

ALINE MENEGUZZI

RESGATE VEGETATIVO E PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Persea willdenovii*
Kosterm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Florestal do Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa
Catarina, como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Marcio Carlos Navroski

LAGES, SC

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio
do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Meneguzzi, Aline
RESGATE VEGETATIVO E PROPAGAÇÃO in vitro DE
Persea willdenovii Kosterm. / Aline Meneguzzi. Lages,
2017.
83 p.

Orientador: Marcio Carlos Navroski
Co-orientador: Leo Rufato
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Florestal, Lages, 2017.

1. Propriedade medicinal. 2. espécie florestal. 3.
cultura de tecidos. 4. indução brotação. 5. galhos
podados. I. Navroski, Marcio Carlos. II. Rufato, Leo.
III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro
de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal.
IV. Título.

ALINE MENEGUZZI

RESGATE VEGETATIVO E PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Persea willdenovii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Banca Examinadora

Orientador: _____

Dr. Marcio Carlos Navroski

Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:

Dr. Claudimar Sidnei Fior

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Ezequiel Gasparin

Universidade Federal de Santa Maria

Lages, 17 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu marido José Luiz, que sempre me incentivou a ir em frente. Por vibrar com minhas vitórias e, principalmente, pela compreensão nos dias ruins. Gratidão pelo apoio e amor incondicional. Você é minha inspiração!

Ao meu mestre, também conhecido como “papi zueira”, Navroski, que através da confiança, amizade e dedicação não mediu esforços na contribuição deste trabalho, e de tantos outros executados neste período.

Aos meus pais, Nilson e Josélia, que sempre me incentivaram a ir à busca dos meus sonhos, e ao mesmo tempo, por serem meu porto seguro e alicerce. As minhas irmãs, Bruna e Fernanda, pela carinho, amizade e zelo em sempre me ver bem.

Ao grupo “Filhos do Navroski”, por estes 2 anos de trabalho e aprendizado. É uma gratificação ter participado da união, evolução pessoal e profissional de cada um.

Um agradecimento especial a Mari e aos colegas Pati, Dionéia, Bruno, Diego e Douglas pela ajuda no campo, apoio emocional e torcida pelo meu trabalho.

Ao professor Júlio, não só por conceder a área de pesquisa, mas por contribuir e apoiar este e tantos outros trabalhos de pesquisa em sua fazenda.

Ao professor Leo, co-orientador, pelas portas abertas do laboratório de Micropropagação Vegetal. E, claro, as meninas da micro... pela parceria desde fazer um meio de cultura até um fim de tarde na padaria.

Em especial, à Samila, pela parceria sem limites. Sou eternamente grata por toda a troca de saberes, ajuda e tempo dedicados as nossas mais variadas loucuras (dentro e fora) do laboratório. Você fez toda a diferença! Trabalhar na câmara de fluxo nunca mais será a mesma coisa!

A “panelinha do Coral II” por deixarem o condomínio mais leve e divertido. A Cleide, por ouvir meus desabafos e pelas cervejas de fim de tarde no bar.

As meninas do laboratório de Anatomia da Madeira, especial Dani e Helena, pela dedicação e paciência durante as análises.

Aos Professores Cristiano e Luciana, que na qualificação corrigiram e enriqueceram a discussão deste trabalho. A todos colegas, professores e técnicos administrativos da UDESC.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Enfim, à toda minha família e amigos que me incentivaram, alegraram e encobriram-me de carinho quando precisei.

Gratidão universo!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar método para o resgate de material vegetativo de plantas adultas de *P. willdenovii* e avaliar a propagação deste material, via cultura de tecidos. Foram utilizadas 20 árvores matrizes de *P. willdenovii* localizadas no município de Urupema/SC ($28^{\circ}17'38"S$; $49^{\circ}55'54"W$). No resgate vegetativo, foram testadas as seguintes técnicas: anelamento do tronco, semianelamento em 75% da circunferência do tronco, semianelamento em 50% e galhos podados. As coletas das brotações foram realizadas aos 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias após a aplicação dos tratamentos. As brotações foram utilizadas na técnica de cultivo *in vitro*. No estabelecimento testaram-se métodos de assepsia: 15 e 20 minutos de contato com hipoclorito de sódio (NaClO) (2% v/v⁻¹) e a presença/ausência do biocida PPM® (1,5mL L⁻¹) no meio de cultura. Para a multiplicação *in vitro*, foram testados meios de cultura (MS e WPM) e doses de BAP (0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹). Também, foi testada a indução de calogênese via explante foliar, nos tratamentos: posição de contato da face foliar com o meio de cultivo (abaxial e adaxial) e a combinação dos fitorreguladores BAP e ANA em diferentes concentrações (de 0 a 12 mg L⁻¹). Todas as técnicas de resgate de material vegetativo emitiram novos brotos, com destaque para o método via galhos podados que apresentou os melhores resultados para porcentagem de brotação, número e comprimento de brotos. No cultivo *in vitro*, a assepsia dos explantes com NaClO por 20 minutos e a adição do PPM® no meio resultou em menores índices de contaminação fúngica (50%), bacteriana (5%), oxidação (23%) e maior sobrevivência (76%) dos explantes. Na multiplicação *in vitro*, os explantes em meio MS tiveram maior oxidação (48%) e menor sobrevivência (52%) quando comparado ao meio WPM (26% e 74%, respectivamente). Para o número médio de brotos e de folhas, a concentração de 3 mg L⁻¹ BAP atingiu a máxima eficiência técnica (MET) (1,22 e 1,75 mg L⁻¹, respectivamente). Os segmentos foliares não foram responsivos na indução de calogênese após 120 dias de cultivo *in vitro*. Desta forma, indica-se para o resgate vegetativo de *P. willdenovii* o método de galhos podados. Enquanto que, para a propagação *in vitro*, recomenda-se o uso de NaClO (2% v/v⁻¹) durante 20 minutos e do biocida PPM® (1,5 ml L⁻¹) no meio de cultura na fase de estabelecimento e a utilização do meio WPM acrescido de 3 mg L⁻¹ de BAP na fase de multiplicação.

