com tecido ainda não diferenciado, a partir do qual, novas células e/ou estruturas adventícias são capazes de resultar, BORNMAN (1987). Os meristemóides para se desenvolverem em gemas adventícias devem ser tratados com citocininas. Vários trabalhos têm sido feitos em Picea abies neste sentido. Citam-se as pesquisas de BORNMAN & JANSON (1980), VOGELMAN et alii(1984); BORNMAN & VOGELMAN (1984) e VON ARNOLD & ERIKSSON (1985), as quais apontam que há um sincronismo de diferenciação em gemas quando os meristemóides sofrem este tratamento com citocininas. As gemas desenvolvem-se mais fortes, a variação entre diferentes tratamentos é menor.

AITKEN-CHRISTIE et alii(1988), por sua vez, sustentam a hipótese de que é possível multiplicar meristemóides, por contínuas culturas, desde que num meio provido de citocinina. Em cotilédones de Pinus radiata, após a calogênese, os meristemóides separam-se facilmente em pedaços menores após 9 semanas em meio com benziladenina.

A regeneração via gemas adventícias, porém, parece a apresentar um problema, qual seja, o desenvolvimento destas gemas até formarem plântulas. Como foi dito, anteriormente, em muitas coníferas têm-se usado este método, desde que o explante inicial seja oriundo de tecido jovem. Quando se usa material adulto, como fonte de explantes, parece ser somente possível regenerar plantas em pouquíssimas espécies como Sequoia sempervirens, de acordo com BOULAY (1987) e como Pinus pinaster, de acordo com HORGAN (1987).

A produção de vigoroso desenvolvimento dos brotos tem se mostrado, em alguns casos, altamente dependente do genótipo como mostra VON ARNOLD (1982) ao estudar os fatores que influenciam a formação, o desenvolvimento e o enraizamento de brotações adventícias oriundas de embriões de Picea abies. A citocinina, como já foi dito, é essencial para a indução de gemas adventícias, mas, para promover o desenvolvimento destas gemas, os explantes tem que ser transferidos para um meio de cultura isento de citocininas ou com baixas concentrações destas se estiverem presentes. VON ARNOLD & GRÖNROOS (1986) afirmam que é crítico o tempo para esta transferência e alertam para este fato.

O desenvolvimento de brotações adventícias, segundo VON ARNOLD & ERIKSSON (1984), pode ser afetado pela concentração de ágar no meio de cultura. Aumentando-se a concentração de ágar a ocorrência de brotações vitrificadas cai, mas, ao mesmo tempo, reduz o desenvolvimento em Picea abies. Entretanto, para RAO & OZIAS-AKINS (1985) a combinação de ágar com gelrite apresentou bons resultados em culturas de Santalanum album.

A regeneração a partir de embriões somáticos pode ser usada com sucesso na micropropagação e, para VON ARNOLD (1989), em alguns casos é até mais vantajosa ao compará-la com os outros dois métodos de regeneração. As plantas oriundas de embriões somáticos têm um sistema radicular que, algumas vezes, é superior ao sistema radicular adventício. Grandes quantidades de embriões somáticos podem ser armazenados em pequenos volumes e, posteriormente, encapsulados como sementes sintéticas. Um grande problema, que vem limitando a difusão desta técnica em essências florestais, é o pequeno número de embriões somáticos que completam o seu desenvolvimento para formarem plântulas e, quando conseguem, a maioria delas é pouco vigorosa.

2.3. Fontes de explantes e seu estabelecimento "in vitro"

Os primeiros tecidos de árvores cultivados "in vitro" aconteceram antes da descoberta das citocininas, um importante grupo de fito-hormônios que promovem a proliferação de brotos. Estes tecidos eram conseguidos à nível de câmbio interfascicular que, mais tarde, descobriu-se serem extremamente ricos em citocininas endógenas. Uma vez colocados em meio de cultura suplementado com auxinas, eram capazes de originar calos em abundância e que, mais tarde, diferenciavam algumas poucas plantas. Como exemplos podem ser citadas as espécies: Populus tremuloides (WINTON, 1970), Corylus avellana (RADOJEVIC et alii, 1975) e Malus

sylvestris (ABBOTT & WHITELEY, 1976), embora esta última tenha se mostrado incapaz de regenerar plantas. Para a micropropagação, em geral, tecidos mais adequados devem ser utilizados como explantes. Assim, explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica são mais adequados para estimular a formação de calos, conferindo a estes uma maior potencialidade morfo-genética, isto é, uma maior facilidade para emitirem brotações novas e radículas, principalmente. Os tecidos meristemáticos são os mais indicados e se compõem de numerosas células não vacuolizadas, de alta atividade metabólica, com muito pouca diferenciação e praticamente isentas de poliploidia e aneuploidia, características constantes em tecidos diferenciados. Entretanto, ABBOTT (1978) afirma que outras partes da planta podem ser usadas como boas fontes de explante. Citam-se os primórdios foliares, gemas, segmentos caulinares como os nódulos, ápices caulinares, raízes, bases de folhas, hipocótilos e órgãos florais como estames, anteras, ovários e óvulos, que podem ser escolhidos de acordo com a sua afinidade ou capacidade de se comportarem bem "in vitro", isto é, de acordo com o interesse de cada pesquisador.

É fundamental que se escolha um tecido sadio, de uma planta também sadia, para fonte dos explantes. Uma superfície de esterilização deve ser requerida para todos os tipos de explante, embora, os meristemas apicais apresentem uma maior garantia quanto à esta superfície por estarem encapsulados e protegidos pelos primórdios foliares. Estão normalmente livres de patógenos contaminantes como os fungos e as bactérias. Os meristemas podem ser excisados por dissecação manual com o auxílio de bisturis e mi-

croscópios estereoscópicos em condições assépticas, facilmente conseguidas numa câmara de fluxo laminar, PIERIK (1987) e RUTLEDGE & DOUGLAS (1988). Árvores adultas, testadas geneticamente, são as mais atrativas para a propagação, não obstante a dificuldade com a qual muitos pesquisadores se deparam em estabelecer culturas "in vitro" a partir de explantes de espécimes mais velhos. Então, para se facilitar o estabelecimento de explantes provenientes destes casos é recomendado que se selecione os tecidos mais jovens da planta. Explantes vindos de ramos novos ou de ápices caulinares têm demonstrado ser mais fáceis de se estabelecer do que aqueles vindos de tecidos mais maduros ou mais próximos do tronco, BONGA (1980 e 1977). BURGER (1987) confirma este fato ao trabalhar com Eucalyptus sideroxylon. O rejuvenescimento de material mais velho parece ser uma prática muito viável e usada no gênero Eucalyptus conforme os apontamentos de CALDAS & KITAHARA (1975); FRANCIET & BOULAY (1982) e GONÇALVES (1982 e 1983). Uma outra prática bastante interessante foi descrita por AHUJA (1987) e que consiste em pulverizar as gemas ainda dormentes na planta mãe com citocininas antes destas mesmas gemas serem estabelecidas "in vitro".

A época do ano em que é feita a coleta de material na árvore mãe tem sido reconhecida por BONGA (1987) e por WOLTER & SKOOG (1966) como um fator muitíssimo importante para o sucesso de seu estabelecimento "in vitro". Assim, as melhores estações do ano para a coleta de material em árvores doadoras são a primavera, na qual ocorre uma quebra natural de dormência das gemas, e o verão. Entretanto, BONGA (1987) faz algumas considera

ções à respeito do risco de contaminações ser maior justamente nestas mesmas épocas.

A liberação de fenóis "in vitro" é outro problema a considerar quando do estabelecimento de material recém excisado. Algumas espécies de essências florestais, especialmente as tropicais, contém altas concentrações de substâncias fenólicas, que são oxidadas no momento da excisão do material. Esta oxidação faz com que o material isolado torne-se com coloração escura, geralmente marrom ou preto, e com paralisação de seu crescimento. CRESWELL & NITSCH (1975) atestam este fato ao observar que o fenômeno da rizogênese, em cultura de Eucalyptus grandis, foi completamente inibida a partir da exudação de fenóis para o meio de cultura. GEORGE & SHERRINGTON (1984) e THORPEL & PATEL (1984) afirmam que os tecidos que contém alta concentração de componentes fenólicos são difíceis de serem cultivados devido à ação de enzimas polifenases que oxidam as substâncias fenólicas inibindo o crescimento. Técnicas para a redução de formação de tais substâncias durante o estabelecimento do explante podem ser vistas em COMPTON & PREECE (1986).

2.4. Cultura de calos

As auxinas estão intimamente relacionadas com a produção de calos. A presença destes fito-hormônios, em quantidades relativamente elevadas no meio de cultura, faz com que os explante

tes formem calos que, por sua vez, podem ser multiplicados durante várias subculturas. A massa de células que compõe os calos é desorientada, isto é, não diferenciada embora suas células o sejam. Grandes quantidades de auxinas, normalmente, inibem a morfogênese, mas, a sua retirada do meio de cultura ou colocando - se citocinina de tal modo que a razão auxina/citocinina no meio assumam um determinado equilíbrio (SKOOG & MILLER, 1957) pode-se acarretar a formação de brotações. Os trabalhos de NISHI et alii (1968) e CAMPBELL & DURZAN (1975) levaram a resultados que fortaleceram esta teoria, embora os trabalhos de DE FOSSARD et alii (1974) tenham levado a resultados contrários, pois, cento e setenta e cinco diferentes combinações entre auxina/citocinina estudadas não levaram à nenhuma resposta morfogênética em calos de Eucalyptus bancroftii. De maneira semelhante, JACQUIOT (1966) demonstra uma estreita relação entre determinadas doses de auxina e meso-inositol na indução de brotações em calos de Ulmus campestris.

Algumas vezes, a partir do calos pode acontecer a formação de embrióides e em Citrus sinensis, KOCHBA et alii (1974) notaram este fenômeno quando meios de cultura eram empobrecidos de sacarose. A formação de embrióides é citada por NAGMANI & BONAGA (1985) em calos subculturados de Larix decidua, trabalho onde se pode observar fotografias do processo de formação destas estruturas e onde uma pequeníssima quantidade de embrióides foi capaz de se desenvolver em plântulas. BECWAR et alii (1987) sugerem um método original para quantificar o nível de embriões formados a partir de calos de Picea abies e, utilizando esta mesma

espécie, WANN et alii (1987) foram capazes de diferenciar bioquimicamente calos embriogênicos e calos não embriogênicos.

A morfogênese em calos, entretanto, não necessariamente pode levar a plântulas viáveis. Embora brotos e raízes possam ser emitidos, WETMORE & RIER (1963) afirmam que uma conexão vascular entre eles pode não acontecer. Estes mesmos autores demonstraram a extrema necessidade do estabelecimento de tecidos vasculares para gemas enxertadas em calos de Syringa vulgaris sobreviverem e que estes tecidos nem sempre se diferenciavam.

O tipo de explante que originou os calos parece determinar a capacidade morfogenética do mesmo. Raízes, brotações, embrióides e, algumas vezes, plântulas têm sido conseguidos em calos oriundos de tecidos jovens de Pinus palustris (SOMMER et alii, 1975); Picea glauca (CAMPBELL & DURZAN, 1975); Thuja orientalis (KONAR & OBEROI, 1965); Ulmus americana (DURZAN & LOPUSHANSKI, 1975), Ilex aquifolium (HU & SUSSEX, 1971) e Betula pendula (SIMOLA, 1985).

Calos cultivados por longos períodos de tempo ou em determinados meios nutritivos podem desenvolver células mutantes que, por sua vez, podem originar plantas anormais. Na propagação clonal isto é desinteressante e em MEHRA & MEHRA (1974) e MEHRA & ANAND (1979) pode-se apreciar a ocorrência de diferentes estados de ploidia e aneuploidia nas células de Prunus amygdalus e Cryptomeria japonica, respectivamente.

2.5. Cultura de células em suspensão

Os calos podem ser dissociados em meio de cultura líquido sob agitação e originar uma suspensão de células isoladas ou em pequenos agregados. Estas células podem se dividir e desenvolver à semelhança de células bacterianas. As taxas de multiplicação são bastante elevadas, sendo comum dobrar-se o número de células a cada dia de cultura. Algumas destas células podem se transformar em embrióides o que torna esta técnica potencialmente promissora para a produção de um grande número de plântulas, num espaço bastante reduzido, ABBOTT (1978). Um número relativamente grande de plantas herbáceas tem respondido à esta técnica mas a não formação de embriões parece ser bastante comum às espécies florestais. Suspensões celulares têm sido conseguidas de Pseudotsuga menziesii (WINTON, 1972) mas a embriogênese não foi reportada. Alguns sucessos têm sido conseguidos por SITA et alii (1979) utilizando suspensões de Santalum album; DURZAN & GUPTA (1987) utilizando, também, Pseudotsuga menziesii; BOULAY et (1988) com Picea abies e HACKMAN & VON ARNOLD (1983) ao utilizar células de Pinus contorta em suspensão. Os resultados destes trabalhos levaram invariavelmente à formação de embriões somáticos, protoplastos ou poliembriogenia. DURZAN & LOPUSHANSKI (1975), no entanto, foram capazes de desenvolver células de Ulmus americana por cinco meses em suspensão, as quais, uma vez em meio solidificado com ágar, regeneraram plântulas aparentemente normais.

2.6. Cultura de meristemas, ápices caulinares, etc

Os meristemas têm se constituído no tecido mais comu-
mente empregado para a propagação vegetativa "in vitro", ABBOTT
(1978). Através dele é possível a produção de plantas livres de
vírus. Esta característica dos meristemas originarem uma descen-
dência isenta de viroses foi bastante discutida por QUAK (1977).
Este tipo de tecido é usado para a propagação massal de muitas
herbáceas (MURASHIGE, 1974) e tem sido empregado na produção co-
mercial de Anthurium (PIERIK et alii, 1974), Gerbera (MURASHIGE,
1974), morangueiro (BOXUS, 1974) e outras espécies.

Os meristemas são comumente tratados com citocininas
para a produção de pequenos brotos, embora, dependendo do genóti-
po, sejam capazes de originá-los espontaneamente. Utilizando ci-
tocininas para o tratamento de meristemas, ABBOTT & WHITELEY
(1976) conseguiram boa proliferação de brotos em macieira. Resul-
tados interessantes foram conseguidos, também, por BOXUS (1974)
em morangueiros ao proceder esta técnica. A combinação de citoci-
ninas com outros grupos de reguladores do crescimento, também, é
citada na literatura como benéfica ao estabelecimento e à cultu-
ra de meristemas. Neste sentido, PASQUAL & ANDO (1989) emprega-
ram várias concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido
naftalenoacético, ao cultivarem gemas axilares excisadas de Ci-
trus sinensis "in vitro". De maneira análoga HEILE-SUDHOLT et alii
(1986) usaram, ao cultivarem ápices caulinares de Juglans nigra,
benziladenina e ácido indolbutírico. Já para a cultura de Prunus

sp, através também de ápices caulinares, BASSI (1984) utilizou benzilaminopurina conjugada com ácido indolbutírico e ácido giberélico.

Muitas essências florestais têm sido micropropagadas por cultura de meristemas. Dentre elas citam-se as tropicais: Bauhinia blakeana, Cassia fistula, Eugenia grandis, Pterocarpus indicus, Swietenia macrophylla e Cinnamomum iners em LEE & RAO (1980), através do emprego de cinetina e benziladenina suplementadas ao meio de cultura. MHATRE et alii (1985) incorporando, não só cinetina e benziladenina como, também, zeatina ao meio de cultura, conseguiram regenerar plantas de Morus indica via meristemas axilares. Por sua vez, e com a suplementação de benzilaminopurina ao meio de cultivo, PAILY & D'SOUZA (1986) obtiveram um grande número de brotações em Lagstroemia flos-reginae. Vários trabalhos foram feitos com Eucalyptus, como os de DE FOSSARD et alii (1974); DICELLO & DUHOX (1984); DURAND-CRISWELL & NITSCH (1977) e GONÇALVES (1983), em termos de estabelecimento e cultura de brotos. As taxas de multiplicação conseguidas variaram de acordo com o meio de cultura empregado, com a espécie utilizada, com o estado fisiológico do explante e com as condições ambientais de cultivo. Diferentes meios de cultura, tais como os meios de MURASHIGE & SKOOG (1962); DE FOSSARD (1976) e "wood plant medium", proposto por SMITH & MCCOWN (1983), e suas modificações foram utilizados na cultura de brotos de Eucalyptus. Na maioria das vezes, a indução da multiplicação de brotações é feita em meio solidificado com ágar, embora GUPTA et alii (1980) comprovam que determinadas espécies requerem meio líquido para estimular a

proliferação.

As brotações oriundas desta técnica podem ser removidas do explante original e inoculadas num novo meio de cultura, para continuar sua proliferação, ou, num meio contendo auxinas, geralmente ácido indolbutírico, para enraizar e formar uma planta completa. Um grande número de plantas podem ser produzidas a partir de um único meristema, por ano. ABBOTT (1978) fornece uma idéia deste número ao calcular, com uma taxa de multiplicação de 10 vezes/mês, por exemplo, o número de 10^{12} novas plantas no final de 1 ano de cultivo "in vitro".

2.7. Cultura de embriões

Os embriões possuem um excepcional potencial morfo genético. Algumas plantas só são conseguidas a partir da cultura de embriões, visto que, em certos casos, a germinação da semente é inibida por tecidos maternos. Neste caso, os embriões devem ser excisados e cultivados adequadamente para a regeneração da planta.

O estágio de desenvolvimento dos embriões, por ocasião de sua excisão, deve ser levado em conta. Para muitas espécies, estes estádios ainda não são bem conhecidos como ocorre em Eucalyptus, embora MURALIDHARAN & MASCARENHAS (1987) tiveram sucesso ao regenerar plantas através da cultura de embrião zigótico de E. citriodora, assim como KOUIDER et alii(1984), cultivan-

do embriões imaturos de Populus deltoides.

Outras espécies de florestais têm tido seus embriões como explantes iniciais para a propagação "in vitro". KROGSTRUP (1986) usou embriões de sementes maduras de Picea abies, conseguindo calos embriogênicos. Plântulas foram regeneradas através de tecidos pertencentes ao eixo embriônico de Castanea sativa, quando SAN JOSE & VIEITZ (1984) os cultivaram em meio rico de benzilaminopurina. Um trabalho muito parecido foi feito por STRULLU et alii (1986) com esta mesma espécie e HEILE-SUDHOLT et al (1986) empregaram, igualmente, eixo embriônico para o estabelecimento de Juglans nigra em cultivo "in vitro".

Alguns autores sustentam a hipótese, como VON ARNOLD & ERIKSSON (1978), que após a indução do desenvolvimento dos embriões feita em meio contendo citocinina, estes devem ser removidos para um novo meio de cultura desprovido de hormônios. Em Picea abies, estes autores mostraram a formação de gemas adventícias anatomicamente diferentes provenientes de embriões cultivados por longo tempo em meio acrescido de 6(p,p-dimetilalilamino) purina, uma citocinina.

2.8. Meios de cultura

Muitos tecidos vegetais podem ser cultivados em meios de cultura definidos, nos quais, um complexo de substâncias está envolvido no crescimento e no desenvolvimento deste te

cido. Este complexo consiste de água; compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos exigidos em pequenas quantidades, açúcar, reguladores do crescimento (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno), misturas indefinidas de substâncias, tais como, extrato de levedura, água de coco, extratos de plantas, caseína hidrolisada, peptonas e etc.; sais inorgânicos representados por macro e microelementos. Através do Quadro 1, pode-se apreciar de maneira global os requerimentos nutricionais, hormonais e físicos do meio, em cultura de tecidos e órgãos vegetais.

O ágar ou outro agente geleificante pode ser adicionado ao meio de cultivo para solidificá-lo, visto que certos explantes só se desenvolvem em meio sólido. Algumas plantas ou tecidos não necessitam deste requerimento e podem ser cultivados em meio líquido, com ou sem o emprego de pontes de papel de filtro, usadas com a finalidade de evitar que o explante fique submerso e asfisiado no meio. A concentração usual de ágar é 0,6 a 0,8%, mas dependendo do pH, esta concentração pode variar. Assim, para PIERIK (1987) se uma baixa concentração de ágar for escolhida (por exemplo 0,4%) deve-se regular o pH do meio para níveis mais baixos. Altas concentrações de ágar tornam o meio muito solidificado o que poderá trazer prejuízos no processo de inoculação do explante e poderá, eventualmente, comprometer o desenvolvimento deste.