Palavras-chave: Propriedade medicinal; espécie florestal; cultura de tecidos; indução brotação; galho podados.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine method to the rescue of vegetative material of adult plants of *P. willdenovii* and evaluate the spread of this material, via tissue culture. The work was conducted with 20 *P. willdenovii* matrices located in Urupema / SC ($28^{\circ}17'38''S$, $49^{\circ}55'54''W$). In the vegetative rescue, the following techniques were tested: trunk annealing (100%), semianelation at 75% of the trunk circumference, semianelation at 50% trunk and the induction of shoots from pruned branches. The shoots were harvested at 90, 120, 150, 180, 210 and 240 days after application of the treatments. Sprouts were used in the *in vitro* culture technique. In the establishment of shoots, asepsis methods were tested: 15 and 20 minutes of contact with sodium hypochlorite (NaClO) (2% v v⁻¹) and the presence / absence of the PPM® biocide (1,5mL L⁻¹) in the culture medium. For *in vitro* multiplication, two culture media (MS and WPM) and BAP concentration (0, 2, 4 and 6 mg L⁻¹) were tested. Also, the induction of callogenesis by foliar explant was tested in the treatments: position of contact of the foliar face with the culture medium (up and down) and the combination of the BAP and ANA phytoregulators in different concentrations (0 to 12 mg L⁻¹). All vegetative material rescue techniques emitted new shoots, with emphasis on the pruned branches method, which presented the best results for sprouting percentage, number and length of shoots. *In vitro* culture, asepsis of explants with NaClO for 20 minutes and addition of PPM® in the medium resulted in lower rates of fungal (50%), bacterial (5%), oxidation (23%) and higher survival (76%) of the explants. *In vitro* multiplication, explants in MS medium had higher oxidation (48%) and lower survival (52%) when compared to WPM medium (26% and 74%, respectively). For the average number of shoots and leaves, the concentration of 3 mg L⁻¹ BAP reached the highest technical efficiency (MET) (1.22 and 1.75 mg L⁻¹, respectively). Foliar segments were not responsive in inducing callogenesis after 120 days of *in vitro* culture. In this way, it is indicated for the vegetative rescue of *P. willdenovii* the method of pruned branches. While for *in vitro* propagation, the use of NaClO (2% v v⁻¹) for 20 minutes and the PPM® biocide (1.5 ml L⁻¹) in the culture medium is recommended in the establishment phase and The use of WPM medium plus 3 mg L⁻¹ of BAP in the multiplication phase.

Keywords: Medicinal property; Forest species; fabric culture; Sprouting induction; Branches pruned.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Indivíduo adulto da espécie <i>Persea willdenovii</i>	20
Figura 2 - Características das folhas (a) e do tronco (b) de <i>Persea willdenovii</i>	21
Figura 3 - Mapa do estado de Santa Catarina com a localização do município de Urupema, destacado em vermelho.....	33
Figura 4 - Temperaturas e pluviosidades médias mensais para o município de Urupema/SC ao longo de um ano.....	34
Figura 5 - Anelamento no tronco de árvores de <i>P. willdenovii</i> com o auxilio de um facão (a) a aproximadamente 30 cm acima do solo, com largura média de 2cm, sem danificar o lenho (b).	35
Figura 6 - (a) Galhos podados de <i>P. willdenovii</i> com as extremidades protegidas e (b) acomodados em estufim do Viveiro Florestal da UDESC/CAV.....	36
Figura 7 - Número médio de brotos em árvores/galhos de <i>P. willdenovii</i> por coletas (dias após a aplicação da técnica) submetidas aos tratamentos de resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados.	39
Figura 8 - Brotações aos 180 dias após o anelamento em árvores de <i>P. willdenovii</i> submetidas a técnicas de anelamento 100% (a) e semianelamento 75% (b).	40
Figura 9 - Árvores de <i>P. willdenovii</i> em processo de cicatrização após 240 dias da aplicação de anelamento e semianelamento para fins de resgate vegetativo.....	41
Figura 10 - Porcentagem de árvores/galhos de <i>P. willdenovii</i> com brotações submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).	42
Figura 11 - Brotações em galhos podados de <i>P. willdenovii</i> aos 90 (a), 120 (b), 150 (c), 180 (d), 210 (e) e 240 (f) dias da técnica de resgate vegetativo (novembro/15 a abril/16).	43
Figura 12 - Comprimento médio dos brotos (cm) emitidos em árvores/galhos de <i>P. willdenovii</i> submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).	45
Figura 13 - Brotações de <i>P. willdenovii</i> utilizadas no estabelecimento <i>in vitro</i> (a) e câmara de fluxo laminar (b), no qual foi realizada a desinfestação e manipulação do material.	51
Figura 14 - Explante de <i>P. willdenovii</i> utilizados para a etapa de multiplicação <i>in vitro</i>	53
Figura 15 - Explantes foliares de <i>P. willdenovii</i> utilizados para a indução de calos.....	54
Figura 16 - Contaminações em explantes de <i>P. willdenovii</i> oriundos do material de resgate vegetativo.	56
Figura 17 - Porcentagem de contaminação por fungo em explantes de <i>P. willdenovii</i> sob a presença/ausência do biocida PPM® (1,5 ml L ⁻¹) no meio de cultura MS 50%. ..	57
Figura 18 - Porcentagem de contaminação bacteriana, oxidação e sobrevivência dos explantes de <i>P. willdenovii</i> sob o tempo de imersão em NaOCl (20 e 15 minutos) no estabelecimento <i>in vitro</i>	58
Figura 19 - Explantes de <i>P. willdenovii</i> oxidados (a) e cultivo de meio de cultura com carvão ativado (b).	60
Figura 20 - Número médio de brotações e de folhas novas em explantes de <i>P. willdenovii</i> cultivados <i>in vitro</i> sobre as doses de 0, 2, 4 e 6 mg L ⁻¹ de BAP.....	62
Figura 21 - Explantes foliares de <i>P. willdenovii</i> oxidados após 120 dias em meio de cultivo para indução de calogênese.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das árvores de <i>P. willdenovii</i> submetidas aos tratamentos de resgate vegetativo com seus respectivos valores de porcentagem de anelamento aplicado na circunferência do tronco; coordenadas geográficas; altitude (m); altura (m); diâmetro à altura do peito (DAP) (cm) e quantidade de luz incidente na base do tronco (lux).....	37
Tabela 2 – Número médios de brotos em árvores/galhos de <i>P. willdenovii</i> submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).....	40
Tabela 3 – Porcentagem de brotação em árvores/galhos de <i>P. willdenovii</i> submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).....	44
Tabela 4 – Comprimento médios de brotos em árvores/galhos de <i>P. willdenovii</i> submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica)	45
Tabela 5 - Posição da face foliar e concentrações de BAP e ANA testados em meio de cultura MS na indução de calogênese de <i>P. willdenovii</i>	55
Tabela 6 - Oxidação, sobrevivência e brotação (%) de explantes de <i>P. willdenovii</i> cultivados em meio de cultura WPM e MS.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	A ESPÉCIE <i>Persea willdenovii</i>	19
2.2	RESGATE VEGETATIVO	22
2.2.1	Indução de brotações epicórmicas por anelamento e semianelamento	24
2.2.2	Indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados	24
2.3	PROPAGAÇÃO VEGETATIVA.....	25
2.3.1	Cultura de tecidos.....	26
3	PARTE I – RESGATE VEGETATIVO EM PLANTAS ADULTAS DE <i>P. willdenovii</i>	31
3.1	RESUMO	31
3.2	INTRODUÇÃO	31
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.3.1	Caracterização da área de coleta	33
3.3.2	Resgate vegetativo	34
3.3.3	Análise dos dados	36
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.5	CONCLUSÃO.....	47
4	PARTE 2 – PROPAGAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>P. willdenovii</i>	49
4.1	RESUMO	49
4.2	INTRODUÇÃO.....	50
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	51
4.3.2	Multiplicação <i>in vitro</i>	53
4.3.3	Indução de calos	54
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

4.4.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	56
4.4.2	Multiplicação <i>in vitro</i>	60
4.4.3	Indução de calos	63
4.5	CONCLUSÃO.....	65
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
7	APÊNDICES	81

1 INTRODUÇÃO GERAL

A silvicultura clonal brasileira é centrada basicamente em espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, porém as pressões da sociedade contra os plantios destas espécies, aliada a procura por serviços e produtos diferenciados a base de espécies florestais nativas, em especial para a recuperação de áreas degradadas, reflorestamento, arborização, fins madeireiros, cosméticos e farmacêuticos, tem despertado o interesse de viveiristas pela produção de mudas de espécies nativas.

Porém, a floração irregular, a baixa produção de sementes e o desconhecimento de métodos eficientes de superação de dormência, o crescimento lento associado ao conhecimento limitado da ecologia e biologia reprodutiva de espécies nativas, resultam em um número reduzido de programas de conservação, conduzido a uma insuficiente disponibilidade de mudas de espécies nativas no mercado. Assim, há necessidade de desenvolvimento de pesquisas e técnicas que aperfeiçoem a produção de mudas destas espécies com custos reduzidos e com qualidade morfofisiológica capaz de atender a demanda (WENDLING et al., 2009). Com isto, as técnicas de propagação vegetativa apresentam-se como alternativa, pois além de aumentar a produção de mudas, têm a vantagem de conservação das características da planta matriz.

Estudos existentes sobre a propagação vegetativa abrangem uma quantidade pequena de espécies arbóreas nativas, principalmente se for levada em consideração a diversidade de composição arbórea da Floresta Ombrófila Mista (FOM), a qual contém espécies florestais madeireiras importantes para a economia do Brasil (HATSCHBACH; ZILLER, 1995). Dentre elas, algumas estão na lista de espécies ameaçadas de extinção, devido aos impactos relacionados à sua exploração aliado as características ecofisiológicas da espécie. Boa parte das espécies madeireiras da FOM apresenta dificuldade de regeneração natural (SILVA et al., 2015).

Persea willdenovii, comumente conhecida como pau-de-andrade, é uma espécie arbórea nativa da FOM, com importância comercial para diversos fins como paisagístico, madeireiro e especialmente medicinal. A casca desta espécie é usada para a elaboração de técnicas caseiras de preparos fitoterápicos, apesar dos estudos farmacêuticos terem iniciado, e comprovado, recentemente os efeitos positivos como cicatrizante de feridas e gastroprotetor (SOMENSI, 2015).

Com o destaque na medicina popular, o pau-de-andrade foi explorado intensamente nos últimos anos, resultando na mortalidade dos indivíduos em seu habitat natural devido a retirada da casca sem critérios/estudos de manejo. Consequentemente, devido a este fator exploratório

e outros, como problemas relacionados a propagação, *P. willdenovii* atualmente está presente na lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção no estado de Minas Gerais, em perigo de extinção no estado de São Paulo (BIODIVERSITAS, 2010) e criticamente em perigo na lista vermelha da flora do estado do Rio Grande do Sul (CONSEMA-RS, 2014).

Trabalhos conduzidos sobre aspectos de propagação de *P. willdenovii*, como por Fior et al. (2007), descrevem as dificuldades no desenvolvimento e multiplicação dos propágulos desta espécie, como calogênese e oxidação dos propágulos. Um dos fatores de maior importância na propagação vegetativa é a identificação dos indivíduos, órgãos e/ou tecidos que apresentam potencial para o sucesso da técnica. Geralmente, para espécies arbóreas, é necessário o rejuvenescimento, ou resgate vegetativo, dos propágulos a serem submetidos ao método de propagação vegetativa, pois o processo de maturação em plantas lenhosas afeta diretamente a capacidade de totipotência das células vegetais do material utilizado (ANDRADE, 2010).

O corte raso é uma das técnicas de resgate mais utilizada na área florestal, devido principalmente ao grau de revigoramento e ao grande número de brotações que surgem ao longo da cepa remanescente, porém, outras técnicas, como anelamento de galhos podados, podem ser utilizadas nos casos em que o corte raso não é viável, como nas árvores em que há chance de mortalidade do indivíduo (PEREIRA, 2014) ou de espécies ameaçadas de extinção, como por exemplo pau-de-andrade.

Com relação as técnicas de propagação vegetativa testadas para *P. willdenovii*, a cultura de tecidos mostrou-se a mais promissora (FIOR et al., 2007), porém ainda não há um protocolo de propagação ajustado. A elucidação e utilização da propagação *in vitro* poderá conduzir uma via sustentável dos recursos genéticos vegetais, contribuindo para a conservação e uso medicinal, além de permitir a produção constante de mudas com controle de qualidade sanitária e fisiológica, que poderão ser utilizadas em plantios de enriquecimento da espécie, contribuindo no combate a extinção.

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar métodos de resgate vegetativo e protocolos de propagação *in vitro* em *P. willdenovii*, visando a conservação de germoplasma e a propagação de indivíduos dessa espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ESPÉCIE *Persea willdenovii* Kosterm.

Persea willdenovii Kosterm. pertence ao gênero *Persea* Mill. da família das Lauraceae. Segmentos vegetais oriundos das espécies, dessa família botânica, são comumente utilizados na culinária e na medicina popular, sendo encontradas principalmente em países de clima tropical. Lauraceae são conhecidas por produzirem óleo essencial, amplamente explorado, armazenado em células secretoras que podem ser encontradas na folha, na casca e no lenho (BARROS et al., 1997). Na medicina popular apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções no combate de diversas doenças, entretanto, o uso fitoterápico das plantas deve ser feito com critério, estando aptas a serem utilizadas aquelas que apresentam eficiência terapêutica e toxicológica comprovada (MARTINS; SANTOS, 1995).