Estudos foram realizados por MURASHIGE (1974 e 1977) sobre a influência da densidade do meio sobre a cultura "in vitro". Experimentos têm mostrado diferentes efeitos da presença

QUADRO 1 - Requerimentos nutricionais e hormonais em cultura de tecidos, órgãos e células vegetais. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Água			
Substâncias orgânicas:	Macro	Micro	pH
	elementos		
- açúcar	N	Fe	
- aminoácidos	P	Zn	
- vitaminas	K	B	
- reguladores de crescimento: auxinas	Ca	Mn	
citocininas	Mg	Cu	
giberelinas	S	Co	
ác.abscísico		Ni	
etileno		Al	
		Mo	
		I	
Complexos orgânicos: - extrato de leveduras			
- água de coco			
- extrato de plantas			
- caseína hidrolisada			
- peptona e triptona			

ou ausência de ágar ao meio, em termos de organogênese. Neste sentido, podem ser citados os trabalhos de WHITE (1939); SKOOG (1944); AMMIRATO & STEWARD (1971); STEWARD & MAPES (1971), STEWARD (1958); TEIXEIRA (1981) e BORNMAN & VOGELMANN (1984).

No caso de regeneração de raízes, MURASHIGE (1972) reporta que para brotação de Asparagus deve-se optar pelo meio sólido em detrimento do meio líquido, menos interessante. DE FOS SARD et alii (1974) conseguiram bons resultados em Eucalyptus ao propagarem brotações em cultura de segmentos nodais, usando meio provido de ágar. De modo contrário, LANE (1979), trabalhando com Spirea bumalda e Prunus cistena, enraizou melhor as brotações em meio líquido. Um estudo interessante foi feito por PILLAI & HILDEBRANDT (1969), com cultura de calos de Pelargonium, onde observaram a rizogênese e total ausência de raízes capilares em meio solidificado. Quando usaram meio líquido, as raízes regeneradas eram perfeitamente normais apresentando grande capilaridade. Para PIERIK (1987) é difícil escolher qual o melhor meio a utilizar visto que esta escolha deve levar em consideração alguns fatores importantes como: a) o genótipo e a idade do material; b) o tipo de órgão ou tecido empregado e c) requerimentos nutricionais e hormonais do explante, determinados empiricamente para cada tecido e para cada estágio de desenvolvimento fisiológico deste.

Grande atenção deve ser dada à água, em termos de qualidade, não obstante ela corresponder a 95% da constituição do meio de cultivo. Alguns métodos, para garantir a melhor qualidade da água, foram apontados por PIERIK (1987) e consistem da pu-

rificação através de filtração, destilação e de-ionização.

Os sais inorgânicos, usualmente, macro e microelementos são adicionados ao meio em quantidades variadas e que definem por conseguinte, o meio em si. Vários são os meios de cultura empregados, dos quais podem ser citados os mais usuais em espécies florestais: MURASHIGE & SKOOG (1962); SCHENK & HILDEBRANDT (1972); DE FOSSARD (1976) e "woody plant medium" de SMITH & McCOWN (1983). Estes meios são efetivos quando suplementados com açúcares, geralmente sacarose a 2 ou 3%, segundo SNIR & EREZ (1981); SRISKANDARAJAH & MULLINS (1981); WERNER & BOE (1980), TRAVERS et alii (1985) e MURASHIGE & SKOOG (1962), muito embora PIERIK (1987) aponte outros açúcares como fonte de energia e de carbono, principalmente.

Experimentos "in vitro" têm mostrado que não só a concentração como, também, os tipos de sais empregados são significativos para a proliferação de brotos e para o enraizamento. O meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) é o mais completo e, por isso, o mais utilizado para a organogênese "in vitro". A concentração dos seus sais pode ser reduzida para 1/2, 1/3 ou 1/5 de acordo com a susceptibilidade à salinidade do genótipo considerado ou com a necessidade de regenerar ou enraizar brotações. LANE (1978 e 1979) afirma que tais concentrações são mais interessantes para o enraizamento, de um modo geral. Entretanto, algumas vezes nutrientes salinos são necessitados em concentrações mais elevadas para que ocorra rizogênese. PIERIK & STEEGMANS (1975) mostraram que os macroelementos não exercem influência sobre o enraizamento de micro-estacas de Rhododendron.

Os hormônios são substâncias, por definição, naturalmente sintetizadas pelas plantas em quantidades muito pequenas. Em cultura de tecidos "in vitro" seu uso é extremamente necessário, salvo em casos que o próprio explante é capaz de sintetizá-los para seu desenvolvimento. Os principais hormônios empregados são as citocininas e as auxinas. PIERIK (1987) destaca quatro tipos principais de cultura, de acordo com a sua necessidade hormonal. São eles:

- a) culturas que não requerem nem citocininas nem auxinas;
- b) culturas que requerem apenas citocininas;
- c) culturas que requerem apenas auxinas e
- d) culturas que requerem não só citocininas como, também, auxinas e em doses balanceadas.

As auxinas mais comumente usadas são: ácido indolacético (AIA), geralmente nas concentrações variando de 0,01 a 10 mg/l; ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) dentro da faixa correspondente a 0,001 a 10 mg/l e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) que deve ser empregado com certa parcimônia pois é responsável por mutações genéticas e inibição da fotossíntese em muitos casos. A alongação celular, o entumescimento dos tecidos, a formação de calos e a formação de raízes adventícias são os principais efeitos causados pelas auxinas. Com referência à ação sobre o enraizamento, o tratamento de brotos excisados num meio de cultura contendo altas concentrações de ácido indolbutírico ou ácido naftalenoacético deve ser seguido, pa-

ra um melhor desenvolvimento das raízes, segundo BORNMAN (1983), da transferência destes brotos para um meio isento de hormônios. A combinação de auxinas com outros compostos é citada na literatura como benéfica ao enraizamento de muitas espécies florestais. Neste contexto estão os resultados conseguidos por BORNMAN & JANSSON (1980) em Pinus sylvestris ao enriquecer o meio com coumarina; DEMBNY et alii (1988) em Betula pendula ao adicionar fusiocoxina ao meio, CALDAS & KITAHARA (1975) em calos de eucalipto cultivados na presença de água de coco.

As citocininas, por sua vez, são incorporadas ao meio de cultura em quantidades que variam de 0,1 a 30 mg/l e são responsáveis pela indução, crescimento e desenvolvimento de brotações, SACHS & THIMANN (1964). As culturas que mais empregam citocininas são as de calos e de meristema, geralmente na forma de cinetina, zeatina e benzilaminopurina. HUSSEY (1977) atesta que as citocininas são responsáveis, também, pela prevenção da dormência que muitas culturas tendem a apresentar após vários ciclos de cultivo "in vitro". A ação de citocininas pode melhor ser apreciada nos trabalhos de SAN JOSÉ & VIEIRA (1984) e STRULLU et alii (1986) que utilizaram Castanea sativa; HEILE-SUDHOLT et alii (1986) com Juglans nigra; HAKMAN & VON ARNOLD (1983) que empregaram Pinus contorta; BASSI (1984) em Prunus sp; PASQUAL & ANDO (1989) com Citrus sinensis; SMITH & McCOWN (1983) utilizando Betula e Rhododendron; PAILEY & D'SOUZA (1986) com Lagerstroemia flos-reginae; LIU et alii (1983) em Malus domestica; BERGMAN et alii (1985) com Salix, etc.

Outro fator importante a considerar, na confecção do

meio de cultura, é o pH. É um fator extensivamente estudado devido seus efeitos na produção de brotos e enraizamentos dos mesmos. A prática usual, descrita por MURASHIGE (1974) é fazer com que o pH assuma valores entre 5,0 e 6,0 antes da adição do ágar.

BONNER (1934), ao estudar o comportamento "in vitro" de Avena, percebeu que a acidificação do meio mostrava efeitos muito similares aos das auxinas quanto à indução da formação de raízes e generalizou-se que espécies calcifilas tem sua capacidade de enraizamento aumentada quando em presença de meio acidificado, KHOSH-KHUI & TAFAZOLI (1979). Trabalhos importantes foram feitos por PIERIK & STEEGMANS (1975) reportando a influência do pH sobre Rhododendron e outras espécies estabelecidas "in vitro"; e por AUDUS (1948); WHITE (1932), TORREY (1954) e BÜRSTROM (1953), exclusivamente, quanto à importância do pH sobre o desenvolvimento do sistema radicular e sua alongação.

Os meios de cultura devem ser esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 5 a 15 minutos sob pressão de 1,5 atm ou filtrados através de membranas especiais, com poros de 0-22 a 0-45 um de diâmetro, capazes de reter os organismos contaminantes.

2.9. Condições para o desenvolvimento da cultura

Em testes experimentais as culturas podem ser desenvolvidas em tubos de ensaio ou pequenos frascos. Segundo ABBOTT (1978), todas as culturas, de um modo geral, necessitam de luz. A

produção de calos ou de células em suspensão, para certas espécies cultivadas "in vitro", só podem ser conseguidas no escuro. Pouco se sabe sobre o requerimento de luz, mas as culturas podem ser desenvolvidas suficientemente bem sob luz branca fria produzida por lâmpadas fluorescentes ou tipo GRO-LUX. Tais lâmpadas fornecem a intensidade luminosa de 2.000 a 3.000 lux. Quanto ao comprimento do dia ou fotoperíodo mais usado está por volta de 18 h de luz, ABBOTT (1978). Um comprimento de dia menor, ou seja, 16 h de luz foi usado com sucesso por RUTLEDGE & DOUGLAS (1988) quando micropropagaram vários clones comerciais de Populus "in vitro". VON ARNOLD & ERIKSSON (1985) usaram também este fotoperíodo ao estudarem os estádios iniciais da formação de gemas adventícias em embriões cultivados de Picea abies. Diferentes comprimentos de dia foram testados por VON ARNOLD (1982) em Picea abies, correspondendo a 16, 20 e 24 h de luz sendo altamente benéficas 20 e 24 h de luz para a formação de gemas adventícias a 20°C. A temperatura do local onde as culturas são desenvolvidas é outro fator de importância. Alguns tecidos ou genótipos necessitam de temperaturas extremas como 15°C ou 30°C, mas, a grande maioria dos cultivos "in vitro" são feitos satisfatoriamente numa faixa de temperatura variando de 20° a 25°C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, Lavras-MG.

Foram feitos 7 testes experimentais neste trabalho, sendo 4 de micropropagação e 3 de enraizamento de brotações micropropagadas.

Os explantes utilizados nos diferentes experimentos de micropropagação constituíram-se de segmentos nodais e/ou apicais obtidos de plântulas provenientes da germinação de sementes "in vitro". A Figura 6 mostra uma plântula "in vitro" de K. coriacea, oriunda de semente, doadora de explantes. As sementes foram coletadas no município de Campo do Meio-MG, em abril/86 e armazenadas em câmara frigorífica a 10°C e 50% de UR, até sua inoculação em junho/87.

Após a retirada das sementes da câmara frigorífica estas passaram pelas seguintes etapas:

- a) lavagem em água corrente por 15 minutos;

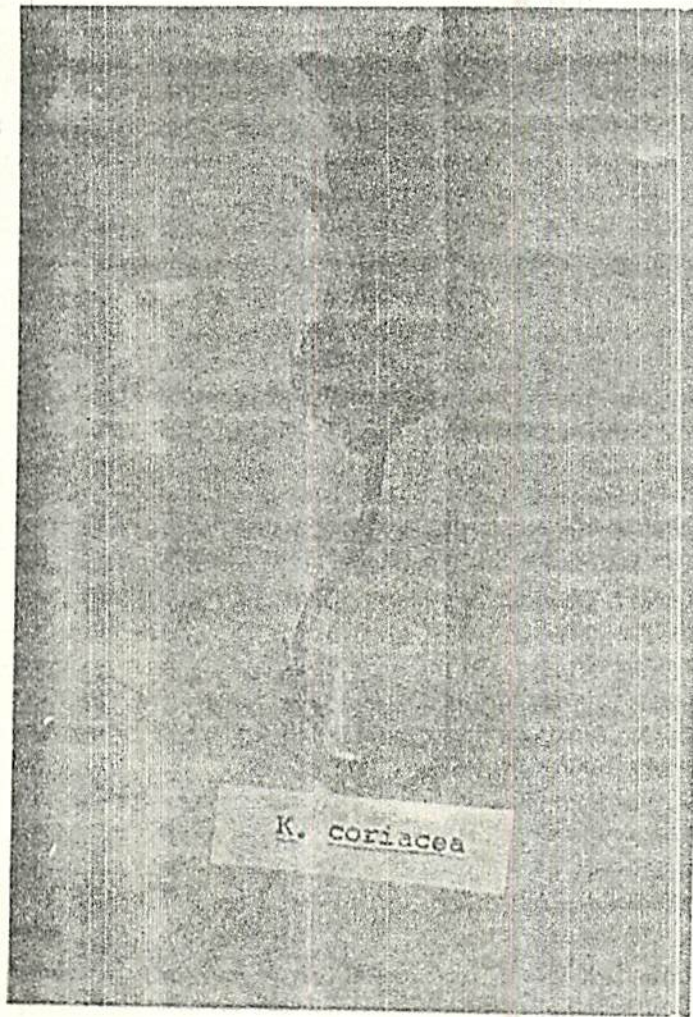


FIGURA 6 - Plântula de Kielmeyera coriacea Martius proveniente da germinação de sementes "in vitro", aos 60 dias. ESAL, Lavras/MG, 1990.

b) pré-germinação no escuro em solução aquosa com 20 mg de ácido giberélico/100 ml durante 12 hs;

c) retirada da casca;

d) nova lavagem em água corrente por 15 minutos;

e) esterilização, em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% (30 segundos de imersão) e solução 0,2% de hipoclorito de sódio com 2 gotas de Tween-20 por 100 ml de água destilada (20 minutos de imersão);

f) lavagem com água destilada e autoclavada, abundantemente, por 5 vezes e

g) inoculação em meio de cultura apropriado, que pode ser apreciado no Quadro 2. O meio utilizado foi o de MURASHIGE & SKOOG (1962) onde se empregou apenas os sais e cujas concentrações foram reduzidas à metade. Este meio foi suplementado com ágar, ácido giberélico (5 mg/l) e açúcar.

Os experimentos de enraizamento empregaram brotações produzidas por segmentos nodais culturados em meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962), exposto no Quadro 2, suplementado com 0,5 mg/l de benzilaminopurina.

Todos os testes experimentais utilizaram tubos de ensaio 2,5 x 15cm contendo 10 ml de meio de cultura e vedados com tampa plástica. O meio de cultura foi variável para cada teste.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob condições ambientais controladas, tais como, fotoperíodo de 16 h luz/8 h de escuro e temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ (exceto para a

QUADRO 2 - Composição básica do meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (1962) utilizado nos testes experimentais de micropropagação e de enraizamento de brotações "in vitro" de K. coriacea. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Compostos (fórmula molecular)	Concentração final do meio de cultura (mg/l)
NH_4NO_3	1650,000
KNO_3	1900,000
H_3BO_3	6,200
KH_2PO_4	170,000
KI	0,830
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
CaCl_2	250,841
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,000
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Na_2EDTA	37,250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,850
Mio inositol	100,000
Tiamina HCl	0,500
Piridoxina HCl	0,500
Ácido nicotínico	0,500
Glicina	2,000
Sacarose	30,000 g/l
Ágar	10 g/l
pH	5,7

quela em que as variáveis testadas foram fotoperíodo e temperatura) e intensidade luminosa de 3.000 lux fornecida por lâmpadas frias do tipo GRO-LUX.

O material empregado nos experimentos como vidrarias, pinças e bisturis foram cuidadosamente lavados com sabão líquido neutro comercial e esterilizados, posteriormente, em estufa tipo hospitalar. Já os meios de cultura foram autoclavados, logo após o seu preparo, a 120°C e $1,3 \text{ kg/cm}^2$ durante 15 a 20 minutos.

Todos os dados coletados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 1 a 5% para o teste F. As médias foram comparadas aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 5%. Para efeitos de análise estatística, os dados foram transformados para $\text{arc. sen } \sqrt{x + 0,5}$. As características avaliadas nos testes experimentais de micropropagação foram: a) número total médio de brotações produzidas e b) porcentagem média de brotações com mais de 1 cm. Já para os testes experimentais de enraizamento, as características avaliadas foram: a) número médio de raízes primárias; b) tamanho médio de raízes primárias (cm) e c) número médio de raízes secundárias. O delineamento estatístico adotado em todos os testes experimentais foi o inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento, sendo 3 tubos de ensaio por repetição. Todos os experimentos foram avaliados aos 45 dias de cultura.

3.1. Testes experimentais para micropropagação

3.1.1. Uso de diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético

Segmentos nodais de plântulas doadoras foram utilizados neste experimento como explantes. O meio de cultura utilizado foi o "MS" (Quadro 2) sem nenhuma modificação de componentes. Foram suplementadas diversas concentrações de benzilaminopurina (0,0-0,1-1,0 e 5,0 mg/l) e ácido naftalenoacético (0,0-0,1 e 1,0 mg/l) ao meio, num esquema fatorial 4 x 3, totalizando 12 tratamentos e 36 parcelas compostas.

3.1.2. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina

Segmentos nodais e apicais, usados como explantes, foram cultivados em diferentes concentrações de benzilaminopurina (0,0-0,5-1,0-2,0-4,0 e 8,0 mg/l) adicionadas ao meio "MS" de cultura (Quadro 2). O esquema fatorial deste teste foi 2 x 6, totalizando 12 tratamentos e 36 parcelas compostas.

3.1.3. Efeitos do fotoperíodo e da temperatura

Os explantes constituíram-se de segmentos nodais inoculados em meio "MS" de cultura citado no Quadro 2, acrescido de 0,5 mg/l de benzilaminopurina. Foram testados 3 fotoperíodos diferentes, quais sejam, 16:8-12:12 e 8:16 (h luz:h escuro) e 4 temperaturas, ou sejam, 21^o-24^o-27^o e 30^oC, num esquema fatorial 3 x 4. Os tratamentos foram 12 e as parcelas compostas, 36.

3.1.4. Uso de diferentes concentrações dos sais e de sacarose no meio

Segmentos nodais das plântulas doadoras foram desenvolvidos no meio "MS" de cultura citado no Quadro 2, cujas concentrações dos sais inorgânicos foram modificadas para 1:1-1:2 e 1:3, assim como a concentração de sacarose, isto é, 15-30-45-60 e 75 g/l. Os demais componentes do meio permaneceram constantes. O meio de cultura foi, ainda, enriquecido de 0,5 mg/l de benzilaminopurina. Foram 15 tratamentos e 45 parcelas compostas num esquema fatorial 3 x 5.

3.2. Testes experimentais para enraizamento de brotações "in vitro"

3.2.1. Uso de brotações de diferentes tamanhos em concentrações variadas de ácido indolbutírico

Brotações micropropagadas de dois tamanhos diferentes, isto é, 2,0 e 4,0 cm foram colocadas para enraizar em meio "MS" (Quadro 2) sem modificações e suplementado com 0,0-1,0-2,0 e 4,0 mg/l de ácido indolbutírico. O esquema fatorial adotado foi 2 x 4 totalizando 8 tratamentos e 24 parcelas compostas.

3.2.2. Uso de diversas concentrações dos sais e de ágar no meio

As concentrações dos sais utilizadas neste teste foram 1:1-1:3 e 1:6 daquelas do meio "MS" presentes no Quadro 2. Os demais componentes do meio de cultura não tiveram suas concentrações modificadas exceto o ágar cujos níveis usados foram 0,0-3,0-6,0 e 9,0 g/l. Para o nível 0,0 g/l, isto é, na ausência de ágar, foi necessário usar um pequeno chumaço de algodão no fundo dos tubos de ensaio a fim de se evitar que as brotações ficassem submersas no meio líquido. Adicionou-se 4,0 mg/l de ácido indolbutírico ao meio. Foram 12 tratamentos e 36 parcelas compostas

num esquema fatorial 3 x 4.

3.2.3. Efeitos do pH e diversos níveis de ágar no meio

O pH do meio "MS" de cultura, presente no Quadro 2, foi ajustado para 5,1-5,4-5,7-6,0 e 6,3 e os níveis de ágar foram modificados para 0,0-3,0-6,0 e 9,0 g/l. O meio foi suplementado com 4,0 mg/l de ácido indolbutírico. Os demais componentes do meio de cultura permaneceram constantes. O esquema fatorial foi do tipo 5 x 4 com 20 tratamentos diferentes e um total de 60 parcelas compostas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Proliferação de brotações

4.1.1. Uso de diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético

Os reguladores de crescimento benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (NAA) parecem interagir no que diz respeito não só à produção total de brotações em Kielmeyera coriacea, bem como, à produção de brotações com mais de 1,0 cm. Esta interação entre os dois reguladores de crescimento fazem com que K. coriacea seja considerada como uma daquelas inúmeras plantas que, para uma maior proliferação de brotações, PIERIK (1987) trata como dependentes não só de citocininas como, também, de auxinas.