No Brasil, a família Lauraceae é representada por 24 gêneros e 434 espécies (REFLORA, 2016), em sua maior parte, habitando as florestas pluviais, restingas e cerrados. Em inventários florísticos e fitossociológicos realizados em áreas de florestas preservadas da porção sudeste-sul do país, esta família vem sendo apontada como uma das mais representativas, tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons, o que corrobora com a hipótese de que esta região seja um dos principais centros de diversidade das Lauraceae (QUINET; ANDREATA, 2002).

O gênero *Persea* é conhecido pelo uso medicinal, havendo relatos de sua utilização no combate a problemas renais, também utilizado como diurético e até calmante, através de chás feitos com suas folhas (BARBOSA et al., 1988; BORGES et al., 1986). Apesar disto, o estudo das aplicações das espécies nativas do gênero *Persea* e, até mesmo condições de identificações taxonômicas, ainda requerem esclarecimentos (FIOR et al., 2007). Knopp et al. (1996) fizeram uma revisão deste gênero, no continente americano, no qual reconheceram dois subgêneros e 81 espécies. Além desse estudo, Pereira-Ferrer (2012) também fez uma revisão sobre o aporte de conhecimentos taxonômicos do gênero *Persea* na Venezuela, porém no Brasil ainda há falta de estudos sobre a identificação dessas espécies.

P. willdenovii pode ser encontrada naturalmente nos Biomas Cerrado e Mata Atlântica, desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, principalmente nas formações de altitude (QUINET; ANDREATA, 2002).

Os limites altimétricos das formações da Floresta Ombrófila Mista no Sul do Brasil determinam sua classificação em Aluvial, Submontana, Montana e Altomontana. Segundo IBGE (1992), a formação Altomontana inclui tipologias que ocorrem acima de 1.000 m de

altitude. A Floresta Ombrófila Mista Altomontana tem distribuição em pequenos núcleos nos pontos mais altos da Serra Geral Catarinense. Cerca de 10% das espécies Altomontanas, são endêmicas e restritas a estas regiões, com distribuição bastante reduzida, em decorrência da raridade geográfica, e de fatores como pequeno tamanho populacional, ausência ou redução de polinizadores e/ou dispersores e competição, associados aos impactos antropogênicos, os quais podem tornar várias espécies suscetíveis à extinção (FALKENBERG, 2003).

Dentre as famílias botânicas predominantes nessa formação florestal está Lauraceae (REITZ; KLEIN, 1978). Martins-Ramos et al. (2010), ao estudar a florística de Floresta Ombrófila Mista Altomontana e de Campos em Urupema/SC, registraram três espécies de Lauraceae: *Cinnamomum amoenum*, *Ocotea pulchella* e *Persea willdenovii*.

Persea willdenovii, anteriormente denominada *P. pyrifolia* Nees e Mart. ex Nees, conhecida popularmente como abacateiro do mato, maçaranduba, canela rosa ou pau-de-andrade, é uma espécie arbórea, perenifólia, heliófita, classificada ecologicamente como secundária tardia (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990), podendo atingir até 28 metros de altura e 70 cm de diâmetro (Figura 1).

Figura 1 – Indivíduo adulto da espécie *Persea willdenovii*.



Gerson L. Lopes

Fonte: Herbário Online Gerson Luiz Lopes

A espécie apresenta folhas simples, alternadas, espiraladas, membranácea, com tricomas ou pelos, com comprimento de 10 a 22 cm e largura de 4 a 12 cm, com lâmina obovada, ápice agudo a obtuso. O tronco é cilíndrico, com casca externa ou ritidoma marron-clara-acinzentada, com escamas grossas e a casca interna de cor rósea (CARVALHO, 2006) (Figura 2).

Figura 2 - Características das folhas (a) e do tronco (b) de *Persea willdenovii*



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

P. willdenovii é utilizada na arborização e ornamentação de praças, além disso sua madeira é empregada na construção civil, marcenaria e confecções de móveis (BATISTA et al., 2010) e as cascas como fonte medicinal popular. Segundo uma pesquisa feita por Mazza et al. (2000), a população utiliza as cascas desta espécie em chás para o tratamento de úlcera gástrica e como cicatrizante de feridas.

Estudos farmacêuticos e fitoquímicos descreveram a presença de estruturas de lignanas-furofurânicas nas folhas (Batista et al., 2010) e, na casca, uma quantidade elevada de caráter mucilaginoso, que está relacionada, entre outros efeitos terapêuticos, à sua ação protetora em mucosas inflamadas (COSTA, 2001). Segundo Somensi (2015), a casca da árvore de *P. willdenovii* teve efeito positivo como gastroprotetor e cicatrizante gástrico em úlceras gástricas em experimentos com camundongos.

O período de frutificação dessa espécie é bastante restrito, em média três meses, segundo Silva e Perelló (2010). No estado do Rio Grande do Sul, foi observado florescimento nos meses de outubro a novembro e a frutificação entre janeiro e março. As sementes são recalcitrantes

(em torno de 50% de grau de umidade inicial) e, portanto, devem ser semeadas de imediato (sem secagem) após coleta (DAVIDE et al., 2003).

De acordo com Hong et al. (1996), dentro da família Lauraceae ocorrem várias espécies com sementes recalcitrantes. Segundo Chin (1989), sementes recalcitrantes permanecem com alta umidade após serem liberadas da planta mãe, variando entre 30% e 70%. Segundo Berjak et al. (1984), as espécies com sementes recalcitrantes parecem ter origem a partir de locais mais úmidos e, portanto, adequados ao processo germinativo continuamente. Nos estágios finais da sucessão florestal, ocorre uma maior retenção de umidade pelo ambiente, o que é marcante nos sub-bosques de vegetações tropicais no estado clímax.

Além disto, há evidências de dormência morfológicas e/ou fisiológicas das sementes (DAVIDE et al., 2003; CARVALHO et al., 2009; FIOR et al., 2007). Davide et al (2003) constataram que a germinação das sementes de *P. pyrifolia* (atual *P. willdenovii*) ocorreu apenas com a umidade inicial (48%) armazenadas a 5°C, não tolerando secagem e beneficiamento logo após coleta. Os autores explicam que a temperatura baixa do ambiente de armazenamento pode ter proporcionado a superação de algum tipo de dormência.