Além de PIERIK (1987), outros pesquisadores reforçam a hipótese de que a proliferação de brotos "in vitro" pode ser maximizada, como aconteceu com K. coriacea, com o emprego conjunto de dois ou mais grupos de reguladores do crescimento. A no-

gueira Juglans nigra somente prolifera bem em presença de BAP e de ácido indolbutírico (IBA), uma outra auxina empregada em vários trabalhos (HEILE-SUDHOLT et alii, 1986). Para Citrus sinensis, a maximização da produção de brotações também ocorreu quando BAP e NAA apareciam combinados no meio de cultivo (PASQUAL & ANDO, 1989). É interessante ressaltar que os níveis em que estes hormônios devem aparecer para proporcionar a maior quantidade de brotos emitidos, variam de acordo com o genótipo da planta considerada e que devem ser determinados, para cada caso, experimentalmente. Isto torna difícil estabelecer comparações mais estreitas entre os níveis de hormônios que levaram aos resultados obtidos com K. coriacea, com aqueles já determinados para as demais espécies citadas em literatura. De um modo geral, as concentrações das citocininas são sempre superiores às das auxinas, o que acaba por proporcionar uma maior taxa de multiplicação. Quando o contrário se verifica, isto é, quando as concentrações das citocininas são inferiores às das auxinas, é comum o surgimento de raízes. Em K. coriacea a associação de 0,1 mg BAP/l e 1,0 mg NAA/l, acondicionados ao meio de cultura, proporcionou a formação de raízes em 76% das repetições correspondentes ao referido tratamento (Figura 7).

A associação entre grupos de reguladores de crescimento, usados em níveis balanceados, já havia sido descrito por SKOOG & MILLER (1957) muito antes dos autores anteriormente citados. Para K. coriacea, a exemplo do que aconteceu com o aparecimento de raízes, a combinação de 5,0 mg BAP/l e 0,1 mg NAA/l, de um modo geral, foi capaz de proporcionar a maior emissão de bro-

tações, isto é, 6,3 brotações novas por explante inicial, em média (Quadro 3). Uma boa proliferação de brotos pode ser conseguida, ainda, com o emprego conjunto de 1,0 mg BAP/l e 1,0 mg NAA/l qual seja, 5,7 novas brotações em média. Algumas observações oportunas devem ser feitas quanto à qualidade destas novas brotações assim originadas. Consultando-se a Figura 7, percebe-se que embora numerosas, estas brotações são atrofiadas e pouco desenvolvidas. Suas folhas são aciculadas, pequenas e disformes, seus internódios extremamente curtos e raramente tais brotos chegam a atingir 1,0 cm de altura. Ao que tudo indica, estas observações coincidem com aquelas feitas por VON ARNOLD (1989) quando este salientou o fato de que, em determinadas situações, as citocininas deixam de ser benéficas e passam a ser malélicas ao desenvolvimento de materiais culturados "in vitro". A espécie K. coriacea parece mostrar-se sensível à determinadas concentrações de BAP. Assim, 5,0 mg BAP/l, apesar de terem sido interessantes para a produção de novas brotações, foram deletéricos para a qualidade destas mesmas brotações.

A ausência total de BAP, como aparece no Quadro 3, no meio de cultura fez com que os explantes inoculados não produzissem brotos em abundância. Na grande maioria das parcelas em que BAP não aparecia, apenas uma nova brotação era orifinada, fruto, talvez, de pequenas quantidades de citocininas endógenas do material inoculado. Aqui está um fato que vem reforçar ainda mais a idéia de que as citocininas são essenciais ao processo de proliferação de brotos e coincidem com os vários resultados encontrados na literatura. Dentre as espécies florestais que poderiam

FIGURA 7 = Segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius inoculados em meio "MS" suplementado com BAP e NAA em mg/l, aos 45 dias. ESAF, Lavras/Mg, 1990.

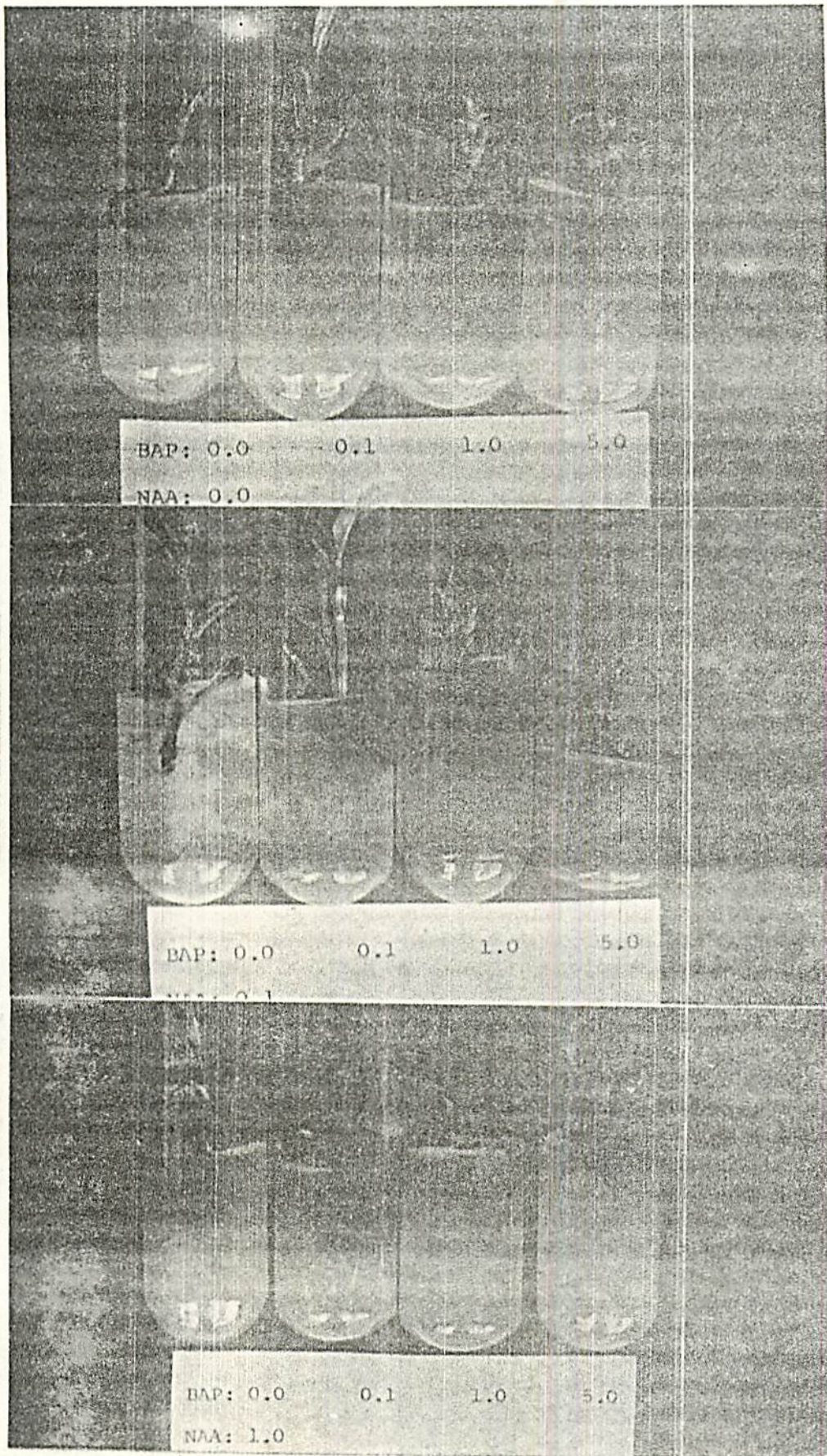


FIGURA 7

QUADRO 3 - Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" suplementado com BAP e NAA. ESAL, Lavras-MG, 1990.

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)		
	0,0	0,1	1,0
0,0	1,0 Ab	1,0 Ad	1,0 Ac
0,1	4,5 Aa	3,0 Bc	2,3 Bb
1,0	4,3 Ba	4,7 ABb	5,7 Aa
5,0	3,7 Ba	6,3 Aa	2,7 Cb

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de NAA e minúscula, para níveis de BAP) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

ser citadas, a título comparativo, cujo desenvolvimento "in vitro" foi altamente danificado pela ausência de citocininas no meio onde eram cultivadas, são: Picea abies e Pinus sylvestris (VOGELMANN et alii, 1984), Pinus radiata (AITKEN-CHRISTIE et alii, 1988); (BORNMAN, 1987) e (VON ARNOLD & HACKMAN, 1988), Sequoia sempervirens (BALL, 1987); Populus sp (AHUJA, 1987); Eucalyptus globulus (OKA et alii, 1982), Picea abies (BORNMAN & JANSSON, 1980) e muitíssimas outras. Nestas mesmas parcelas, isto é, onde BAP assumia concentrações nulas, os níveis de auxinas foram promotores, apenas, de um leve crescimento da nova brotação, como pode ser visto na Figura 7.

O Quadro 3 mostra, também, que ao seu utilizar 0,1 mg BAP/l, concentrações mais baixas de NAA devem ser preferidas. Como se pode ver, para este nível de BAP o número de brotações produzidas tende a aumentar na medida em que as concentrações da auxina decrescem e chegam a atingir valores máximos quando NAA está ausente no meio, ou seja, 4,5 novas brotações por explante inicial, em média. Embora este valor seja algo inferior àquele 6,3 brotações produzidas com 5,0 mg BAP/l + 0,1 NAA mg/l, ou mesmo 5,7 brotações com o uso de 1,0 mg BAP e NAA/l, a qualidade dos brotos é nitidamente superior, como prova a Figura 7.

O Quadro 4 mostra que a ausência de BAP no meio de cultivo, independente das concentrações de NAA utilizadas, propiciou o melhor resultado quanto à qualidade dos brotos e tamanho dos mesmos (100%), muito embora, como já foi discutido em parágrafo anterior, tenha concorrido para a pior taxa de multiplicação (1,0 brotos em média). Uma excelente produção de brotos vigorosos foi conseguida com a administração de 0,1 mg BAP/l ao meio, principalmente quando a concentração da auxina foi nula. Em média, 89,3% das 4,5 novas brotações originadas por explante inicial eram robustas, normais, de boa qualidade e com altura superior a 1,0 cm, estatisticamente, o melhor resultado para este nível de BAP. Quando NAA assumiu valores 0,1 mg e 1,0 mg/l, a média percentual para brotações com tais características mostrou decréscimos acentuados, ou seja, 77,7% das 3,0 novas brotações e 36,1% das 2,3 novas brotações, respectivamente. As demais combinações entre BAP e NAA testadas apresentaram resultados muito aquém dos acima discutidos. Os 5,0 mg BAP + 0,1 mg NAA/l e 1,0 mg

QUADRO 4 - Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius em meio "MS" suplementado com BAP e NAA. ESAL, Lavras-MG, 1990.

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)		
	0,0	0,1	1,0
0,0	100 % Aa	100 Aa	100 Aa
0,1	89,3%	77,7% Bb	36,1% Cb
1,0	11,8% Ac	10,8% Ac	8,9% Ab
5,0	13,9% Ac	11,9% Ac	5,5% Bc

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de NAA e minúscula, para níveis de BAP não diferem, estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

NAA/1 que tinham proporcionado ótimas taxas de multiplicação (6,3 e 5,7 respectivamente) tiveram péssima produção de rebentos com mais de 1,0 cm, beirando a faixa dos 10% (11,9% e 8,9% mais precisamente).

4.1.2. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina

Ao se estudar o comportamento de explantes diferentes de K. coriacea, ou sejam, segmentos nodais e segmentos apicais em presença de BAP, observou-se interação entre o tipo de explante e BAP para número total médio de brotações e porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm. A Figura 8 possibilita uma visão global sobre os resultados conseguidos neste teste experimental.

Os segmentos nodais, no geral, apresentaram melhores valores quanto à produção total de brotações, principalmente. Destacaram-se as concentrações 0,0-0,5-1,0-2,0 mg/l, embora algumas delas tenham concorrido para a morte do explante, e, a formação de brotações anormais. K. coriacea é bastante sensível a níveis mais elevados de BAP, pois, 4,0 e 8,0 mg/l (e, até mesmo 2,0 mg/l) não foram efetivos para o crescimento e desenvolvimento dos explantes (Quadro 5) e Figura 8. Estes resultados reforçam a afirmação de VON ARNOLD (1989) sobre a maleficidade de BAP em determinadas situações. O tempo de exposição dos explantes aos vários níveis de BAP empregados neste experimento foi de 45 dias e, segundo as hipóteses de VOGUELMANN et alii (1984) que sugerem uma absorção do hormônio diretamente proporcional à sua concentração no meio, durante todo o período de cultivo, pode-se supor que os segmentos de K. coriacea cultivados em níveis mais elevados de BAP absorvessem maiores quantidades deste. Talvez fosse recomendado, como VON ARNOLD (1989) e VON ARNOLD & GRÖNROOS (1986) sugeriram que o tempo de exposição do material vegetativo às altas concentrações de BAP fosse reduzido, se constituindo isso num bom objeto de estudo para experimentos e estudos futuros.

FIGURA 8 - Segmentos apicais (SA) e segmentos nodais (SN) de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius inoculados em meio "MS" suplementado com BAP em mg/l. ESAL, Lavras/MG, 1990.

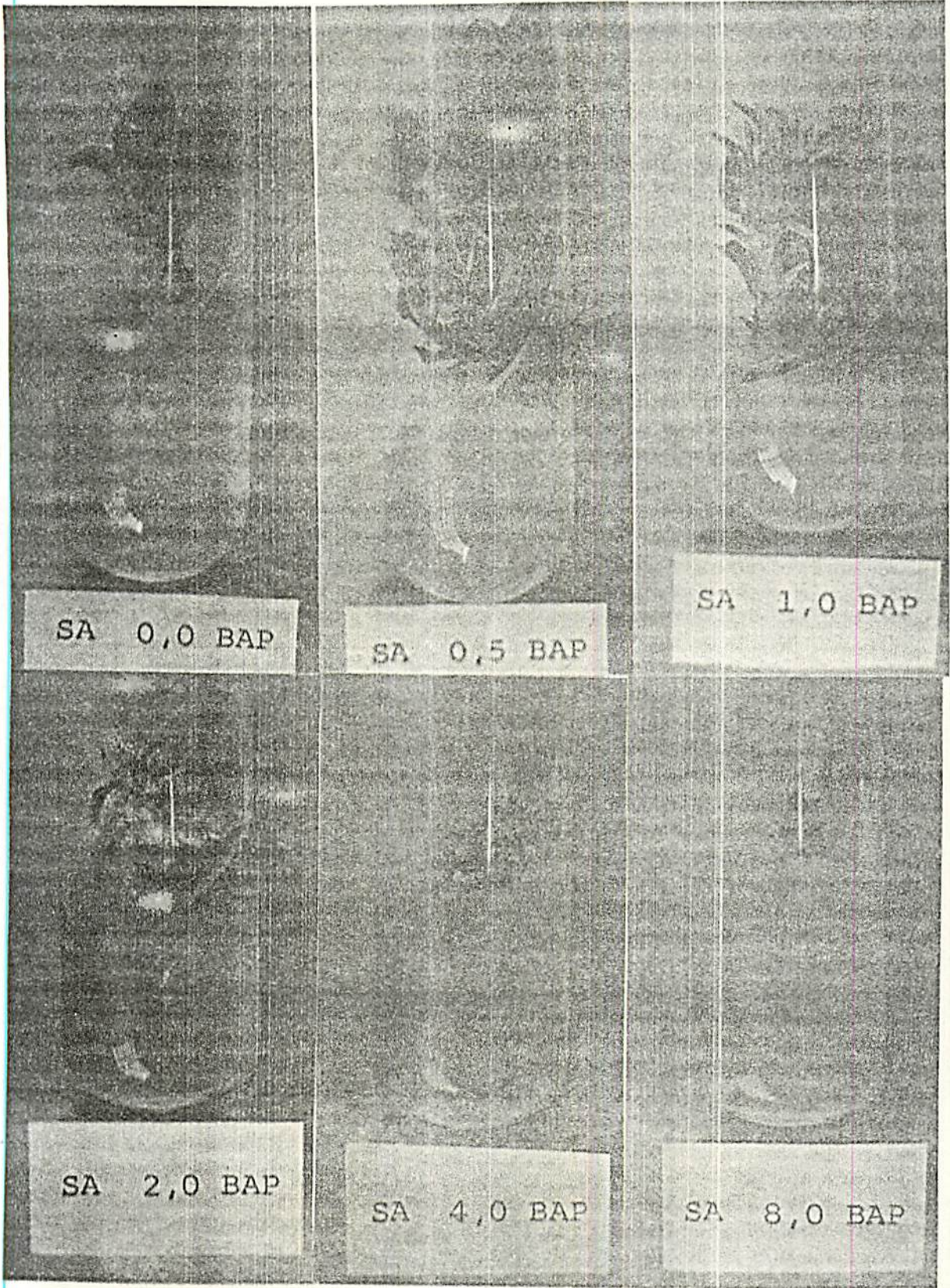


FIGURA 8

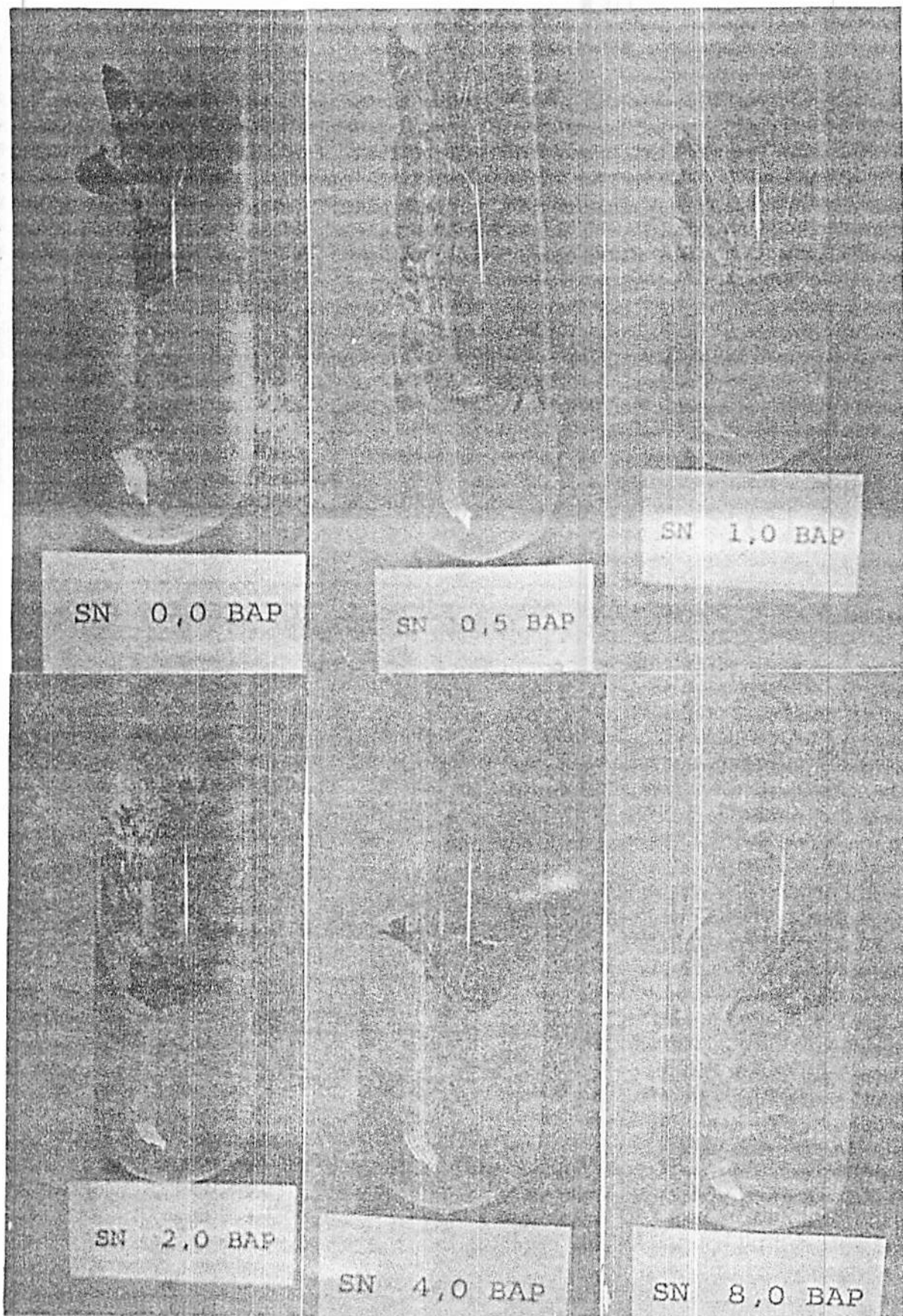


FIGURA 8 - Continuação

QUADRO 5 - Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais e apicais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" suplementado com BAP. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Explante	BAP (mg/l)					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Nodal	2,0 Ca	7,3 Aa	5,3 ABa	4,3 Bba	1,0 Db	1,2 Dba
Apical	1,0 Db	4,3 Ab	3,0 Cb	3,6 Bab	3,4 BCa	1,0 Dab

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de BAP e minúscula, para explante) não diferem, estatisticamente, pelo teste Tukey 5%.