Outro fator relacionado as sementes de *P. willdenovii*, relatado por Fior et al (2007), foi a predação por insetos, no qual 30% do lote apresentou infestação por larvas da família Curculionidae. A irregularidade de maturação e a predação podem comprometer a qualidade das sementes e, consequentemente, o potencial de armazenamento.

A impossibilidade de conservação por longo prazo de sementes e a sazonalidade de produção podem tornar esta espécie mais vulnerável a ações antrópicas e, consequentemente, mais suscetíveis ao processo de extinção (BIOATIVAS, 2007).

A propagação vegetativa desta espécie também apresenta entraves a serem solucionados. Fior et al (2007) testaram as técnicas de enxertia via garfagem em fenda cheia, estaquia de ramos (com fitorregulador AIB) e também experimentos visando a propagação vegetativa *in vitro* a partir de tecidos juvenis e não-juvenis. Dentre as técnicas estudadas, os autores atribuíram que a propagação *in vitro* via tecidos juvenis (organogênese múltipla de sementes germinadas *in vitro*) foi a mais promissora, ainda com algumas limitações.

2.2 RESGATE VEGETATIVO

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), muitos são os fatores que influenciam no sucesso da utilização dos métodos de propagação assexuada, dentre estes, se destaca a qualidade da planta fornecedora do material vegetal. Poucas espécies são facilmente propagadas

utilizando propágulos maduros, principalmente tratando-se de espécies lenhosas. Essa dificuldade está diretamente ligada ao processo de maturação, sendo necessário rejuvenescer as matrizes antes de iniciar qualquer trabalho de propagação.

O rejuvenescimento dos propágulos exerce grande influência nos processos de propagação vegetativa, pois com o aumento na idade da planta ocorre redução nas taxas de divisão celular e capacidade regenerativa (WANG; ANDERSEN, 1989). Possivelmente, este fato esteja relacionado com a avançada idade ontogenética da planta, com o aumento no teor de inibidores e com a diminuição de cofatores de enraizamento e multiplicação, à medida que aumenta a idade da planta (FACHINELLO et al., 2005).

O primeiro passo após a seleção de árvores superiores é a obtenção de brotações fisiologicamente e ontogeneticamente juvenis (ALFENAS et al., 2004).

Em algumas plantas, especialmente lenhosas, há um gradiente de juvenilidade em direção à base da árvore (ZOBEL e TALBERT, 1984; ELDRIDGE et al., 1994), o que promove um aumento da maturação em função da maior proximidade com o meristema apical (GREENWOOD; HUTCHISON, 1993).

Segundo Hartmann et al. (2011), a maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato de que os meristemas mais próximos da base formaram-se em épocas mais próximas à germinação que o das regiões terminais. Algumas características, que estão associadas com a juvenilidade, são mantidas nas porções basais de plantas maduras de muitas espécies (HACKETT, 1987a).

A obtenção de propágulos de brotações surgidas na base da planta, chamadas de brotações epicórmicas, pode ser feita por injúrias mecânicas nas raízes, anelamento na base do caule, poda drástica a poucos centímetros do colo, aplicação de substâncias reguladoras de crescimento, entre outras. Barceló-Munoz et al. (1999) utilizaram como alternativa ao menor grau de maturação dos propágulos, o corte na base da planta adulta de *Persea americana*, com o objetivo de emitir brotações com características juvenis.

Atualmente, o corte raso da árvore, buscando a indução de brotações basais, é o método mais utilizado por empresas florestais (ALFENAS et al., 2004). Porém, essa técnica não é recomendada para espécies nativas, especialmente aquelas ameaçadas de extinção, no qual o corte raso é proibido por legislação.

2.2.1 Indução de brotações epicórmicas por anelamento e semianelamento

A técnica de resgate por anelamento torna-se fundamental para espécies que não produzem brotações quando são decepadas e/ou quando o corte raso não for permitido. Esta prática foi aplicada para vários estudos em espécies florestais como: *Pinus pinaster* (ALONSO et al., 2002); *Eucalyptus grandis* (RIBEIRO et al., 1992); *Ilex paraguariensis* (SANTIN et al., 2008); *Eucalyptus cloeziana* (ALMEIDA et al., 2007), *Tectona grandis* (ANDRADE, 2010); *Anadenanthera macrocarpa* (DIAS, 2011), *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (PEREIRA, 2014), entre outras.

O uso das brotações epicórmicas é uma alternativa potencial para o resgate de material adulto, estudada desde os anos 70. Esta técnica favorece o desenvolvimento e crescimento das brotações de gemas dormentes, as quais são geneticamente igual a planta matriz, mas com características juvenis, que pode permitir melhores respostas aos métodos de propagação vegetativa, sem a necessidade de corte raso dos indivíduos (CHAPERON; QUILLET, 1977).

O anelamento e semianelamento com finalidade de rejuvenescimento são consideradas técnicas simples e eficazes, pois consistem basicamente na retirada de um anel de casca do caule ou galhos (SANTIN et al., 2008). Na prática, em plantas de *Eucalyptus*, faz-se a incisão de cerca de 1-2 cm de espessura em torno da circunferência do caule e, na base da árvore, a cerca de 10-15 cm de altura em relação ao solo. O anelamento é feito a uma profundidade suficiente, para que não danifique o lenho, e, após aproximadamente 20 dias, é possível observar a emissão de brotações, e aos 45-50 dias, pode-se coletar estas brotações (ALFENAS et al., 2004).

Segundo Zimmermann (1974), o anelamento aumenta a concentração de substâncias promotoras de brotações como as citocininas. Após a retirada do anel de casca ocorre uma redução da concentração de auxina, uma vez que seu transporte via floema é interrompido, causando uma quebra no balanço auxina/citocinina, favorável à emissão de brotações. Esta mudança abrupta de concentração de auxina e citocinina podem causar o alongamento das gemas dormentes abaixo do anelamento.

2.2.2 Indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados

Outra técnica alternativa que pode ser aplicada sem depredação dos indivíduos é a indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados. Este método é realizado através da coleta de galhos ou ramos, os quais são colocados em condições ambientais adequadas para a emissão das brotações (XAVIER; SANTOS, 2002). A eficiência de brotações epicórmicas a

partir de galhos podados foi avaliada e comprovada por Rosa et al. (2003) em *I. paraguariensis*, Wendling et al. (2009) para *Araucaria angustifolia* e por Almeida et al. (2007) com *Eucalyptus cloeziana*.

A indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados deve ser utilizada de forma criteriosa, uma vez que usa tecidos que, devido à sua posição na árvore, podem estar fisiologicamente maduros, comprometendo a juvenilidade do material (ALMEIDA et al., 2007). Portanto, é importante a coleta de ramos das porções mais baixas da planta, pois estas tendem a originar brotações juvenis (ALFENAS, 2004).

O princípio fisiológico do método, assim como no anelamento do caule, é baseado na alteração do equilíbrio entre reguladores de crescimento (auxina/citocinina) em favorecimento da emissão de brotações. Na maioria das árvores de angiospermas, as gemas epicórmicas dormentes estão presentes na casca externa. Estas gemas podem estar dormentes, desde a formação dos galhos ou troncos, ou podem ser produto de uma morfogênese, quando ocorre uma transformação nas células do filogênio para dar origem ao novo broto (RAST et al., 1988).

2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação vegetativa consiste em multiplicar assexuadamente partes de plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), originando indivíduos idênticos à planta matriz (WENDLING, 2002). Este processo, que ocorre por meio da divisão e diferenciação celular, é baseado no princípio da totipotência das células vegetais, que é a capacidade genética de regeneração de plantas a partir de qualquer órgão vegetal (HARTMANN et al., 2011).

Na área florestal, a propagação vegetativa é utilizada, em sua maioria, para a multiplicação de matrizes com genótipos de qualidade e/ou produtividade superiores, além para aquelas que apresentam dificuldades para a aplicação de programas de métodos sexuais de melhoramento e/ou que produzem sementes de baixo poder germinativo e/ou sementes recalcitrantes (difícil armazenamento) (FERREIRA, 1997), como é o caso de *P. willdenovii*.

Porém, segundo Wendling (2002), a técnica também possui as seguintes desvantagens: risco de estreitamento da base genética dos plantios clonais, quando da utilização de pequeno número de clones; ausência de ganhos genéticos adicionais a partir da primeira geração de seleção; dificuldade de enraizamento em algumas espécies ou clones e; dificuldade de ocorrência de enraizamento em plantas não juvenis. Ainda segundo este mesmo autor, o grau de sucesso obtido na propagação vegetativa é influenciado por uma interação de fatores externos e internos inerentes, presentes nas células das plantas, bem como de substâncias

translocáveis produzidas nas folhas e gemas, sendo tais variações ainda pouco esclarecidas em espécies lenhosas.

2.3.1 *Cultura de tecidos*

A técnica da cultura de tecidos consiste em cultivar plantas ou partes de plantas, como órgãos completos, tecidos ou células *in vitro* via multiplicação assexuada. Este método se baseia na teoria da totipotência das células vegetais, segundo a qual os seres multicelulares possuem, em cada uma de suas células, toda a informação genética necessária para a formação de um indivíduo completo. Por meio da cultura de tecidos, as plantas são cultivadas em condições de laboratório, contendo meio nutritivo específico, sob condições assépticas e ambiente controlado (RIBEIRO; BASTOS, 2008).

O cultivo de tecidos vem sendo utilizado de diferentes formas para a propagação de plantas. De maneira geral, a técnica é requerida em determinada etapa dos programas de melhoramento, oferecendo novas alternativas e, muitas vezes, soluções únicas para a propagação vegetativa (FERREIRA et al., 1998).

Dentre as várias técnicas de cultura de tecidos destacam-se a micropropagação, a embriogênese somática, a polinização *in vitro*, a cultura de protoplastos, a microenxertia e a cultura de embriões e de calos. No entanto, na área florestal, a micropropagação ou propagação *in vitro*, tem sido a técnica mais difundida (XAVIER, et al., 2009).

2.3.1.1 *Propagação in vitro*

A propagação *in vitro* ou micropropagação, é uma das aplicações mais práticas da cultura de tecidos, considerada uma técnica promissora para a clonagem massal de genótipos superiores (STEINER et al., 2008), bem como para conservação *ex situ* de germoplasma de espécies em risco de extinção (JOHNSON et al., 2012; MA et al., 2012).

Na micropropagação, a produção de mudas é realizada em cultivo asséptico e condições controladas de nutrientes, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. A aplicação desta técnica vem tornando-se comum no mercado, visando suprir à demanda de mudas sadias e livres de patógenos, em qualquer época do ano, em tempo e espaço físico reduzido, com alta fidelidade genética, maior produtividade, uniformidade e desempenho no campo (SCHUCH; ERIG, 2005).

Vários fatores podem influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plantas *in vitro*, como a orientação dos explantes, as condições do ambiente de cultivo e o meio de cultura

utilizado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os meios de cultura fornecem às plantas substâncias para seu crescimento e desenvolvimento. O mesmo é suplementado com compostos orgânicos e minerais para suprir as necessidades energética, metabólica e estrutural das células da planta (REIS et al., 2008). Os componentes do meio são água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, inositol, fitorreguladores e ágar (CALDAS et al., 1998).

Dentre os meios de cultura mais empregados na cultura de tecidos vegetais estão o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o “Woody Plant Medium” - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981). O meio WPM, em razão da sua menor concentração de nitrogênio e potássio e, menor força iônica total, permite bons resultados em espécies lenhosas (AMARAL, 2006). Além da composição do meio de cultura, suas diluições têm sido estudadas em diversas fases da micropopulação (SOUZA et al., 2003). A concentração de sais pode ser adequada a cada espécie, com a redução da concentração iônica, favorecendo, muitas vezes, a micropopulação.

A micropopulação se divide em quatro principais etapas ou estágios de desenvolvimento: seleção, desinfestação e estabelecimento *in vitro* dos explantes; a multiplicação e o alongamento das brotações; o enraizamento e, por fim, a transferência das plantas obtidas para condição *ex vitro* ou também conhecida como a fase de aclimatização. Na primeira etapa de estabelecimento de uma cultura *in vitro*, a escolha do explante apropriado e o nível de diferenciação do tecido são os aspectos mais importantes a se considerar (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os explantes podem ser gemas axilares, ápices caulinares e radiculares, segmentos nodais, meristemas e tecidos diferenciados (FACHINELLO; BIANCHI, 2005). O estabelecimento *in vitro* de espécies florestais apresenta algumas limitações, devido a suas características peculiares, podendo apresentar oxidação dos explantes e contaminação endógena e exógena (SATO et al., 2001).

O etanol e os compostos à base de cloro (halogênios) são as substâncias com ação germicida mais utilizadas no processo de desinfestação (COUTO, et al.; 2004). O hipoclorito de sódio (NaClO) ou de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) apresentam grande eficiência na desinfestação, eliminando fungos e bactérias. Da mesma maneira, a utilização de fungicidas e bactericidas podem promover adequada assepsia. A concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição a esses compostos pode variar de acordo com a espécie (MONTARROYOS, 2000), sendo necessário, portanto, a sua seleção de acordo com a eficiência e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado.