Novamente, a ausência de BAP no meio de cultura proporcionou pouca ou nenhuma emissão de rebentos e, quando esta emissão ocorreu, foi, provavelmente, devido à citocininas inerentes ao próprio explante. Este resultado confirma o do experimento anterior, embora, devido à ausência de NAA que, como todas as auxinas, é responsável por alongamento celular, as brotações emitidas se mostraram menos desenvolvidas do que no outro experimento onde NAA estava presente. A melhor proliferação de brotos, do ponto de vista estatístico, foi conseguida com o uso de 0,5 mg BAP/l, isto é, 7,3 rebentos por segmento nodal e 4,3 por segmento apical, em média. Pode-se notar uma superioridade dos segmentos nodais sobre os segmentos apicais quanto à proliferação de brotos para este nível de citocinina usado (Quadro 5 e Figura 8).

Uma possível explicação para este acontecimento surge na medida em que os segmentos apicais tendem a se comportar de modo semelhante ao que aconteceria se estivessem em condições naturais, ainda na árvore, obedecendo a dominância da gema apical sobre as outras que, logo abaixo dela, se avizinham lateralmente. Esta dominância do ápice em ambas as condições, isto é, "in vivo" e "in vitro" dificulta que as gemas laterais comecem a se desenvolver produzindo novos ramos ou brotos. Em condições "in vitro", devido à um melhor controle sobre os níveis de citocininas através de seu suprimento exógeno, a quebra da dominância torna-se mais fácil e a emissão de novos brotos por outras gemas, também, fica facilitada. Mas, esta emissão de novos rebentos em segmentos apicais é nitidamente inferior àquela emissão originada em segmentos nodais, pois, estes últimos, não se encontram sob a referida dominância do ápice. A mesma explicação pode ser reforçada através do fato de que, sem o emprego de BAP (BAP em nível zero) os segmentos nodais mostraram-se mais aptos à proliferação de novos brotos do que os segmentos apicais, como pode ser comprovado observando-se o Quadro 5, isto é, 2,0 novos rebentos contra 1,0 em média. Os demais níveis de BAP testados apresentaram, para os segmentos nodais, o seguinte resultado: 1,0 mg/l, uma tendência ao melhor resultado alcançado por 0,5 mg/l, produzindo 5,3 brotos em média e os 2,0 mg/l, uma multiplicação de 4,3 brotos. Para os segmentos apicais, no geral, resultados estatisticamente inferiores, para estes níveis, foram conseguidos e 2,0 mg/l já se mostraram inadequados para a qualidade das brotações que podem ser observadas na Figura 10.

No geral, exceto para os níveis 4,0 e 8,0 mg BAP/l, a qualidade das novas brotações foi muito boa, destacando-se aquelas originadas com a ausência de BAP no meio de cultura.

À semelhança com resultados anteriores, os níveis mais baixos de BAP levaram predominantemente à formação de brotos com altura superior a 1,0 cm, muito embora, algumas concentrações não tenham levado às melhores taxas de multiplicação, como por exemplo, a ausência de BAP no meio. 93,3% e 91,6% das brotações produzidas por segmentos nodais e apicais, respectivamente, atingiram mais de 1,0 cm e foram conseguidas pela administração de 0,5 mg/l. Estes resultados foram estatisticamente iguais aos conseguidos na ausência de BAP (Quadro 6) para cada tipo de segmento. Em segmentos apicais o uso de 1,0 mg BAP/l foi benéfico para a formação de brotações com mais de 1,0 cm, resultado superior àquele conseguido com o mesmo nível administrado aos segmentos nodais, ou seja, 77,3% dos rebentos contra apenas 12,7%. Quanto à concentração de 2,0 mg BAP/l, apesar de ter proporcionado uma boa proliferação de brotações em segmentos apicais, estes mostraram brotos com altura muito inferior àquela apresentada pelos brotos oriundos dos segmentos nodais. Assim, 4,5% das brotações tinham altura superior a 1,0 cm em segmentos apicais e 16,0% de brotos mostraram esta característica em segmentos nodais.

QUADRO 6 - Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais e apicais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" suplementado com BAP. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Explante	BAP (mg/l)					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Nodal	100% Aa	93,3% Aa	12,7% Bb	16,0% Ba	0,0% Ca	0,0% Ca
Apical	100% Aa	91,6% Ab	77,3% Ba	4,5% CDb	0,0% Da	0,0% Da

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de BAP e minúscula, para explante) não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey 5%.

4.1.3. Efeitos do fotoperíodo e da temperatura

As condições ambientais para o desenvolvimento da cultura "in vitro" de K. coriacea traduzidas, neste trabalho, pela temperatura da sala de crescimento e pelo fotoperíodo não mostraram interação para a produção total de brotações, muito embora, esta tenha ocorrido para a porcentagem de brotos que atingiram uma altura superior a 1,0 cm. Somente a temperatura apresentou efeito para a emissão de brotos em K. coriacea. Temperaturas mais elevadas como 27° e 30° foram benéficas ao desenvolvimento dos explantes fazendo com que estes produzissem as maiores taxas

de proliferação de rebentos, quais seja, 4,4 e 5,2 por explante inicial, consideradas, sob o ponto de vista estatístico, como não diferentes. Estas duas temperaturas parecem refletir uma condição ambiental natural facilmente encontrada nos locais onde K. coriacea ocorre espontaneamente (vide SADDI, 1982 e ALMEIDA, 1946) e mostraram-se, sob condições artificiais de cultivo, isto é, "in vitro", benéficas aos explantes. 24°C fizeram com que os segmentos nodais produzissem uma quantidade inferior de brotações, isto é, 3,1 novos brotos, em média e 21°C, apenas 2,0 brotações por explante inicial, determinando um mau desempenho (Quadro 7 e Figura 9). Este desempenho mostrou uma tendência de piorar ainda mais, à medida em que o tempo do cultivo "in vitro" se estendia chegando mesmo, em algumas parcelas como as que compunham o fotoperíodo 8/16, a causar necroses e morte total do explante.

O Quadro 8 traz os efeitos do fotoperíodo e da temperatura, em combinação, sobre a qualidade dos rebentos emitidos. 27° e 30°C produziram a mesma quantidade e a quase totalidade dos brotos com mais de 1,0 cm, estatisticamente, em condições de 16 h de luz. O mesmo se verificou para a duração do dia de 12 h e, para 8 h, uma significativa vantagem ocorreu com o emprego de 30°C. Nestas condições, apesar das brotações terem atingido alturas avantajadas, suas folhas tiveram pouca área foliar e apareceram em menor número. Isto fez com que a qualidade geral destes brotos ficasse inferior àquela conseguida nos outros tratamentos e, neste em particular, as brotações parecem ter crescido como resultado de um forte estiolamento provocado pelo déficit de luz

QUADRO 7 - Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" suplementado com 0,5 mg BAP/l sob temperaturas diferentes. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Temperatura			
21°	24°	27°	30°
2,0 C	3,1 B	4,4 A	5,2 A

OBS.: As médias seguidas da mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey 5%.

QUADRO 8 - Porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" suplementado com 0,5 mg BAP/l sob diferentes fotoperíodos e temperaturas. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Fotoperíodo luz esc.(h)	Temperatura			
	21°	24°	27°	30°
16/08	38,6% aC	73,8% aB	91,2% aA	96,1% aA
12/12	39,0% aC	70,7% aB	90,7% aA	91,9% abA
08/16	33,5% aC	59,7% bB	63,3% bB	94,5% aA

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para diferentes temperaturas e minúscula, para diferentes fotoperíodos não diferem, estatisticamente, entre si, pelo teste Tukey 5%.

FIGURA 9 - Segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius inoculados em meio "MS" acrescido de 0,5 mg BAP/l e cultivados em diferentes fotoperíodos e temperaturas. ESAL, Lavras-MG, 1990.

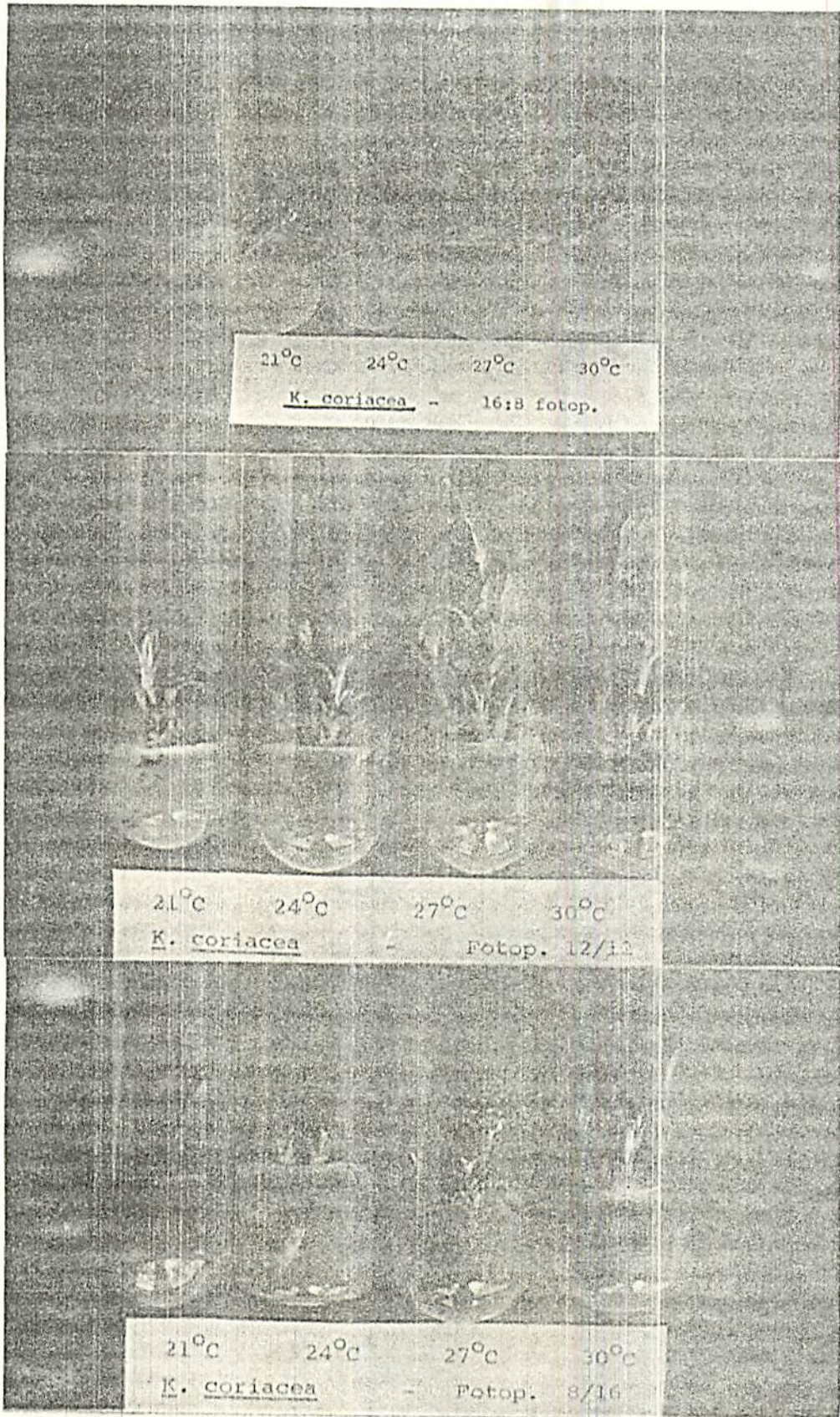


FIGURA 9

(16 h de escuro) (Figura 9). A temperatura de 24°C, de um modo geral, proporcionou uma produção de brotos com mais de 1,0 cm superior à produzida pela temperatura de 21°C em todos os fotoperíodos usados.

Pode-se notar, ainda, que, no geral, os fotoperíodos de 16 h de luz e 12 h proporcionaram os melhores valores percentuais para brotos com mais de 1,0 cm e boa qualidade e que, de modo semelhante, 27°C e 30°C concorreram para o mesmo fato. Estas condições de duração de luminosidade e de temperatura assemelham-se às aquelas encontradas na natureza e sugerem que as necessidades para um bom crescimento e desenvolvimento da cultura "in vitro" são bastante parecidas às condições com as quais se pode deparar "in vivo".

4.1.4. Uso de diferentes concentrações dos sais e de sacarose no meio

As concentrações de sacarose e dos sais, por sua vez, mostraram também, interação para a produção total de brotações. Já para a porcentagem de brotos com mais de 1,0 cm, apenas os fatores considerados separadamente apresentaram efeitos.

O meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) quando usado, com sua concentração normal de sais (1/1) ou com a metade da concentração destes aliadas à 30 ou 45 g/l de sacarose mostrou ser muito benéfico à proliferação de brotos de K. coriacea "in vi-

tro", apresentando resultados, em cada combinação, iguais estatisticamente como pode ser visto no Quadro 9 e Figura 10.

Estes dois níveis de sacarose, quais seja, 30 e 45 g parecem estar suprindo as necessidades dos explantes em termos de energia e carbono para o melhor funcionamento de seu metabolismo, principalmente, quando os sais do meio aparecem em concentrações não inferiores à metade daquela original proposta por MURASHIGE & SKOOG (1962).

O uso de 15 g de sacarose, independentemente dos níveis de sais empregados, possibilitou a produção média de 2,0 a 2,3 novos brotos por explante inicial, consideradas iguais estatisticamente. As concentrações mais elevadas do açúcar, quais sejam, 60 g e 75 g apresentaram desempenhos inferiores. Altos níveis de sacarose, além de produzirem as menores taxas de proliferação em K. coriacea, provocaram necrose nos explantes com posterior morte dos mesmos antes que houvesse qualquer tentativa de se desenvolverem e proliferarem. As altas concentrações de sacarose poderiam estar provocando um forte gradiente osmótico entre o explante inoculado e o meio que o contém fazendo com que o material vegetal desidratasse perdendo abundantemente água para o meio afim de estabelecer, com este, um equilíbrio osmótico (Figura 10).

De um modo geral, o uso de 1/3 das concentrações normais de sais no meio proporcionou resultados pouco interessantes e um menor número de novas brotações pode ser formado. O meio salino de MURASHIGE & SKOOG (1962) mostrou ser um bom meio para a

QUADRO 9 - Número total médio de brotações produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/l e em diferentes concentrações de sais e sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Sacarose (g)	SAIS		
	1/1	1/2	1/3
15	2,3 Ab	2,0 Ab	2,0 Aa
30	4,3 Aa	4,0 Aa	2,3 Ba
45	4,0 Aa	3,8 Aa	2,0 Ba
60	2,3 Ab	1,0 Bc	1,0 Bb
75	1,0 Ac	1,0 Ac	1,0 Ab

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para concentrações de sais e minúscula, para concentrações de sacarose), não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey 5%.

proliferação "in vitro" de K. coriacea, principalmente, quando seus sais aparecem nos níveis integrais ou reduzidos pela metade. Sabe-se que o meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) é um dos mais completos não só em qualidade de sais como, também, em quantidade que cada sal nele aparece. É por isso, considerado um meio rico e mais concentrado que os já conhecidos meios de SCHENK & HILDEBRANDT (1972); DE FOSSARD (1976) e "woody plant medium" de SMITH & McCOWN (1983) largamente utilizados na micropropagação de várias espécies florestais. Seria interessante que, em traba-

FIGURA 10 - Segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius inoculados em meio "MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/l e cultivados em diferentes concentrações de sais e de sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1990.

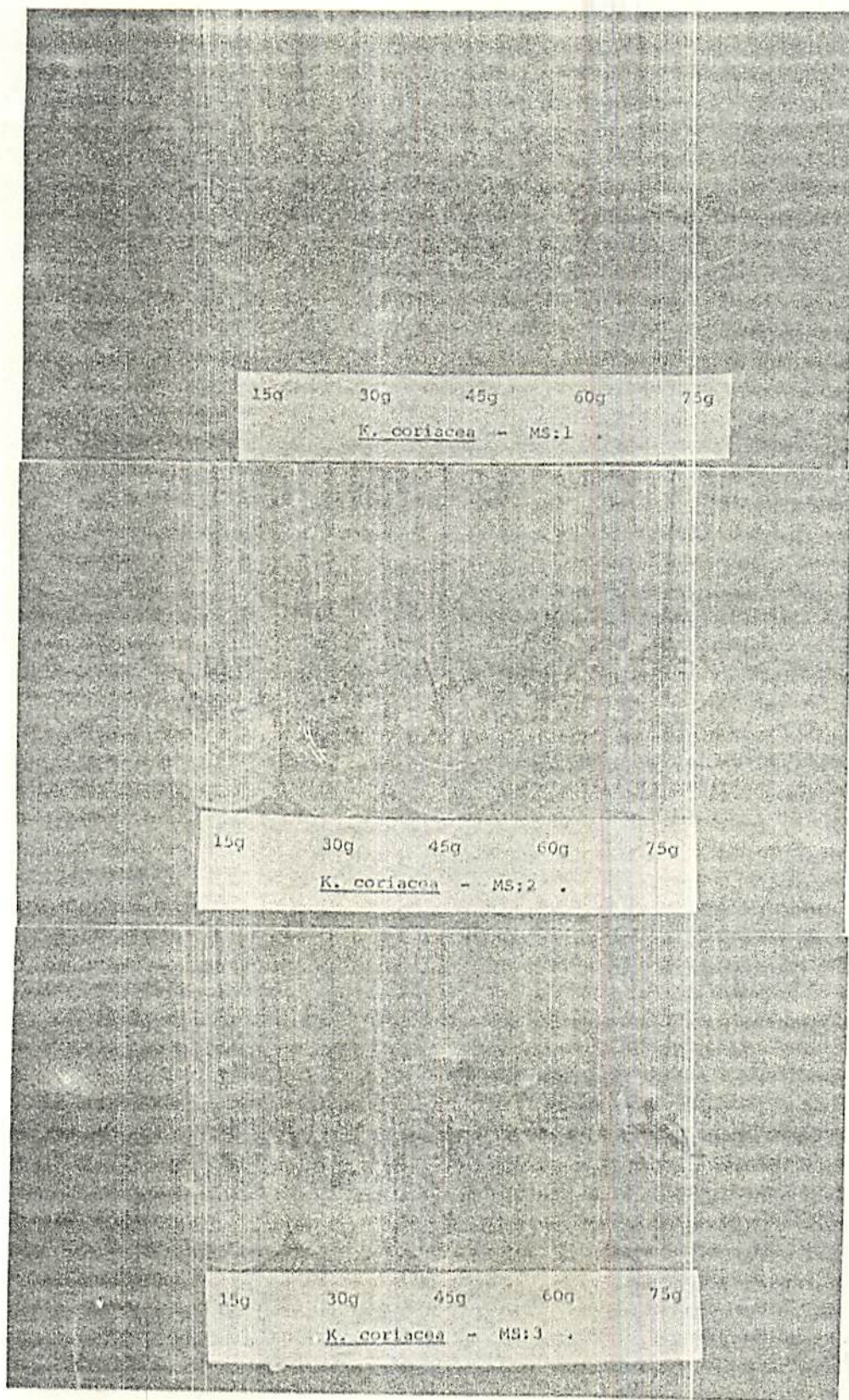


FIGURA 10

lhos futuros, estes outros três tipos de formulações fossem testadas no cultivo "in vitro" de K. coriacea e que se fizesse uma comparação entre eles e o de MURASHIGE & SKOOG (1962), utilizado no presente trabalho, para se determinar se K. coriacea exige ou não um meio mais rico em sais para proliferação.

A porcentagem de brotações com mais de 1,0 cm de altura variou, como já foi dito anteriormente, de acordo com os níveis de sacarose. A comparação das médias estão presentes nos Quadros 10 e 11, respectivamente.

As concentrações salinas do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) que mais se destacaram foram as correspondentes à 1/1 e 1/2. Estas concentrações, como pode ser visto no Quadro 10, levaram à resultados considerados iguais do ponto de vista estatístico, muito embora a diferença entre os percentuais 40,7 e 26,7 conseguidos nas concentrações de 1/1 e 1/2, respectivamente, tenha sido grande. A desuniformidade do material vegetal que compunha cada parcela composta deste experimento deve ter sido a principal responsável por este fato. Para se minimizar este problema, o emprego de um maior número de repetições por parcela composta ou até mesmo um maior número de parcelas devem ser considerados.

O mesmo comentário pode ser feito ao se comparar os resultados conseguidos entre as concentrações 1/2 e 1/3, iguais do ponto de vista estatístico (Quadro 10).

Em termos de exigências quanto ao nível de açúcar, neste caso representado pela sacarose, o Quadro 11 mostra que os

QUADRO 10 - Porcentagem média de brotações com mais de 1,0cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/l e em diferentes concentrações de sais. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Sais		
1/1	1/2	1/3
40,7% A	26,7% AB	19,2% B

OBS.: As médias seguidas da mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey 5%.

QUADRO 11 - Porcentagem média de brotações com mais de 1,0cm produzidas através da cultura "in vitro" de segmentos nodais de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius, em meio "MS" modificado, acrescido de 0,5 mg BAP/l e em diferentes concentrações de sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Sacarose (g)				
15	30	45	60	75
40,7% B	61,5% A	22,2% BC	3,7% C	2,4% C

OBS.: As médias seguidas da mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey 5%.