Além desses fatores, na iniciação de culturas lenhosas, é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento, especialmente as auxinas que, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem à

síntese desses compostos, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000). A oxidação fenólica pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, pois algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies (Bassan et al., 2006). A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado. Explantes jovens, em geral, oxidam menos que os mais velhos (TEIXEIRA, 2005). A oxidação fenólica pode ser minimizada pela redução de danos mecânicos e químicos no explantes, pela modificação do ambiente e pelo uso de antioxidantes, como o carvão ativado (MONACO et al., 1977).

Segundo González-Olmedo et al (2005), a etapa de multiplicação consiste em promover a proliferação de brotos, aumentar o número de gemas nos explantes e promover, se necessário, o alongamento dos brotos. Já a etapa de enraizamento promove a indução e o desenvolvimento de raízes. A composição e a concentração de fitorreguladores no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As citocininas e auxinas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na multiplicação e enraizamento *in vitro*.

De uma maneira geral, segundo Fior et al. (2007), a técnica de cultivo *in vitro* com tecidos juvenis apresenta grandes desafios para *P. willdenovii*, dentre eles estão: aparecimento de contaminação de origem endógena; necrose e clorose de folhas *in vitro*; percentual de enraizamento insatisfatório; perda de plantas na aclimatização e diferenças no potencial morfogênico entre plântulas de diferentes sementes, mas com origem na mesma planta matriz. Além disto, a utilização de tecidos não juvenis não obteve sucesso devido à ocorrência de contaminação endógena e de oxidação fenólica, além do baixo potencial morfogênico dos explantes.

2.3.1.2 Cultura de calos

A propagação por meio de cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta, esta última, por meio da formação de calos, é considerada uma forma potencial de propagação em massa (LANDA et al., 2000). A cultura de calos também pode ser utilizada para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000).

O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante. O tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogenético dependem, sobretudo, do explante, do meio de cultura e de fitoreguladores. Também podem diferir em textura, consistência e coloração. Alguns calos são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e de difícil manipulação (FLORES et al., 2006).

Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo (PIERIK, 1990).

Diversas espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de indução de calos utilizando reguladores vegetais (LAMEIRA et al., 1994). Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. A produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, mas a adição de citocinina pode aumentar a proliferação do mesmo (TISSEURAT, 1985).

O crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e realizar estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular (PIERIK, 1990). O crescimento de calos permite, em alguns casos, o desenvolvimento de culturas de células que acumulam compostos em níveis mais elevados do que a planta da qual se originaram (REBOUÇAS; ALMEIDA, 2009).

3 PARTE I – RESGATE VEGETATIVO EM PLANTAS ADULTAS DE *Persea willdenovii*

3.1 RESUMO

P. willdenovii é uma espécie de difícil propagação, de modo que os fatores que afetam este processo devem ser considerados e otimizados para o sucesso da técnica de multiplicação dos indivíduos. Entre estes fatores está a idade ontogenética da planta matriz, que pode influenciar negativamente, necessitando de revigoramento prévio para que se obtenham resultados satisfatórios. O objetivo deste trabalho foi determinar o melhor método para o resgate de material vegetativo de plantas adultas de *P. willdenovii* para fins de propagação vegetativa. O trabalho foi conduzido em com 20 árvores matrizes situadas no município de Urupema/SC (28°17'38"S; 49°55'54"W). Os tratamentos aplicados foram: anelamento em 100% do tronco ; semianelamento em 75% da circunferência do tronco, semianelamento em 50% da circunferência do tronco e indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados. As avaliações/coletas das brotações foram realizadas aos 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias após a aplicação dos tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x6 (quatro técnicas de resgate e seis coletas). As variáveis avaliadas foram número e comprimento dos brotos e porcentagem de brotação. Houve interação significativa para todas as variáveis avaliadas. Os galhos podados foi a técnica que obteve maior número e comprimento de brotos aos 150 dias (12,2 e 14,6cm, respectivamente). A porcentagem de brotação também foi superior para a técnica de galhos podados, seguido do anelamento e do semianelamento 75 e 50%. Todas as técnicas de resgate vegetativo de *P. willdenovii* foram satisfatórias na produção de brotos com destaque para a técnica de brotação via galhos podados.

Palavras-chave: Rejuvenescimento; galhos podados; anelamento do tronco; espécie arbórea.

3.2 INTRODUÇÃO

Persea willdenovii Kosterm. pertencente à família das Lauraceae, sendo conhecida pela sua diversidade de usos na arborização urbana, construção civil e principalmente por possuir propriedades medicinais na casca, como cicatrizante e gastroprotetora (SOMENSI, 2015), no qual levou a uma intensa exploração popular. A mortalidade dos indivíduos, devido a retirada da casca para preparos fitoterápicos, e os problemas relacionados a propagação da espécie,

levaram-na a diversas listas de espécies ameaçadas de extinção e criticamente em perigo de extinção, como na “Lista Vermelha da Flora do Estado do Rio Grande do Sul” (CNCFlora, 2016).

Adicionalmente, a espécie apresenta irregularidade na maturação dos frutos (CARVALHO et al., 2006) e as sementes são recalcitrantes com indícios de dormência fisiológica, podendo comprometer a qualidade das sementes e o potencial de armazenamento. Com isto, esta espécie torna-se ainda mais vulnerável a ações antrópicas e suscetível ao processo de extinção.

A propagação vegetativa de espécies que produzem sementes de baixo poder germinativo, como é o caso de *P. willdenovii*, pode assegurar a preservação da diversidade vegetal, além de multiplicar indivíduos com características desejáveis para fins comerciais (FIOR et al., 2007).

Fior et al. (2007) descreveram algumas limitações sobre aspectos de propagação de *Persea willdenovii*, principalmente relacionadas a restrição do potencial morfogênico, presença de contaminação de origem endógena e o alto índice de oxidação dos tecidos. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), diversos fatores influenciam no sucesso da utilização dos métodos de propagação, dentre estes se destaca, especialmente, a qualidade da planta fornecedora do material vegetal.

Uma das primeiras etapas na silvicultura clonal é a seleção e o resgate de material de árvores matrizes, pois poucas espécies são facilmente propagadas vegetativamente utilizando propágulos maduros, especialmente as espécies arbóreas. Essa dificuldade está diretamente ligada ao processo de maturação, pois com o aumento na idade da planta ocorre redução nas taxas de divisão celular e capacidade regenerativa (WANG; ANDERSEN, 1989), sendo necessário rejuvenescer as matrizes antes de iniciar qualquer trabalho de propagação. Além disto, há aumento no teor de inibidores e diminuição de cofatores de enraizamento e multiplicação à medida que aumenta a idade da planta (FACHINELLO et al., 2005).