30 g/l usuais da formulação básica de MURASHIGE & SKOOG (1962) devem ser preferidas, pois, 61,5% dos novos rebentos tiveram altura superior à 1,0 cm. Os níveis de 15 g e 45 g/l levaram a percentuais idênticos, estatisticamente. Os 22,2% de brotos com mais de 1,0 cm produzidos ao se adicionar 45 g de sacarose/l ao meio foram, de modo semelhante, considerados iguais, em termos estatísticos aos percentuais obtidos com 60 g e 75 g/l, provavelmente, devido a desuniformidade do material vegetal das parcelas, também.

As concentrações mais elevadas, 60 g e 75 g aqui testados, foram deletéricas e fizeram com que uma baixíssima porcentagem de brotos, dos poucos emitidos, tivessem desenvolvimento suficiente para atingirem 1,0 cm de altura.

Aparentemente, 30 g de sacarose e as concentrações 1/1 e 1/2 dos sais do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) devem ser preferidas para um bom desenvolvimento das brotações.

4.2. Enraizamento de brotações "in vitro"

4.2.1. Uso de brotações de diferentes tamanhos em concentrações variadas de ácido indolbutírico

O ácido indolbutírico (IBA) interage com o tamanho inicial da brotação no que diz respeito à formação de raízes pri-

márias e ao comprimento das mesmas. Por outro lado, apenas IBA exerceu influência sobre a formação de raízes secundárias "in vitro".

Um maior número de raízes primárias em brotações de K. coriacea pode ser conseguido empregando-se IBA a 4,0 mg/l no meio de cultura, como vê-se no Quadro 12. Para este nível do hormônio, brotos com 4,0 cm de tamanho mostraram uma maior capacidade de emissão de raízes primárias do que com 2,0 cm pois, no primeiro caso, 6,3 raízes, em média, foram formadas enquanto que, no segundo caso, 4,7 raízes foram produzidas. O acréscimo de 2,0 mg IBA/l ao meio de cultura fez com que as brotações de maior tamanho emitissem, de modo semelhante, um número maior de raízes primárias (3,8 raízes por broto, em média) do que aquele emitido pelas brotações menores (3,3 em média). 4,0 raízes formaram-se em brotações com 4,0 cm de tamanho em presença de 1,0 mg IBA/l acrescentado ao meio de cultivo e apenas 1,7 raízes, em média, formaram-se nestas mesmas condições em brotos com 2,0 cm.

O enraizamento aconteceu até nas parcelas em que IBA estava ausente e o número de raízes primárias encontradas em brotações de 2,0 cm foi de 2,0, em média, e sobressaiu-se em relação ao número de raízes em brotos com 4,0 cm e que foi de 1,3. Níveis endógenos da auxina IBA parecem ter sido os responsáveis pela indução e o desenvolvimento destas raízes primárias, mas, o número em que foram emitidas por broto foi inferior, relativamente, aos que foram emitidos quando ocorreu um suprimento exógeno da auxina no meio de cultura. Independentemente do tamanho do explante, aumentos nas concentrações de IBA no meio proporcionaram

QUADRO 12 - Número médio de raízes primárias em brotações micro-propagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" suplementado com diversas concentrações de IBA. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Tamanho do explante (cm)	IBA (mg/l)			
	0,0	1,0	2,0	4,0
2,0	2,0 BCa	1,7 Cb	3,3 ABb	4,7 Ab
4,0	1,3 Cb	4,0 Ba	3,8 Ba	6,3 Aa

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para tamanho do explante e minúscula, para IBA não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

aumentos diretos e significativos no número de raízes primárias produzidas por broto.

Em brotações com 2,0 cm de tamanho os níveis de IBA na ordem de 2,0 mg e 4,0 mg/l apresentaram efeitos semelhantes produzindo o maior número de raízes primárias. Já em brotações de 4,0 cm, o melhor resultado foi conseguido com o emprego de 4,0 mg/l IBA.

Ainda no Quadro 12, pode-se perceber que no geral, as brotações com tamanho maior mostraram uma maior capacidade de formação de raízes primárias, quando comparados aos brotos de menor tamanho.

Resultados interessantes ocorreram ao se considerar,

agora, o tamanho das raízes primárias produzidas nos diferentes tratamentos. Através do Quadro 13 nota-se que as brotações menores, ou seja, de 2,0 cm, foram capazes de formar raízes primárias de maior comprimento, embora, como já comentado acima, as tivessem formado em menor número, quando comparados aos brotos maiores, no geral. Nestas brotações menores, as respostas ao suprimento de IBA foram, também, mais evidentes e crescentes. Os 4,0 mg IBA/l que fizeram com que os brotos de 4,0 cm produzissem o maior número de raízes primárias condicionaram, também, raízes de menor comprimento, maximizando-o em 1,3 cm, aproximadamente. Para este mesmo nível da auxina, o inverso foi observado em brotações menores. Nestas, embora as raízes primárias aparecessem em número inferior, elas apresentaram comprimento médio de 4,0 cm. A facilidade com que as raízes cresceram quando do suprimento de 2,0 mg IBA/l foi semelhante, isto é, foi maior nas brotações menores (atingindo 2,7 cm, em média) e bem inferior nos brotos maiores (atingindo apenas 0,9 cm, em média). Para o emprego de 1,0 mg IBA/l ao meio, ocorreu uma certa igualdade no crescimento das raízes para ambos os tipos de brotações e no meio de cultura isento de IBA, um melhor desempenho foi mostrado pelas brotações de 4,0 cm ao produzirem raízes primárias ligeiramente maiores do que àquelas das demais brotações, isto é, 2,0 cm contra 1,2 respectivamente.

Parece que um maior número de raízes primárias condiciona um menor crescimento das mesmas, como pode ser observado através da comparação entre os Quadros 12 e 13, e pela observação global da Figura 11.

QUADRO 13 - Tamanho (cm) médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" suplementado com diversas concentrações de IBA. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Tamanho do explante (cm)	IBA (mg/l)			
	0,0	1,0	2,0	4,0
2,0	1,2 Cb	1,7 Ca	2,7 Ba	4,0 Aa
4,0	2,0 Aa	1,7 ABa	0,9 Bb	1,3 ABb

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para tamanho do explante e minúscula, para IBA) não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey 5%.

O número de raízes secundárias em brotações micropropagadas de K. coriacea variou de acordo com as diferentes concentrações de IBA empregadas no teste experimental (Quadro 14). A concentração de IBA mais alta, isto é, 4,0 mg/l tornou possível a emissão de 1,8 raízes secundárias, em média, por brotação independente de seu tamanho. Como se pode ver, esta média para emissão de raízes secundárias foi estatisticamente igual às 0,9 raízes secundárias formadas, por sua vez, em brotações inoculadas em meio nutritivo acrescido de 2,0 mg IBA/l. Resultados menos interessantes foram observados através da suplementação exógena de 1,0 mg IBA/l os quais mostraram-se idênticos para 0,0 mg IBA/l. Nestas duas últimas condições, apenas 0,7 raízes secundárias, em média, foram formadas nas brotações utilizadas.

FIGURA 11 - Brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius inoculadas em meio "MS" suplementado com diversas concentrações de IBA em mg/l. ESAL, Lavras /MG , 1990.

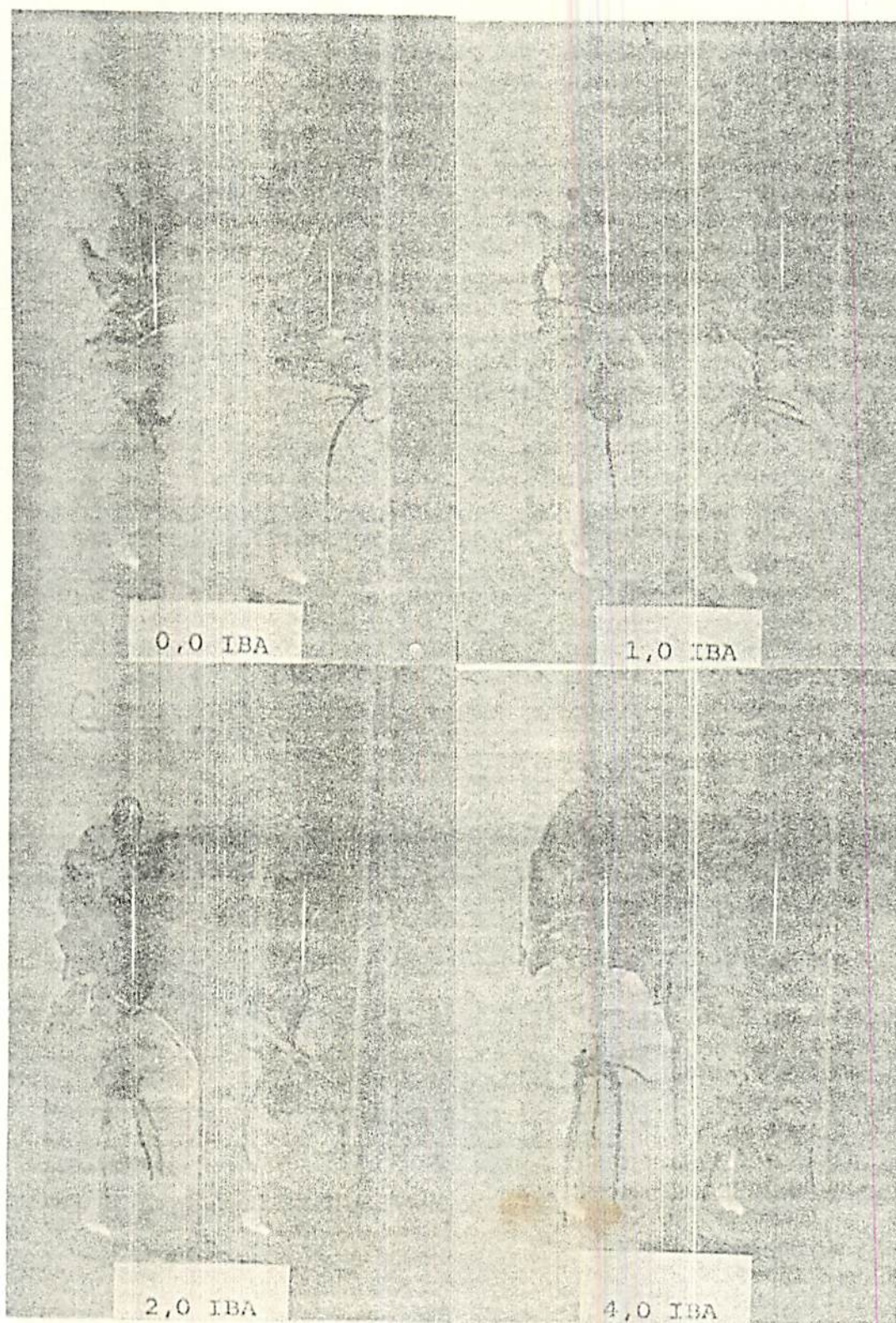


FIGURA 11

QUADRO 14 - Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" suplementado com diversas concentrações de IBA. ESAL, Lavras-MG, 1990.

IBA (mg/l)			
0,0	1,0	2,0	4,0
0,7 B	0,7 B	0,9 AB	1,8 A

OBS.: As médias seguidas da mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey 5%.

Embora BORNMAN (1983) tenha ressaltado, genericamente, o fato de que, para um melhor desenvolvimento do sistema radicular, as auxinas devem ser usadas apenas como indutoras da formação de raízes e que as mesmas, principalmente quando empregadas em altas concentrações, devam ser subtraídas do meio de cultura, no presente trabalho não foi notado, aparentemente, nenhum efeito inibitório de IBA ao desenvolvimento do sistema radicular. As brotações permaneceram, desde sua inoculação até a data de análise do experimento, por 45 dias consecutivos no mesmo meio de cultura enriquecido com as várias concentrações de IBA. Talvez, os níveis aqui utilizados estejam abaixo daquele que poderia ser considerado como deletérico ao desenvolvimento de raízes em K. coriacea "in vitro". Em outros experimentos, este nível poderá ser detectado com exatidão e, poder-se-á, também, estabelecer, com rigor, qual o melhor período de tempo que as bro-

tações excisadas poderão ficar inoculadas no meio de cultura para que ocorra a indução de raízes sem danos prejudiciais ao desenvolvimento destas.

A combinação de auxinas com outros compostos e que já foi empregado, com sucesso, para o enraizamento "in vitro" de brotações excisadas de muitas espécies florestais como, por exemplo, Pinus sylvestris (BORNMAN & JANSSON, 1980). Betula pendula (DEMBNY et alii, 1988) e Eucalyptus na fase de calos (KITAHARA & CALDAS, 1975), poderá ser estudada para K. coriacea em futuros testes. Neste contexto podem ser citadas as combinações entre IBA e coumarina, IBA e fusicoxina, IBA e água de coco e muitas outras.

4.2.2. Uso de diversas concentrações dos sais de ágar no meio

O enraizamento "in vitro" de brotações micropropagadas de K. coriacea foi variável de acordo com a combinação de diversos níveis de ágar e diferentes concentrações dos sais utilizados no meio de cultura.

O não uso do agente geleificante, neste caso, o ágar, não trouxe benefício algum à indução e desenvolvimento do sistema radicular, como comprova o Quadro 15. No meio inteiramente líquido, as brotações de K. coriacea não emitiram, independentemente do grau de salinidade do meio, sequer uma raiz. Este fato não

aconteceu nos outros tratamentos quando ágar foi adicionado ao meio. Há uma aparente necessidade de K. coriacea para meios densos, no que diz respeito à rizosfera. O meio de cultura líquido pode estar provocando uma forte condição de anaerobismo, a qual ficaram expostas as partes basais das brotações, provocando uma forte desoxigenação letal à diferenciação de raízes. Apesar do oxigênio ser um gás de solubilidade difícil em água ou em meios nutritivos líquidos, a oxigenação ocorre com maior intensidade na interface entre o ar e o líquido, ou seja, na superfície deste. Ao contrário de muitas espécies vegetais citadas em literatura, K. coriacea não suporta este anaerobismo. Como se pode ver na Figura 12, aconteceram casos em que os tecidos das brotações submersos no meio chegaram a necrosar e morrer. Um dos modos de se contornar esta acentuada desoxigenação é fazer com que o meio fique a maior parte do tempo possível sob condições de agitação. Esta agitação faz com que ocorra uma maior transferência de oxigênio no meio de cultura, na medida em que provoca um aumento da superfície de interface ar-líquido e uma melhoria na distribuição de oxigênio recém solubilizado. O meio líquido nutritivo empregado neste experimento foi totalmente estacionário o que, seguramente, ajudou o anaerobismo. Em experimentos futuros, meios líquidos poderão ser testados sob diferentes graus e intensidade de agitação.

O emprego de ágar, ou qualquer dos geleificantes mencionados por PIERIK (1987), cria uma condição para melhor aeração das bases dos explantes. Nas culturas, de meio sólido, ocorre uma interface entre o ar, o meio e os tecidos expostos das brota

FIGURA 12 - Brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius inoculadas em meio "MS" modificado e em diversas concentrações de sais e ágar. ESAL, Lavras / MG, 1990.

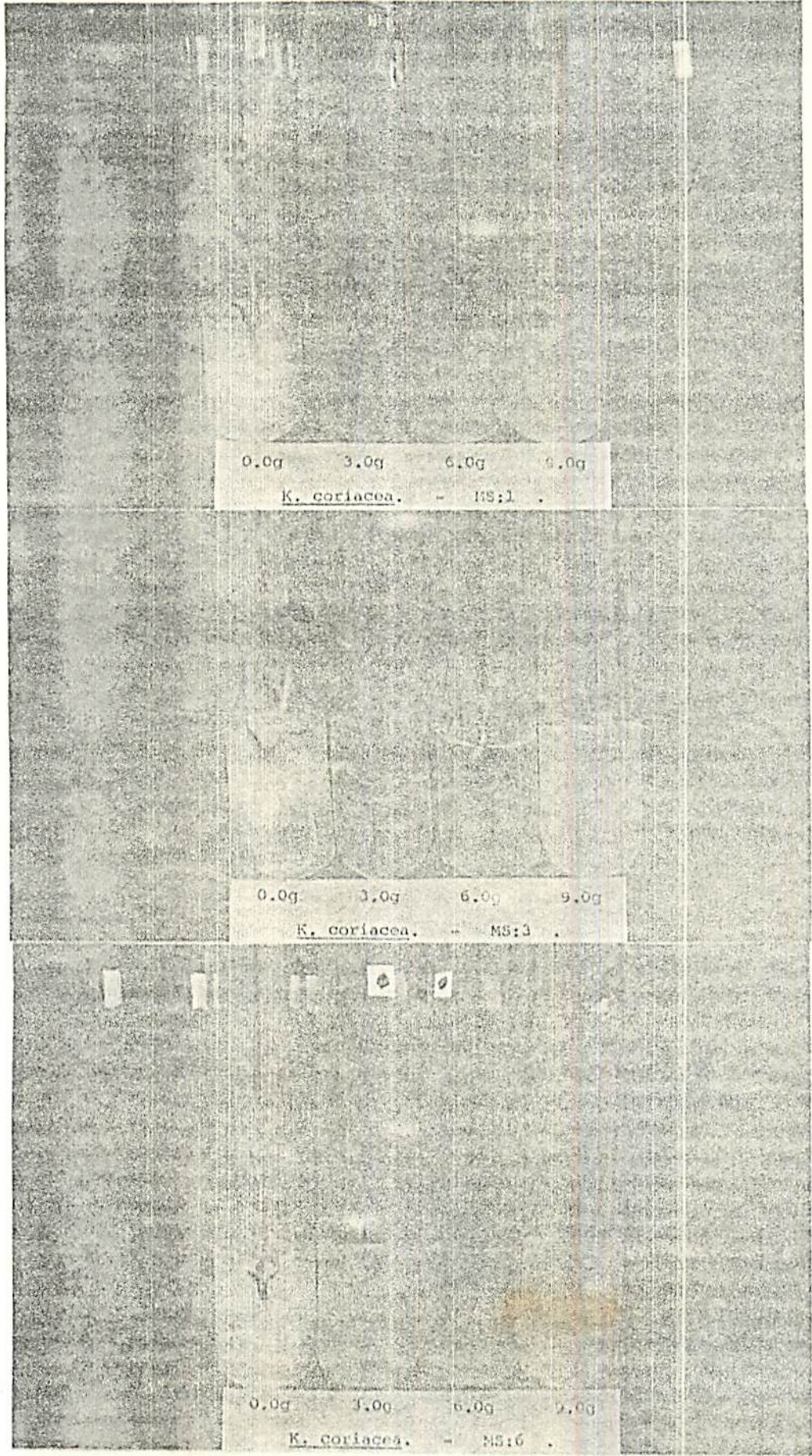


FIGURA 12

ções inoculadas fazendo com que o oxigênio fique mais disponível ao metabolismo.

A consistência do meio de cultivo provocada pelo ágar a 3,0 g/l, de um modo geral, foi muito interessante à produção de raízes primárias (Quadro 15). Este nível de ágar sobressaiu-se aos demais estudados. Ao se utilizar a concentração normal de sais da formulação MURASHIGE & SKOOG (1962), ela proporcionou a produção de 4,3 raízes primárias, em média, por broto. Por outro lado, um número estatisticamente equivalente foi conseguido com a administração de 6,0 g/l e de 9,0 g/l, quais sejam, 3,3 e 3,0 raízes primárias por brotação. Para concentrações de sais inferiores, como por exemplo, 1/3 da normal, a produção de raízes caiu de modo sensível para cada nível de ágar empregado. Assim, em 3,0 g/l, 6,0 g/l e 9,0 g/l a emissão de raízes assumiu os seguintes valores, respectivamente: 2,3; 1,8 (iguais, do ponto de vista estatístico) e 0,3 por explante. Já no meio cuja salinidade foi menor, isto é, 1/6 da concentração normal, estes índices caíram para 1,0; 0,3 e 0,0.

Pode-se notar, ainda, que K. coriacea manifesta uma preferência para o uso do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) com suas proporções de sais originais, ou melhor, 1/1, para a emissão de raízes primárias e que, meios muito densos como aqueles conseguidos através dos suprimentos de 6,0 g/l e 9,0 g/l, aqui empregados, provocaram uma diminuição aparente na capacidade de emissão das raízes primárias, principalmente para menores concentrações salinas do meio. Talvez ocorresse a indução, mas não o desenvolvimento das raízes a estruturas maiores perceptíveis a olho nu.

QUADRO 15 - Número médio de raízes primárias em brotações micro-propagadas de *Kielmeyera coriacea* Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes concentrações de sais e ágar. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Sais	Ágar (g/l)			
	0,0	3,0	6,0	9,0
1/1	0,0 Ba	4,3 Aa	3,3 Aa	3,0 Aa
1/3	0,0 Ba	2,3 Ab	1,8 Ab	0,3 Bb
1/6	0,0 Ba	1,0 Ac	0,3 ABC	0,0 Bb

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para concentrações de ágar e minúscula, para concentrações de sais não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey a 5%.

A densidade maior do meio poderia estar impossibilitando ou inibindo este desenvolvimento por proporcionar uma "barreira mecânica" difícil de ser rompida pelos frágeis primórdios radiculares, logo após sua indução. Além disso, altos níveis de ágar fazem com que ocorra uma menor intensidade de disponibilidade de nutrientes aos explantes inoculados e isto se agrava à medida em que o meio fica mais denso. Então, aqueles nutrientes que seriam necessários para a rizogênese têm sua absorção prejudicada e o metabolismo inerente ao fenômeno fica, também, prejudicado. Pode-se ter aqui uma possível explicação para o fato da concentração salina 1/1 ter apresentado resultados superiores às demais. Os

níveis relativamente elevados dos sais na formulação básica de MURASHIGE & SKOOG (1962) poderiam ser suficientes para compensarem esta menor disponibilidade em meios de cultura mais densos.

O tamanho das raízes primárias, de modo semelhante ao que ocorreu com o número das mesmas, foi afetado pela salinidade do meio e pela concentração de ágar empregada, de um modo geral. O Quadro 16 mostra que, outra vez, os meios mais concentrados 1/1 e 1/3 foram interessantes para que as raízes primárias e emitidas atingissem comprimentos mais avantajados. Embora ocorresse a tal "barreira mecânica" nos meios mais densos, a salinidade elevada foi suficiente para vencer a menor disponibilidade dos sais e nutrir adequadamente os explantes, fazendo com que suas raízes primárias se desenvolvessem mais. Os valores por elas atingidos foram considerados estatisticamente iguais, quais sejam, 1,8; 1,6. Para concentrações menores dos sais, como consta ainda no Quadro 16, os tamanhos das raízes sofreram uma diminuição bastante significativa. Ao se usar 1/3 dos níveis originais, o comprimento médio das raízes primárias assumiram, respectivamente, para 3,0 g/l, 6,0 g/l e 9,0 g/l, os seguintes valores: 1,3; 0,7 e 0,0 cm.

A emissão de raízes secundárias foi significativamente afetada pela salinidade do meio. O meio MURASHIGE & SKOOG (1962), somente quando usado em sua plenitude em termos de sais, fez com que raízes secundárias fossem emitidas numa média de 0,8 por explante (Quadro 17 e Figura 12).

De um modo geral K. coriacea mostrou o melhor desen-

QUADRO 16 - Tamanho (cm) médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes concentrações de sais e ágar. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Sais	Ágar (g/l)			
	0,0	3,0	6,0	9,0
1/1	0,0 Ba	1,8 Aa	1,6 Aa	2,1 Aa
1/3	0,0 Ba	1,3 Aa	0,7 ABb	0,0 Bb
1/6	0,0 Aa	0,3 Ab	0,0 Ac	0,0 Ab

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para concentrações de ágar e minúscula, para concentrações de sais) não diferem, estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

QUADRO 17 - Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes concentrações de sais. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Sais		
1/1	1/3	1/6
0,8 A	0,0 B	0,0 B

OBS.: As médias seguidas da mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste Tukey 5%.

volvimento do sistema radicular para a formulação salina original de MURASHIGE & SKOOG (1962) suplementada de preferência com 3,0; 6,0 ou 9,0 g ágar/l.

4.2.3. Efeitos do pH e diversos níveis de ágar no meio

Das cinco faixas de pH estudadas, combinadas à diversos níveis de ágar, as correspondentes a 5,4 e 5,7 mostraram os melhores resultados para emissão de raízes primárias (resultados estes semelhantes estatisticamente) nas concentrações de 3,0 g/l e 6,0 g ágar/l (QUADRO 18 e Figura 13). Estes valores foram 5,3 e 6,0 raízes, respectivamente, no pH 5,4 e 5,3 e 6,3 no pH 5,7. No entanto, ao se empregar 3,0 g ágar/l os melhores resultados foram conseguidos na faixa de pH entre 5,4 a 6,0. Já através do emprego de 6,0 g ágar/l, valores idênticos apresentaram-se nos pH 5,4; 5,7 e 6,3.

As faixas de pH muito acima ou muito abaixo de 5,7, podem provocar distúrbios no que diz respeito à disponibilidade de íons que resultam da dissociação dos sais no meio de cultura e sua assimilação pelo explante. Assim, em determinados pH, alguns íons tornam-se mais facilmente disponíveis e/ou assimiláveis do que outros em igual condição. É um dos fatos que podem explicar a queda na capacidade das brotações de K. coriacea de produzirem raízes, bem como, desenvolvê-las, principalmente nos pH 5,1; 6,0 e 6,3 aqui testados. Outro fato que poderia auxi-

QUADRO 18 - Número médio de raízes primárias em brotações micro-propagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras-MG, 1990.

pH	Ágar (g/l)			
	0,0	3,0	6,0	9,0
5,1	0,0 Ba	0,8 ABc	1,3 Ab	1,0 AB a
5,4	0,0 Ba	5,3 Aa	6,0 Aa	1,0 Ba
5,7	0,0 Ca	5,3 Aa	6,3 Aa	1,3 Ba
6,0	0,0 Ca	3,3 Aab	3,0 ABb	1,0 BCa
6,3	0,0 Ca	1,3 Bbc	4,0 Aab	0,7 BCa

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de ágar e minúscula, para pH) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

liar o entendimento desta menor taxa de emissão de raízes é a dissociação que os hormônios auxínicos sofrem em condições de diferentes concentrações hidrogeniônicas. Esta dissociação pode levar, conseqüentemente, à uma menor atividade do hormônio, fazendo com que a indução da formação de raízes e seu desenvolvimento sejam prejudicados. A dissociação das auxinas tem sido estudada há muito tempo mas os estudiosos não sabem dizer, com clareza, se a dissociação é maléfica ou benéfica ao enraizamento de estacas, de um modo geral. AUDUS (1948) e WHITE (1932) sustentam a

FIGURA 13 - Brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius inoculadas em meio "MS" modificado e em várias concentrações de ágar e pH diferentes. ESAL, Lavras/MG, 1990.

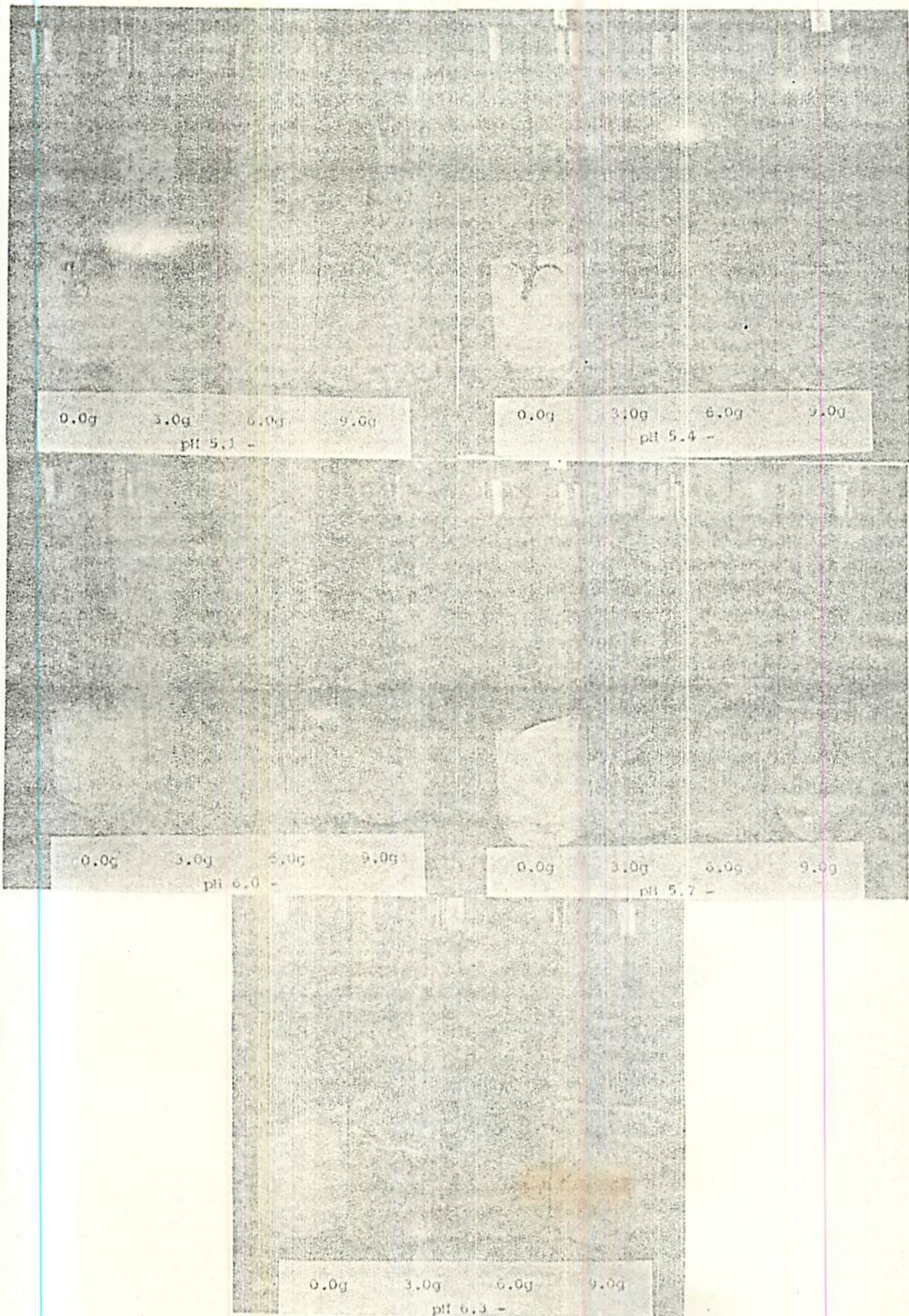


FIGURA 13

hipótese de que as auxinas só são ativas quando não dissociadas, mas, BURSTRÖM (1953) mostra uma tendência de aceitar a forma aniônica da auxina como realmente ativa. Fica difícil e, também, fora de propósito do presente trabalho, elucidar esta questão.

Analogamente aos resultados do experimento anterior, a ausência de ágar no meio de cultura foi muito prejudicial à emissão de raízes primárias e os dados aqui coletados reforçam a idéia de que o anaerobismo, ao qual ficaram expostos os tecidos da base das brotações, é desinteressante para o processo. Os mesmos comentários anteriormente feitos devem, aqui, ser considerados. Como se pode ver, 9,0 g ágar/l, no Quadro 18, não proporcionou efeitos significativos para os diferentes pH adotados. Poucas raízes foram formadas nesta condição.

O comprimento das raízes primárias variou, de modo semelhante, com o pH e com a densidade do meio de cultura. Então, o maior tamanho médio de raízes primárias emitidas foi conseguido em pH 5,7 para o nível de 6,0 g ágar/l e 5,4 ou 5,7 para o nível de 3,0 g/l (Quadro 19). Na concentração hidrogeniônica dada pelo pH 5,4, os níveis de ágar que mais se destacaram foram 3,0 e 6,0 g/l ao produzirem raízes com 2,3 cm, em média. Raízes pouco desenvolvidas foram observadas, quando consideradas no contexto geral, no entanto, para os valores extremos de pH aqui testados, ou sejam, 5,1 e 6,3. Nestes níveis, parece que, novamente a disponibilidade e a assimilação de nutrientes está determinando o desenvolvimento e o crescimento das raízes primárias. É lógico supor que a taxa de multiplicação celular, que determina em parte o crescimento da raiz, fique prejudicada em função do desba -

QUADRO 19 - Tamanho (cm) médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras-MG, 1990.

pH	Ágar (g/l)			
	0,0	3,0	6,0	9,0
5,1	0,0 Ba	0,1 Bb	1,8 Ab	0,5 Ba
5,4	0,0 Ba	2,3 Aa	2,3 Ab	0,7 Ba
5,7	0,0 Ca	2,5 Aa	4,0 Aa	0,7 Ba
6,0	0,0 Ca	3,0 Aa	1,8 Bb	0,5 BCa
6,3	0,0 Ca	0,7 Bb	1,8 Ab	0,3 BCa

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de ágar e minúscula, para pH) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

lanço nutricional ao qual as brotações ficaram sujeitas nestes níveis de pH. É lógico supor, também, que a já referida dissociação auxínica tenha contribuído, neste caso, negativamente para o crescimento das raízes, uma vez que, as auxinas agem de modo direto sobre a multiplicação e o alongamento celular.

A emissão de raízes secundárias pode ser maximizada no pH 5,4 através da suplementação de 3,0 g/l ou 6,0 ágar/l. Nessas ocasiões foram formadas 2,0 e 2,3 raízes secundárias, ambos os números não diferindo estatisticamente (Quadro 20). Para o pH

QUADRO 20 - Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de Kielmeyera coriacea Martius, inoculadas em meio "MS" modificado, suplementado com 4,0 mg IBA/l e em diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras-MG, 1990.

pH	Ágar (g/l)			
	0,0	3,0	6,0	9,0
5,1	0,0 Aa	0,0 Ab	0,1 Ab	0,1 Aa
5,4	0,0 Ba	2,0 Aa	2,3 Aa	0,0 Ba
5,7	0,0 Ba	1,8 Aa	1,8 Aab	0,7 ABA
6,0	0,0 Aa	1,0 Aab	0,3 Ab	0,0 Aa
6,3	0,0 Aa	0,0 Ab	1,0 Aab	0,0 Aa

OBS.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de ágar e minúscula, para pH) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

mais comumente usado, isto é, 5,7, nos dois primeiros níveis de ágar aqui mencionados uma média de 1,8 raízes secundárias formaram-se e igualaram-se, em número, às 2,0 e 2,3 acima mencionadas. No pH 5,1 não se notou nenhuma diferença significativa dentre os níveis de ágar empregados e, de modo geral, o número de raízes produzidas foi praticamente nulo. Observações semelhantes podem ser feitas para pH 6,3 salientando-se apenas o fato de que com 6,0 g ágar/l adicionados ao meio, 1,0 raiz secundária, em média, foi emitida por brotação enraizada.

De um modo geral, a maior densidade do meio de cultura, determinada pelo uso de 9,0 g ágar/l, mostrou efeitos desinteressantes para o enraizamento "in vitro" de brotações micropropagadas de K. coriacea, nos diferentes pH estudados. Nestes meios, poucas raízes primárias foram capazes de se formar e, quando isto acontecia, mostravam pouco crescimento e pouquíssimas (ou nenhuma) raízes secundárias.

4.3. Considerações finais

Trata-se do primeiro trabalho feito com Kielmeyera coriacea, em termos de cultura de tecidos. Então, comparações entre os resultados obtidos neste trabalho com os de outros autores, não foi possível, na medida em que estes se referem a espécies florestais diferentes de K. coriacea. Procurou-se, da melhor maneira apresentar resultados e comentários que fornecessem a maior quantidade possível de informações sobre o comportamento "in vitro" desta espécie singular, a fim de que os mesmos se constituam em bases fundamentais para trabalhos e estudos futuros com K. coriacea, em cultura de tecidos. No decorrer das discussões, algumas sugestões ou recomendações foram feitas neste sentido.

K. coriacea regenera brotos com relativa facilidade desde que sejam supridas, através do meio de cultura, suas necessidades nutricionais e hormonais e, através da sala de crescimen

to, suas necessidades de fotoperíodo e temperatura. Predominante-
mente, as brotações de K. coriacea são formadas a partir de me-
ristemas adventícios. Raras foram as ocasiões em que meristemas
axilares pré-existentes sofreram desenvolvimento capaz de forma-
rem uma brotação em si. A regeneração de brotos em K. coriacea
foi através de meristemas axilares, e esta via de regeneração
tem sido apontada por MINOCHA (1980) como a mais comum para uma
grande diversidade de espécies vegetais. Embora esta possibilite
a formação de um grande número de brotações, muitos pesquisado-
res (VAN ARNOLD, 1989; DURZAN, 1980 e o próprio MINOCHA, 1980)
sustentam a hipótese de uma "ocorrência de desuniformidade gené-
tica" entre as brotações adventícias originadas o que poderia
comprometer a qualidade das mesmas. Não foi feito, no presente
trabalho, nenhum teste experimental para determinar anormalida-
des genéticas entre os brotos proliferados. Neste contexto, aná-
lise de cariótipo para a detecção de aberrações cromossomais e
cortes citológicos para o estudo de defeitos morfológicos e ana-
tômicos deverão ser levados a efeito em experimentos posteriores.
Uma vez comprovado que estas anormalidades não estão ocorrendo,
a formação de brotos por meristemas adventícios poderá ser utili-
zada, sem riscos, para a micropropagação de K. coriacea. BALL
(1987); CHALUPA (1987) e AHUJA (1987) afirmam a não ocorrência
de aberrações em brotações originadas através deste processo, pa-
ra muitas espécies florestais micropropagadas com sucesso.

É necessário a produção de um calo tanto maior quan-
to maior for o número de brotações adventícias a emitir. Assim,
antes da emissão dos brotos, os explantes de K. coriacea formam

calo, estrutura basicamente responsável pela possível desuniformidade genética dos brotos. Se K. coriacea emite brotos adventícios é de se supor, baseando-se nos estudos genéricos de BORNMAN (1987), que os calos sejam extremamente ricos em meristemóides. Uma vez expostos a tratamentos com citocininas, benzilaminopurina (BAP) por exemplo, estes meristemóides desenvolvem-se a meristemas propriamente ditos e estes a brotações. Uma observação visual da presença destes meristemóides poderá ser conseguida, eventualmente, examinando-se cortes citológicos em calos. Um sincronismo de diferenciação dos meristemóides foi notado em K. coriacea, pois, quase a totalidade dos brotos são emitidos de uma só vez e este sincronismo é muito semelhante àquele encontrado e discutido nos trabalhos de BORNMAN & JANSSON (1980), BORNMAN & VOGELMAN (1984), THORPE (1988) e VON ARNOLD & HACKMAN (1988) dentre outros. Uma técnica que se poderia tentar com K. coriacea, como AITKEN-CHRISTIE et alii, (1988) fizeram com Pinus radiata, é a multiplicação "in vitro" destes meristemóides, por várias culturas, logo após a calogênese e antes que os mesmos iniciem a sua diferenciação em brotos.

K. coriacea mostrou facilidade para a produção de calos. A produção de calos tem uma grande importância para aqueles que se interessarem pelo cultivo de células em suspensão, visto que, por intermédio deste cultivo K. coriacea poderá, também, ser micropropagada. Resta aos interessados detectar quais as melhores condições para maximizar a calogênese "in vitro", assim como, a friabilidade dos calos, condição sem a qual não se conseguirá obter um bom número de células ou aglomerados de células

livres. Estas células livres têm a potencialidade de se desenvolverem a embriões somáticos e estes, por sua vez, a estruturas maiores e mais diferenciadas como as brotações. As condições requeridas para um bom desenvolvimento do processo deverão ser estudadas experimentalmente. O cultivo de células em suspensão tem ainda, uma grande importância para os que se dedicarem ao estudo do metabolismo secundário onde são formados muitos compostos químicos de interesse ao homem. No caso particular de K. coriacea, é no seu metabolismo secundário que se forma a OSAJAXANTONA, princípio químico que se mostrou eficaz cercaricida. Pelo cultivo de células em suspensão, com o uso de bioreatores, poder-se-á produzir industrialmente este composto, desde que, é claro, tenha se chegado ao melhor meio de cultura.

No decorrer dos experimentos foi notado uma certa oxidação, fruto, provavelmente, da liberação de fenóis por parte dos explantes. Esta oxidação, no entanto, não foi prejudicial ao desenvolvimento e crescimento dos mesmos, mas, à medida que a cultura envelhecia, seus efeitos maléficos se faziam notar. A taxa de emissão de novos brotos caiu acentuadamente em condições de oxidação maior, em culturas mais velhas (acima de 45 dias) e algumas mortes de material ocorreram. A intensidade da oxidação variou, de um modo geral, diretamente com o volume de material vegetal imerso no meio de cultura e, nos tratamentos onde ocorreu uma maior formação de calos, ela foi maior. Para se conseguir uma cultura "mais limpa", isto é, menos oxidada poder-se-á fazer uso de uma série de produtos químicos ou sintéticos (ácido cítrico, carvão ativado, PVP, etc), que adsorvem os oxidantes.

GEORGE & SHERRINGTON (1984) e THORPEL & PATEL (1984) fornecem uma lista sobre os anti-oxidantes, bem como, a maneira como estes agem na prevenção da oxidação.

Quanto à rizogênese, K. coriacea não mostrou muitas dificuldades. Invariavelmente, todas as raízes emitidas pelas brotações foram a partir de calos que se formaram nas bases destas brotações. Um agravante poderá surgir neste tipo de emissão de raízes, visto que, uma perfeita conexão vascular entre raízes e brotos pode não acontecer, comprometendo a qualidade da muda. Fatos concretos da não formação de tecidos vasculares no sistema raiz-calo-broto já foram detectados por WETMORE & RIER (1963) ao se depararem com a grande quantidade de plântulas inviáveis produzidas pela micropropagação de Syringa vulgaris. Seria interessante que, doravante, se fizesse um estudo anatômico das plântulas de K. coriacea para se determinar a presença ou não da conexão vascular entre a brotação e as raízes, principalmente à nível do calo.

5. CONCLUSÕES

- Uma maximização da proliferação de brotos foi conseguida com o emprego de 5,0 mg BAP/l + 0,1 mg NAA/l. A maior taxa de brotos com mais de 1,0 cm foi conseguida em meios desprovidos de BAP;

- Segmentos nodais mostraram maior capacidade de produção de brotos, em relação aos apicais, e ela foi máxima com o emprego de 0,5 mg BAP/l. Neste mesmo nível de BAP foi conseguida a melhor porcentagem de brotos com mais de 1,0 cm;

- Temperaturas de 27^o e 30^oC foram as melhores para o desenvolvimento de K. coriacea, produzindo maiores taxas de proliferação de brotos. Já a maior porcentagem de brotos com mais de 1,0 cm ocorreu nestas mesmas temperaturas aliadas aos fotoperíodos 16/8 e 12/12 h;

- 30 ou 45 g de sacarose administradas ao meio de cultura cuja concentração salina assumiu valores de 1/1 ou 1/2 proporcionaram maior produção de brotações. Estas mesmas concentrações de sais do meio de cultura ou 30 g de sacarose/l. levaram à emissão de brotos com mais de 1,0 cm;

- brotos com 4,0 cm de altura apresentaram o maior número de raízes primárias e o melhor desenvolvimento (tamanho) das mesmas em presença de 4,0 mg IBA/l. Independentemente do tamanho do broto, este nível de IBA favoreceu a maior emissão de raízes secundárias;

- os níveis de 3,0-6,0 e 9,0 g ágar/l proporcionaram a emissão do maior número de raízes primárias e o melhor crescimento das mesmas, para a concentração salina 1/1. Nesta concentração de sais, independentemente da densidade do meio, ocorreu a maior emissão de raízes secundárias;

- das faixas de pH estudadas, as 5,4 e 5,7 aliadas a 3,0 g ou 6,0 g ágar/l promoveram a maior emissão de raízes primárias. O melhor desenvolvimento destas (maior tamanho) foi conseguido nos pH 5,4-5,7 e 6,0 aliados a 3,0 g ágar/l e no pH 5,7 para 6,0 g ágar/l. A maior emissão de raízes secundárias ocorreu nos pH 5,4 e 5,7 para 3,0 g ágar/l e no pH 5,4 para 6,0 g ágar/l.

6. RESUMO

A espécie Kielmeyera coriacea Martius (Guttiferae) é comum aos cerrados brasileiros e tem sido muito explorada por causa de sua espessa casca suberificada. Dela se extrai a cortiça cujo emprego, sob a forma de placas industrializadas, vem crescendo dia à dia. K. coriacea produz, também compostos químicos de interesse farmacológico tais como a OSAJAXANTONA; que mostrou eficiência no combate às cercárias da schistosomose. Devido à sua extensa exploração e à conversão dos cerrados em campos de produção agrícola, K. coriacea corre o risco de extinção, como muitas outras espécies dos cerrados. Procurou-se, através do presente trabalho, estudar, preliminarmente, o comportamento "in vitro" desta espécie, bem como, determinar a viabilidade de sua micropropagação. Neste contexto, foram testados vários fatores que, a exemplo do que se tem feito mundialmente em trabalhos de cultura de tecidos vegetais em espécies florestais, podem influenciar decisivamente no sucesso de sua produção em larga escala. Os testes experimentais para proliferação de brotações empregaram os seguintes fatores: Benzilaminopurina (BAP - 0,0-0,1-1,0 e

5,0 mg/l) x ácido naftalenoacético (NAA - 0,0-0,1 e 1,0 mg/l); segmentos nodais e apicais x BAP (0,0-0,5-1,0-2,0-4,0 e 8,0 mg/l); temperatura (21°-24°-27° e 30°C) x fotoperíodo (16:8-12:12 e 8:16) e concentração de sais (1:1-1:2 e 1:3) x sacarose (0-30-45-60 e 75 g/l). Os testes experimentais para o enraizamento das brotações usaram os seguintes fatores: tamanho da brotação (2,0 e 4,0 cm) x ácido indolbutírico (IBA - 0,0-1,0-2,0 e 4,0 mg/l); concentração de sais (1:1-1:3 e 1:6) x ágar (0,0-3,0-6,0 e 9,0 g/l) e pH (5,1-5,4-5,7-6,0 e 6,3) x ágar (0,0-3,0-6,0 e 9,0 g/l). O meio de cultura básico utilizado em todos os testes foi o de MURASHIGE & SKOOG (1962) e as avaliações foram feitas aos 45 dias de cultivo "in vitro". Nos experimentos de proliferação de brotos foram considerados e analisados os dados referentes ao número médio total de brotações produzidas e porcentagem média de brotações com mais de 1,0 cm de altura. Já nos experimentos de enraizamento, os dados considerados e analisados foram: número médio de raízes primárias emitidas, tamanho médio das raízes primárias e número médio de raízes secundárias. Algumas observações quanto a via preferencial de regeneração das brotações e a ocorrência de oxidação também foram feitas. K. coriacea mostrou maior emissão de brotos para 5,0 mg BAP/l + 0,1 mg NAA/l. A maior taxa de brotos com mais de 1,0 cm foi conseguida em meio com concentrações mais baixas de BAP. Temperaturas de 27° e 30°C foram benéficas ao desenvolvimento de K. coriacea. A formação de um bom sistema radicular pode ser conseguido com o emprego de brotações com 4,0 cm de altura e com a suplementação de 4,0 mg IBA/l ao meio de cultura. pH 5,4 e 5,7 foram interessantes ao enraizamento

"in vitro" de brotações de K. coriacea assim como 3,0 e 6,0 g ágar/l, de um modo geral.

7. SUMMARY

GENERAL ASPECTS FROM THE BEHAVIOR "IN VITRO" OF Kielmeyera coriacea Martius (Guttiferae): PRODUCTION AND ROOT SYSTEM IN SHOOTS.

The Kielmeyera coriacea Martius (Guttiferae) specie is very common to the Brazilian "cerrado" soils and has been very much explored for its thicker suberized bark, from which, chemicals complex with high pharmacological properties such as, OSAJAXANTONA, that has showed efficiency in the schistosomose control. This present work has been trying to study "in vitro" the behavior that specie, as well as, the viability of its micropropagation. The experimental assays for proliferation of shoots used the following: Benzylaminopurina (BAP - 0.0-0.1- 1.0 and 5.0 mg/l) x Naphtaleno-acetic acid (NAA - 0.0-0.1 and 1.0 mg/l), nodals and apicals segments x BAP (0.0-0.5-1.0-2.0-4.0 and 8.0 mg/l), temperature (21-24-27 and 30°C) x photoperiod (16:8-12:12 and 8:16) and salts concentrations (1:1-1:2 and 1:3) x sucrose (0-30-45-60 and 75 g/l). The experimental tests for root system in shoots used shoot size 12.0 and 4.0 cm) x Indolbutiric

acid (IBA - 0.0-1.0-2.0-4.0 mg/l), salt concentrations (1:1-1:3 and 1:6) x agar (0.0-3.0-6.0 and 9.0 g/l) pH (5.1-5.4-5.7 - 6.0 and 6.3) x agar (0.0-3.0-6.0-9.0 g/l). The basic culture medium used in all those experiments was Murashige & Skoog (1962) and the evaluations were made at 45 days of culture "in vitro". It was considered the shoots experiment proliferation, and its dates analyzed for average percentage of shoots with more than 1.0 cm height. For the roots system the dates analyzed and used were for average number of primary roots and average number of secondary roots. K. coriacea showed higher shoots emission in 5.0 mg BAP/l + 0.1 mg NAA/l. Higher shoots rate with more than 1.0 cm were obtained in medium with lower BAP concentrations and temperatures of 27 and 30°C were better for K. coriacea development. Good root system formation was obtained using shoots with 4.0 cm height and with the culture medium supplied with 4.0 mg IBA/l. In general, the pHs of 5.4 and 5.7 were good for the root system "in vitro" of K. coriacea shoots as well as 3.0 and 6.0 g agar/l.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A.J. Practice and promise of micropropagation of woody species. Acta Horticulturae, Hague, 79:113-27, 1978.

_____. Propagating temperate woody species in tissue culture. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 28:155-62, 1977.

_____ & WHITELEY, E. Culture of Malus tissues "in vitro". I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 4:183-9, 1976.

AHUJA, M.R. In vitro propagation of poplar and aspen. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry, Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.207-23.

AITKEN-CHRISTIE, J.; SING, P. & DAVIES, H. Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: HANOVER, J.W. & KEATHLEY, D.E. Genetic manipulation of woody plants. New York, Basic Life Sciences, Plenum Press, 1988. v.44, p.413-32.

- ALMEIDA, G. Cortiças. Revista Florestal, Rio de Janeiro, 3(3-4):10-24, 1946.
- AMMIRATO, P.V. & STEWARD, F.C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. Botanical Gazette, Chicago, 132(2):149-58, 1971.
- AUDUS, L.J. Studies on the pH-relationships of root growth and its inhibition by 2,4-D and coumarin. The New Phytologist, Oxford, 48(1):97-114, 1948.
- BALL, E.A. Tissue culture multiplication of Sequoia. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.146-57.
- BASSI, D. Propagazione in vitro del susino europeo "Prugna d'Aggen - Ente 707". Rivista di Frutticoltura, Ravenna, 2:31-4, 1984.
- BECWAR, M.R.; NOLAND, T.L. & WANN, S.R. A method for quantification of the level of somatic embryogenesis among Norway spruce callus lines. Plant Cell Reports, Berlin, 6:35-8, 1987.
- BERGMAN, L.; VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. Effects of N⁶-benzyladenine on shoots of five willow clones (Salix spp) cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 4:135-44, 1985.

- BONGA, J.H.M. Applications of tissue culture in forestry. In: REINART, J. & BAJAJ, Y.P.S. Plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Spring Verlag, 1977. p.93-107.
- _____. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. vol.1, p.249-71.
- _____. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R. & CIFERRI, O. Plant cell cultures: results and perspectives. Elsevier, 1980. p.253-63.
- BONNER, J. The relation of hydrogen ions to the growth rate of the Avena coleoptile. Protoplasma, Leipzig, 21:406-23, 1934.
- BORNMAN, C.H. Picea abies. In: BONGA, J.H.M. & DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. vol.3, p.2-29.
- _____. Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of Picea abies "in vitro". Physiologia Plantarum, Copenhagen, 57:5-16, 1983.

- BORNMAN, C.H. & JANSSON, E. Organogenesis in cultured Pinus sylvestris tissue. Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie, Leipzig, 96:1-6, 1980.
- _____ & VOGELMANN, T.C. Effect of rigidity of gel-medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in Picea abies. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 61:505-12, 1984.
- BOULAY, M. In vitro propagation of tree species. In: GREEN, C. E.; SOMERS, D.A. HACKETT, W.P. & BIESBOER, D.D. Plant tissue and cell culture. New York, Alan R. Liss, 1987. p.367-82.
- _____ ; GUPTA, P.K.; KROGSTYRUP, P. & DURZAN, D.J. Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce. Plant Cell Reports, Berlin, 7:134-7, 1988.
- BOXUS, P. The production of strawberry plants by in vitro micro propagation. Journal of Horticultural Science, London, 49: 209-10, 1974.
- BURGER, D.W. In vitro propagation of Eucalyptus sideroxylon. HortScience, Virginia, 22(3):496-7, 1987.
- BURSTROM, H. Physiology of root growth. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 4:237-52, 1953.

- CALDAS, L.S. & KITAHARA, H.E. Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of eucalyptus. Forest Science, Washington, 21(3):242-3, 1975.
- CAMPBELL, R.A. & DURZAN, D.J. Induction of multiple buds and needles in tissue culture of Picea glauca. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 53:1652-7, 1975.
- CHALUPA, V. European hardwoods. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. vol.3, p.224-46.
- COMPTON, M.E. & PREECE, J.E. Exudation and explant establishment. Newsletter Bibliography of Technical Reports, Washington, 50:9-37, 1986.
- CRESSWELL, R. & NITSCH, C. Organ culture of Eucalyptus grandis. Planta, New York, 125:87-90, 1975.
- DE FOSSARD, R.A. Tissue and organ culture of Eucalyptus. New Zealand Journal of Forestry Science, New Zealand, 4(2):267-78, 1974.
- _____. Tissue culture propagation of Eucalyptus ficifolia F. Muell. In: Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture. Peking, Science Press, 1976. p.425-38.

- DEMBNY, H.; ZOGLAVER, K.; MUROMTSEV, G.S. & GÖRING, H. Effect of fusicoocin in adventitious root formation of birch shoot tips Betula pendula (Roth) cultured "in vitro". Plant Cell Physiology, Tokyo, 29(2):237-42, 1988.
- DICELLO, N. & DUHOX, E. Organogenesis and multiplication "in vitro" of Eucalyptus camaldulensis - propagation via seedling callus culture. Journal of Plant Physiology, London, 115(3): 177-82, 1984.
- DIONELLO, S.B. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de Kielmeyera coriacea Martius. São Paulo, IB-USP, 1978. 76p. (Tese de Doutorado).
- _____ & BASTA, F. Informações sobre os caracteres quantitativos e qualitativos dos frutos e sementes de Kielmeyera coriacea Martius. Brasil Florestal, Rio de Janeiro, 48:75-84, 1980.
- DURAND-CRESSWELL, R. & NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of Eucalyptus grandis by organ culture. Acta Horticulturae, Hague, 78:149-55, 1977.

- DURZAN, D.J. Prospects for the mass propagation of economically important conifers by cell and tissue culture. In: SALA, F.; PARISI, R. & CIFERRI, O. Plant cell cultures: results and perspectives. Elsevier, North Holland Biomedical Press, 1980. p.283-8.
- _____ & GUPTA, P.K. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas fir cell suspension cultures. Plant Science, Elsevier, 52:229-35, 1987.
- _____ & LOPUSHANSKI, S.M. Propagation of american elm via cell suspension cultures. Canadian Journal of Forestry Research, Ottawa, 5:273-7, 1975.
- FERREIRA, M.B. Flores do planalto: divisas para Brasília. Cerrado, Brasília, 6(23):4-7, 1974.
- FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal. São Paulo, EDUSP, 1979. 1, 331p.
- FRANCLET, A. & BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalyptus clones. Australian Forestry Research, Melbourne, 13(1):83-9, 1982.
- GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories, Eversley, Exegetics, 1984. 709p.

- GONÇALVES, A.N. Reversão a juvenilidade e clonagem de Eucalyptus urophylla S.T. Blake, em sistemas de culturas de células e de tecido. Silvicultura, Piracicaba, 4(32):786-7, 1983.
- _____. Reversão a juvenilidade e clonagem de Eucalyptus urophylla S.T. Blake "in vitro". Piracicaba, ESALQ, 1982. 97p. (Tese de Doutorado).
- GOTTLIEB, O.R. Xanthonés from Kielmeyera ferruginea. Phytochemistry, London, 8:665-6, 1969.
- _____. Xanthonés from Kielmeyera rubriflora. Phytochemistry, London, 10:2253-5, 1971.
- _____. Xanthonés from Kielmeyera speciosa. Phytochemistry, London, 9:2537-44, 1970.
- GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. & JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of Eucalyptus citriodora Hook by tissue culture. Plant Science Letters, Elsevier, 20(3):195-201, 1980.
- HACKMAN, I.C. & ARNOLD, S. Von. Isolation and growth of protoplasts from cell suspensions of Pinus contorta. Plant cell Reports, Berlim, 2(2):92-4, 1983.

- HEILE-SUDHOULT, C.; HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. & GAFFNEY, G. R. "In vitro" embryonic axis and seedling shoot tip culture of Juglans nigra L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 6(2):189-97, 1986.
- HORGAN, K. Pinus radiata. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. vol.3, p.128-45.
- HU, C.Y. & SUSSEX, I.M. "In vitro" development of embryoids on cotyledons of Ilex aquifolium. Phytomorphology, Delhi, 21: 103-7, 1971.
- HUSSEY, G. "In vitro" propagation of Gladiolus by precocious axillary shoot formation. Scientific Horticulturae, Wye, 6: 287-96, 1977.
- JACQUIOT, C. Plant tissue and excised organ cultures and their significance in forest research. Journal of Institute of Wood Science, London, 16:22-34, 1966.
- KHOSH-KUI, M. & TAFAZOLI, E. Effect of acid on base pre-treatment on auxin response of damask rose cuttings. Scientific Horticulturae, Wye, 10:395-9, 1979.

- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H. & KOCHBA, M. Stimulation of root habituated ovular callus from the "Shamouti" orange (Citrus sinensis) as affected by tissue age and sucrose concentration. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, Leipzig, 73:415-21, 1974.
- KONAR, R.N. & OBEROI, Y.P. "In vitro" development of embryoids on the cotyledons of Thuja (Biota) orientalis. Phytomorphology, Delhi, 15:137-40, 1965.
- KOVIDER, M. & SKIRVIN, R.M. A method to culture immature embryos of Populus deltoides "in vitro". Canadian Journal of Forestry Research, Ottawa, 14:956-8, 1984.
- KROGSTRUP, P. Embryolike structures from cotyledons and rip embryos of Norway spruce (Picea abies). Canadian Journal Forestry Research, Ottawa, 16:664-8, 1986.
- LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. Plant Science Letters, Elsevier, 13:281-5, 1978.
- _____. "In vitro" propagation of Spirea bumalda and Prunus cistena from shoot apices. Canadian Journal Plant Science, Ottawa, 59:1025-9, 1979.

- LEE, S.K. & RAO, A.N. Tissue culture of certain tropical trees. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R. & CIFERRI, O. Plant cell cultures: results and perspectives. Elsevier, Biomedical Press, 1980. p.305-11.
- LIU, J.R.; SINK, K.C. & DENNIS JR., F.G. Adventive embryogenesis from leaf explants of apple seedlings. HortScience, Alexandria, 18(6):871-3, 1983.
- LOPES, J.L.C.; LOPES, J.N.C.; GILBERT, B. & BONINI, S.E. Osajaxanthone from Kielmeyera coriacea. Phytochemistry, London, 16(7):1101, 1977.
- MEHRA, P.N. & ANAND, M. Cytology of callus of Cruptomeria japonica. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 45:127-31, 1979.
- _____ & MEHRA, A. Organogenesis and plantlet formation "in vitro" in almond. Botanical Gazette, Chicago, 135:61-73, 1974.
- MINOCHA, S.C. Cell and tissue culture in the propagation of forest trees. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R. & CIFERRI, O. Plant cell cultures: results and perspectives. Elsevier, Biomedical Press, 1980. p.295-300.

MHATRE, M.; BAPAT, V.A. & RAO, P.S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (Morus indica L.). Plant Cell Reports, Berlin, 4(2):78-80, 1985.

MURALIDHARAN, E.M. & MASCARENHAS, A.F. "In vitro" plantlet formation by organogenesis in E. camaldulensis and by somatic embryogenesis in E. citriodora. Plant Cell Reports, Berlin, 6: 256-9, 1987.

MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. Botanical Bulletin of Academy Sinica, Shanghai, 18: 1-24, 1977.

_____. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 25:135-66, 1974.

_____; SHABDE, M.N.; HASEGAWA, P.M.; TAKATORI, F.H. & JONES, J.B. Propagation of Asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. Journal of American Society for Horticultural Science, New York, 97:158-61, 1972.

_____ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15:473-97, 1962.

- NAGMANI, R. & BONAGA, J.M. Embryogenesis in subcultured callus of Larix decidua. Canadian Journal Forestry Research, Ottawa, 15:1088-91, 1985.
- NISHI, T.; YAMADA, Y. & TAKAHASHI, E. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature, London, 219: 508-9, 1968.
- OKA, S.; YEUNG, E.C. & THORPE, A.T. Shoot formation in Eucalyptus globulus hypocotyl explants. New Zealand Journal of Forestry Science, New Zealand, 12(3):501-9, 1982.
- PAILY, J. & D'SOUZA, L. "In vitro" clonal propagation of Lagerstroemia flor-reginae Retz. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Berlin, Heidelberg, 6(1):41-5, 1986.
- PASQUAL, M. & ANDO, A. Micropropagação da laranja 'Valência' através da cultura de gemas axilares "in vitro". Pesquisa Agropecuária Brasileira, Rio de Janeiro, 24(6):723-6, 1989.
- PIERIK, R.L.M. "In vitro" culture of higher plants. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 345p.
- _____ & STEEGMANS, H.H.M. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of Rhododendron. Scientific Horticulture, Wye, 3:1-20, 1975.

- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M. & VAN DER MEYS, J. Plantlet formation in callus tissues of Anthurium andreanum. Scientific Horticulturae, Wye, 3:193-8, 1974.
- PILLAI, S.K. & HILDEBRANDT, A.C. Induced differentiation of Geranium plants from undifferentiated callus "in vitro". American Journal of Botany, Lancaster, 56:52-8, 1969.
- PIO CORREA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. Brasil, Imprensa Oficial, 1926. 747p.
- QUAK, F. Meristem culture and virus-free plants. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlim, Springer-Verlag, 1977. p.497-505.
- RADOJEVIC, L.; VUJICIC, R. & NESKOVIC, M. Embryogenesis in tissue culture of Corylus avellana. Zeitschrift fur Pflanzen - physiologie, Leipzig, 77:33-41, 1975.
- RAO, P.S. & OZIAS-AKINS, P. Plant regeneration through somatic embryogenesis in protoplast cultures of Sandalwood (Santalum album L.). Protoplasma, Leipzig, 124:80-6, 1985.
- RUTLEDGE, C.V. & DOUGLAS, G.C. Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar "in vitro". Physiologia Plantarum, Copenhagen, 72:367-73, 1988.

- SACHS, T. & THIMANN, K.V. Release of lateral buds from apical dominance. Nature, London, 201:939-40, 1964.
- SADDI, N. A new combination in Kielmeyera (Guttiferae). U. Kingdon, University of Reading, 1982. (Ph.D. Thesis).
- SAN JOSÉ, M.C. & VIEITZ, E. Morphogenesis in chestnut seedling explants cultivated "in vitro". Anales de Edagología y Agrobiología, Madrid, 43(3/4):587-97, 1984.
- SCHENK, R.V. & HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dycotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 50: 199-204, 1972.
- SHIPTON, W.A. & JACKES, B.R. Clonal propagation of Leptosper - mum spp. by tissue culture. Plant Cell Reports, Berlin, 5(1): 5-8, 1986.
- SIMOLA, L.K. Propagation of plantlets from leaf callus of Betu - la pendula f. purpurea. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 26(1):77-85, 1985.
- SITA, G.L. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledona ry cultures of Eucalyptus. Plant Science Letters, Elsevier, 14:63-8, 1979.

- SKISKANDARAJAH, Y. & MULLINS, R. Micropropagation of granny smith apple: factors affecting root formation "in vitro". Journal of Horticultural Science, London, 56(1):71-6, 1981.
- SKOOG, F. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. American Journal of Botany, Lancaster, 31:19-24, 1944.
- _____ & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "in vitro". Symposio for Society Experimental Biology, Cambridge, 11:118-31, 1957.
- SMITH, M.A.L. & McCOWN, B.H. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. Plant Science Letters, Elsevier, 28(2):149-56, Haia, 1983.
- SNIR, I. & EREZ, A. "In vitro" propagation of Malling Merton apple rootstocks. HortScience, Alexandria, 15(1):71-6, 1981.
- SOMMER, H.E.; BROWN, C.L. & KORMANIK, P.P. Differentiation of plantlets in long leag pine (Pinus palustris) tissue cultured "in vitro". Botanical Gazette, Chicago, 136:196-200, 1975.
- SOUZA, F.P. Tecnologia de produtos florestais. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1947. 409p.

STEWART, F.C. & MAPES, M.O. Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of Asparagus. Botanical Gazette, Chicago, 132:70-9, 1971.

_____ ; _____ & MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. American Journal of Botany, Lancaster, 45:705-8, 1958.

STRULLU, D.G.; GRELLIER, B.; MARCINIAK, D. & LETOUZÉ, R. Micro-propagation of chesnut and conditions of mycorrhizal synthesis "in vitro". The New Phytologist, Oxford, 102:95-101, 1986.

TEIXEIRA, S.L. Factors affecting rhizogenesis in stem cuttings. Riverside, University of California, 1981. 222p. (PhD Thesis).

THORPE, T.A. Physiology of bud induction in conifers "in vitro". In: HANOVER, J.W. & KEATHLEY, D.E. Genetic manipulation of woody plants. New York and London, Basic Life Sciences-Plenum Press, 1988. v.44, p.413-32.

_____ & PATEL, K.P. Clonal propagation adventitious buds. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando, Academic Press, 1984. v.1, p.49-60.

- TORREY, J.C. The role of vitamins and micronutrient elements in the nutrition of the apical meristem of pea roots. Plant Physiology, Washington, 29:279-87, 1954.
- TRIVERS, J.N.; STARBUCK, C.J. & NATARELLA, N.J. Effects of culture medium on "in vitro" rooting of antonovks 313 apple. HortScience, Alexandria, 20(6):1051-2, 1985.
- VENKETESWARAN, S. & GANDHI, V. Mass propagation and genetic improvement of forest trees for biomass production by tissue culture. Biomass, London, 2:5-15, 1981.
- VOGELMANN, T.C.; BORNMAN, C.H. & NISSEN, P. Uptake of benzyladenine in explants of Picea abies and Pinus sylvestris. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 61:513-7, 1984.
- VON ARNOLD, S. Factors influencing formation, development and rooting of adventitious shoots from embryo of Picea abies (L.) Karst. Plant Science Letters, Elsevier, 27:275-87, 1982.
- _____. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. Newletter, Leiden, 5:2-13, 1989.
- _____ & ERIKSSON, T. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious buds of Picea abies. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 3:257-65, 1984.

VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. Induction of adventitious buds on embryos of norway spruce grown "in vitro". Physiologia Plantarum, Copenhagen, 44:283-7, 1978.

_____ & _____. Initial stages in the course of adventitious bud formation on embryos of Picea abies. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 64:41-7, 1985.

_____ & GRÖNROOS, R. Meristematic zone formation and peroxidase activity during early stages of adventitious bud formation on embryos of Picea abies. Botanical Gazette, Chicago, 147:415-31, 1986.

_____ & HACKMAN, I. Regulation of somatic embryo development in Picea abies by abscisic acid (ABA). Journal of Plant Physiology, London, 132:614-9, 1988.

WANN, S.R.; JOHNSON, M.A.; NOLAND, T.L. & CARLSON, J.A. Biochemical differences between embryogenic and non-embryogenic cells of Picea abies (L.) Karst. Plant Cell Reports, Berlin, 6:39-42, 1987.

WERNER, J. & BOE, A. "In vitro" propagation of malling 7 apple rootstock. HortScience, Alexandria, 15(4):509-10, 1980.

WETMORE, R.H. & RIER, J.P. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. American Journal of Botany, Lancaster, 50:418-30, 1963.

WHITE, P.R. Controlled differentiation in a plant tissue culture. Bulletin Torrey Botanical Club, New York, 66:507-13, 1939.

_____. The influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedlings in liquid media. Plant Physiology, Washington, 7:613-8, 1932.

WINTON, L.L. Callus and cell cultures of douglas fir. Forest Science, Washington, 18:151-4, 1972.

_____. Shoot and tree production from aspen tissues tissues cultures. American Journal of Botany, Lancaster, 57:904-9, 1970.

WOLTER, K. & SKOOG, F. Nutritional requeriments of fraxinus cal_lus culture. American Journal of Botany, Lancaster, 53:263-9, 1966.

APÉNDICE

APÊNDICE 1 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de K. coriacea em diversas concentrações combinadas de reguladores de crescimento. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP	3	2,5209**
ANA	2	0,1499**
BAP x ANA	6	0,2717**
Resíduo	24	0,0139
Total	35	

** P < 0,01.

CV = 25,4%.

APÊNDICE 2 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de K. coriacea referente aos desdobramentos da interação entre os reguladores de crescimento. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP: ANA (0,0 mg/l)	3	0,8266**
BAP: ANA (0,1 mg/l)	3	1,2733**
BAP: ANA (1,0 mg/l)	3	0,9658**
Resíduo	24	0,0138
ANA: BAP (0,0 mg/l)	2	0,0000
ANA: BAP (0,1 mg/l)	2	0,2721**
ANA: BAP (1,0 mg/l)	2	0,0729*
ANA: BAP (4,0 mg/l)	2	0,6202**
Resíduo	24	0,0139

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 3 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0cm) de K. coriacea em diversas concentrações com binadas de reguladores de crescimento. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP	3	0,9080**
ANA	2	0,2943**
BAP x ANA	6	0,1545**
Resíduo	24	0,0075
Total	35	

** $P < 0,01$.

CV = 29,2%.

APÊNDICE 4 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0cm) de K. coriacea referente aos desdobramentos da interação entre os reguladores de crescimento. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP: ANA (0,0 mg/l)	3	0,8088**
BAP: ANA (0,1 mg/l)	3	0,3053**
BAP: ANA (1,0 mg/l)	3	0,1030**
Resíduo	24	0,0075
ANA: BAP (0,0 mg/l)	2	0,0000
ANA: BAP (0,1 mg/l)	2	0,7124**
ANA: BAP (1,0 mg/l)	2	0,0054
ANA: BAP (4,0 mg/l)	2	0,0400*
Resíduo	24	0,0075

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 5 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de K. coriacea com o uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina (BAP). ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP	5	1,7204**
Explante	1	0,088\$*
BAP x explante	5	0,4928**
Resíduo	24	0,0119
Total	35	

* $P < 0,05$.

CV = 17,8%.

** $P < 0,01$.

APENDICE 6 - Resumo da análise de variância para micropaga -
 ção (número total médio de brotações) de K. coriá-
 cea referente aos desdobramentos da interação en-
 tre explantes e benzilaminopurina. ESAL, Lavras/MG
 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP: segmento nodal	5	1,0324**
BAP: segmento apical	5	1,1807**
Resíduo	24	0,0119
Explante: BAP(0,0mg/1)	1	0,2522**
Explante: BAP(0,5mg/1)	1	0,0096
Explante: BAP(1,0mg/1)	1	0,5046**
Explante: BAP(2,0mg/1)	1	0,7491**
Explante: BAP(4,0mg/1)	1	1,0086**
Explante: BAP(8,0mg/1)	1	0,0280
Resíduo	24	0,0119

** p > 0,01.

APÊNDICE 7 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1cm) de K. coriacea com o uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina (BAP).
ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP	5	1,8086**
Explante	1	0,0028
BAP x explante	5	0,1370**
Resíduo	24	0,0174
Total	35	

* P < 0,05

CV = 16,3%.

** P < 0,01.

APÊNDICE 8 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0cm) de K. coriacea referente aos desdobramentos da interação entre explantes e benzilaminopurina. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP: segmento nodal	5	0,9558**
BAP: segmento apical	5	0,9898**
Resíduo	24	0,0174
Explante: BAP (0,0mg/l)	1	0,0864*
Explante: BAP (0,5mg/l)	1	0,0104
Explante: BAP (1,0mg/l)	1	0,5460**
Explante: BAP (2,0mg/l)	1	0,0451
Explante: BAP (4,0mg/l)	1	0,0000
Explante: BAP (8,0mg/l)	1	0,0000
Resíduo	24	0,0174

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$.

AFÊNDICE 9 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de K. coriacea com o uso de diferentes temperaturas e fotoperíodos. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Temperatura	3	1,4096**
Fotoperíodo	2	0,0278
Temp. x fotoperíodo	6	0,0600
Resíduo	24	0,0311
Total	35	

** P < 0,01.

CV = 12,9%.

APÊNDICE 10 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0cm) de K. coriacea com o uso de diferentes temperaturas e fotoperíodos. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Temperatura	3	2,0582**
Fotoperíodo	2	1,4818**
Temp. x fotoperíodo	6	0,2516**
Resíduo	24	0,0359
Total	35	

** P < 0,01.

CV = 12,0%.

APÊNDICE 11 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0cm) de K. coriacea referente aos desdobramentos da interação entre temperatura e fotoperíodo. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Fotoperíodo: 21°C	2	0,0304
Fotoperíodo: 24°C	2	0,6208**
Fotoperíodo: 27°C	2	1,4332**
Fotoperíodo: 30°C	2	0,1526*
Resíduo	24	0,0359
Temperatura: 16/8 hs	3	1,0546**
Temperatura: 12/12hs	3	0,7681**
Temperatura: 8/16hs	3	0,7387**
Resíduo	24	0,0359

* P < 0,05

** P < 0,01.

APÊNDICE 12 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de K. coriacea em diversas concentrações de sacarose e de sais no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Sacarose	4	1,0859**
Sais	2	0,3411**
Sacarose x sais	8	0,1926**
Resíduo	30	0,0237
Total	44	

** $P < 0,01$.

CV = 23,8%.

APÊNDICE 13 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de K.coriacea referente aos desdobramentos da interação entre concentrações de sacarose e sais. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Sacarose: sais (1/1)	4	0,4835**
Sacarose: sais (1/2)	4	0,7475**
Sacarose: sais (1/3)	4	0,2403**
Resíduo	30	0,0237
Sais: sacarose (15g)	2	0,0114
Sais: sacarose (30g)	2	0,1895**
Sais: sacarose (45g)	2	0,2384**
Sais: sacarose (60g)	2	0,6724**
Sais: sacarose (75g)	2	0,0000
Resíduo	30	0,0237

** P < 0,01.

APÊNDICE 14 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0cm) de K. coriacea em diversas concentrações de sacarose e sais no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Sacarose	4	1,0114**
Sais	2	0,3345**
Sacarose x sais	8	0,0667
Resíduo	30	0,0387
Total	44	

** $P < 0,01$.

CV = 45,4%.

APÊNDICE 15 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes primárias) de K. coriacea, com diferentes tamanhos e em concentrações variadas de ácido indolbutírico (IBA). ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
IBA	3	1,1752**
Tamanho da brotação	1	0,1803*
IBA x tam. da brotação	3	0,3034**
Resíduo	16	0,0402
Total	23	

* $P < 0,05$

CV = 17,6%.

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 16 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes primárias) de K. coriacea referente aos desdobramentos da interação entre tamanho da brotação e ácido indolbutírico (IBA). ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
IBA: tamanho (2,0cm)	3	0,4875**
IBA: tamanho (4,0cm)	3	0,9911**
Resíduo	16	0,0402
Tamanho: IBA (0,0mg/l)	1	0,1121
Tamanho: IBA (1,0mg/l)	1	0,7704**
Tamanho: IBA (2,0mg/l)	1	0,0171
Tamanho: IBA (4,0mg/l)	1	0,1908*
Resíduo	16	0,0402

* P < 0,05

** P < 0,01.

APÊNDICE 17 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (tamanho médio de raízes primárias) de K. coriacea, com diferentes tamanhos e em concentrações variadas de ácido indolbutírico (IBA). ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
IBA	3	0,8715*
Tamanho da brotação	1	4,5938**
IBA x tam. da brotação	3	3,6215**
Resíduo	16	0,1667
Total	23	

* $P < 0,05$

CV = 13,7%.

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 18 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (tamanho médio de raízes primárias) de K. coriacea referente aos desdobramentos da interação entre tamanho da brotação e ácido indolbutírico (IBA). ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
IBA: tamanho (2,0cm)	3	3,6875**
IBA: tamanho (4,0cm)	3	0,8056*
Resíduo	16	0,1667
Tamanho: IBA (0,0mg/l)	1	0,1042*
Tamanho: IBA (1,0mg/l)	1	0,0000
Tamanho: IBA (2,0mg/l)	1	5,0417**
Tamanho: IBA (4,0mg/l)	1	9,3750**
Resíduo	16	

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 19 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes secundárias) de K. coriacea, com diferentes tamanhos e em concentrações variadas de ácido indolbutírico (IBA). ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
IBA	3	0,3216*
Tamanho da brotação	1	0,2752
IBA x tam. da brotação	3	0,1758
Resíduo	16	0,0711
Total	23	

* $P < 0,05$.

CV = 12,8%.

APÊNDICE 20 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes primárias) de K. coriacea, em diversas concentrações dos sais e de ágar no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Ágar	3	1,5746**
Sais	2	2,1917**
Ágar x sais	6	0,2761**
Resíduo	24	0,0404
Total	35	

** P 0,01.

CV = 15,6%.

APÊNDICE 21 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes primárias) de K. coriacea, referente aos desdobramentos da interação entre as concentrações dos sais e de ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Ágar: sais (1/1)	3	1,3839**
Ágar: sais (1/3)	3	0,5925**
Ágar: sais (1/6)	3	0,1454*
Resíduo	24	0,0404
Sais: ágar (0,0g/1)	2	0,0000
Sais: ágar (3,0g/1)	2	0,7957**
Sais: ágar (6,0g/1)	2	1,0283**
Sais: ágar (9,0g/1)	2	1,1961**
Resíduo	24	0,0404

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 22 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (tamanho médio de raízes primárias) de K. coriacea, em diversas concentrações dos sais e de ágar no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Ágar	3	0,4989**
Sais	2	0,9400**
Ágar x sais	6	0,1583**
Resíduo	24	0,0169
Total	35	

** P < 0,01.

CV = 24,4%.

APÊNDICE 23 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (tamanho médio de raízes primárias) de K. coriacea, referente aos desdobramentos da interação entre as concentrações dos sais e de ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Ágar: sais (1/1)	3	0,5390**
Ágar: sais (1/3)	3	0,2431**
Ágar: sais (1/6)	3	0,0275
Resíduo	24	0,0169
Sais: ágar (0,0g/1)	2	0,0000
Sais: ágar (3,0g/1)	2	0,3079**
Sais: ágar (6,0g/1)	2	0,3369**
Sais: ágar (9,0g/1)	2	0,7702**
Resíduo	24	0,0169

** P < 0,01.

APÊNDICE 24 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes secundárias) de K. coriacea, em diversas concentrações dos sais e de ágar no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
Ágar	3	0,0837
Sais	2	0,03942**
Ágar x Sais	6	0,0513
Resíduo	24	0,0313
Total	35	

** P < 0,01.

CV = 18,9%.

APÊNDICE 25 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes primárias) de K. coriacea, em diferentes pH e níveis de ágar no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
pH	4	1,1296**
Ágar	3	5,9843**
pH x ágar	12	0,3655**
Resíduo	30	0,0799
Total	59	

** P < 0,01.

CV = 16,7%.

APÊNDICE 26 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes primárias) de K. coriacea, referente aos desdobramentos da interação entre o pH e os níveis de ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
pH: ágar (0,0mg/1)	4	0,0000
pH: ágar (3,0mg/1)	4	1,4518**
pH: ágar (6,0mg/1)	4	0,7348**
pH: ágar (9,0mg/1)	4	0,0397
Resíduo	30	0,0799
Ágar: pH (5,1)	3	0,3219*
Ágar: pH (5,4)	3	2,5147**
Ágar: pH (5,7)	3	2,5444**
Ágar: pH (6,0)	3	0,9674**
Ágar: pH (6,3)	3	1,0982**
Resíduo	30	0,0799

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 27 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (tamanho médio de raízes primárias) de K. coriacea em diferentes pH e níveis de ágar no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
pH	4	0,3481**
Ágar	3	2,4888**
pH x ágar	12	0,2199**
Resíduo	30	0,0248
Total	59	

** P < 0,01.

CV = 21,0%.

APÊNDICE 28 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (tamanho médio de raízes primárias) de K. coriacea, referente aos desdobramentos da interação entre o pH e os níveis de ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
pH: ágar (0,0mg/l)	4	0,0000
pH: ágar (3,0mg/l)	4	0,7346**
pH: ágar (6,0mg/l)	4	0,2573**
pH: ágar (9,0mg/l)	4	0,0159
Resíduo	30	0,0248
Ágar: pH (5,1)	3	0,4530**
Ágar: pH (5,4)	3	0,6326**
Ágar: pH (5,7)	3	1,1679**
Ágar: pH (6,0)	3	0,7451**
Ágar: pH (6,3)	3	0,3696**
Resíduo	30	0,0248

** P < 0,01.

APÊNDICE 29 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes secundárias) de K. coriacea, em diferentes pH e níveis de ágar no meio. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
pH	4	0,4278**
Ágar	3	0,8907**
pH x ágar	12	0,1738*
Resíduo	30	0,0653
Total	59	

* $P < 0,05$

CV = 18,2%.

** $P < 0,01$.

APÊNDICE 30 - Resumo da análise de variância para enraizamento de brotações "in vitro" (número médio de raízes secundárias) de K. coriacea, referente aos desdobramentos da interação entre o pH e os níveis de ágar. ESAL, Lavras/MG, 1990.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
pH: ágar (0,0mg/l)	4	0,0000
pH: ágar (3,0mg/l)	4	0,5116**
pH: ágar (6,0mg/l)	4	0,3656**
pH: ágar (9,0mg/l)	4	0,0721
Resíduo	30	0,0653
Ágar: pH (5,1)	3	0,0300
Ágar: pH (5,4)	3	0,8429**
Ágar: pH (5,7)	3	0,4043**
Ágar: pH (6,0)	3	0,1454
Ágar: pH (6,3)	3	0,1633
Resíduo	30	0,0653

** P < 0,01.