Assim, técnicas de resgate vegetativo, como anelamento e galhos podados são fundamentais para o rejuvenescimento de brotações em espécies em que o corte raso não é viável e permitido, como é o caso de *P. willdenovii*. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar métodos para o resgate de material vegetativo de plantas adultas de *Persea willdenovii*.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Caracterização da área de coleta

O experimento foi conduzido em árvores matrizes localizadas em área experimental no município de Urupema/SC ($28^{\circ}17'38"S$; $49^{\circ}55'54"W$), situado na Serra Catarinense a 1.350 metros de altitude (Figura 3).

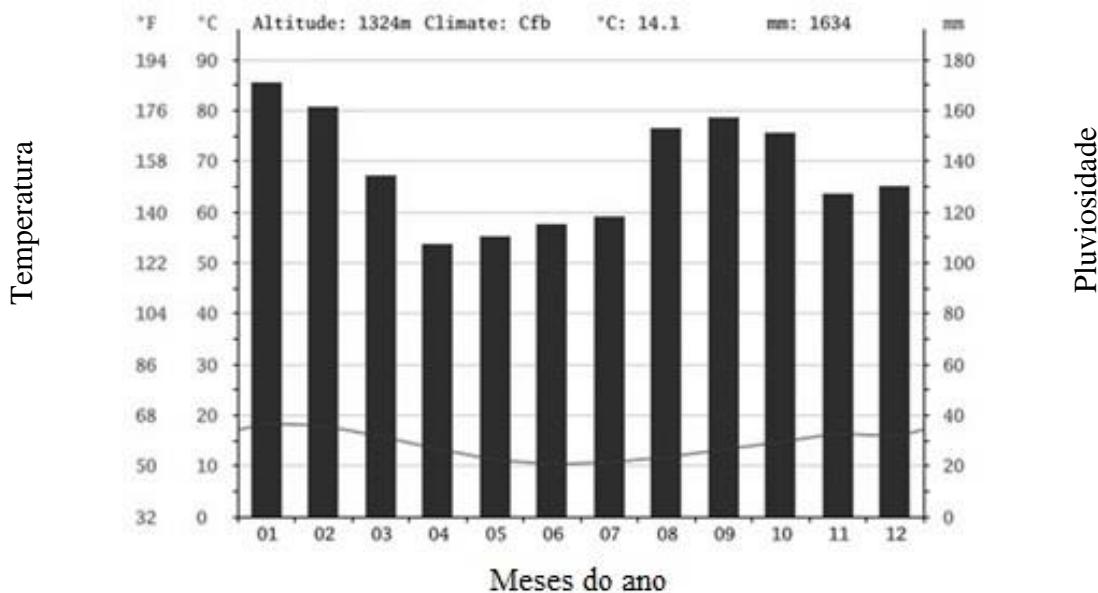
Figura 3 - Mapa do estado de Santa Catarina com a localização do município de Urupema, destacado em vermelho.



Fonte: Wikipédia.

Segundo a classificação de Koppen (1948), o clima da região é temperado úmido (*Cfb*) com chuvas bem distribuídas durante o ano, apresentando precipitação média anual de 1.650 mm (Figura 4). Caracteriza-se por apresentar inverno e verão brandos, sendo que a temperatura média anual é de 14 °C. Em janeiro, mês mais quente, a temperatura média é de 18°C, e julho, mês mais frio, a média é de 8°C, podendo chegar até -14°C com possibilidade de neve (EMBRAPA, 1998).

Figura 4 - Temperaturas e pluviosidades médias mensais para o município de Urupema/SC ao longo de um ano.



Fonte: climate-data.org

O relevo é composto pelas unidades Planalto de Lages, Planícies Fluviais e Serra Geral, com solos do tipo Cambissolo Álico, Litólico Álico, Litólico Distrófico e Terra Bruna Estruturada. A região pertence a Floresta Ombrófila Mista Altomontana (acima 1.000 metros de altitude), caracterizada pela presença de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze como espécie emergente, formando agrupamentos em associação com outras espécies, em diferentes estágios sucessionais, constituindo três estratos bem definidos, arbóreo superior, arbóreo inferior e arbustivo-herbáceo (MARTINS et al., 2011).

3.3.2 Resgate vegetativo de árvores matrizes

Foram utilizadas 20 árvores matrizes de *P. willdenovii* para o resgate vegetativo. A escolha destas árvores foi realizada pela disponibilidade de indivíduos facilmente identificados no local.

No campo, as árvores foram identificadas, marcadas e realizadas leituras das coordenadas geográficas e altitude da localização de cada indivíduo. Também, foram feitas as seguintes medições: altura (m), com o auxílio de um clinômetro e hipsômetro eletrônico Haflof HEC-2; diâmetro na altura do peito (DAP) (cm), com uma suta manual; e a intensidade

luminosa (Lux) na base do tronco das árvores, às 10 horas da manhã, do mês de Janeiro, com um luxímetro digital portátil.

O resgate vegetativo foi realizado em agosto de 2015, final do repouso vegetativo das árvores. Os tratamentos foram: (i) anelamento em 100% da circunferência do tronco; (ii) semianelamento em 75% da circunferência do tronco; (iii) semianelamento em 50% da circunferência do tronco e (iv) poda e coletada de galhos para a indução de brotações epicórmicas. Para cada tratamento de resgate vegetativo foram utilizadas de cinco à sete árvores matrizes, escolhidas aleatoriamente.

O anelamento e o semianelamento foram feitos por meio do seccionamento de duas linhas transversais no tronco de cada árvore com o auxílio de um facão (Figura 5a), cortando-se somente a espessura da casca. Os anelamentos constituíram-se na retirada de um anel de casca em torno do tronco (aproximadamente, 2 cm de largura) a uma altura de, aproximadamente, 30 cm do solo, até o rompimento da casca, sem danificar o lenho (Figura 5b).

Figura 5 - Anelamento no tronco de árvores de *P. willdenovii* com o auxilio de um facão (a) a aproximadamente 30 cm acima do solo, com largura média de 2cm, sem danificar o lenho (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Para o teste de indução de brotações epicórmicas, foram retirados galhos, aleatoriamente de cinco árvores matrizes, na posição mais baixa da copa, e próxima do tronco, para minimizar os efeitos da maturação e idade ontogenética. Estes galhos foram transportados para o Viveiro Florestal da Universidade do Estado de Santa Catarina – (UDESC/CAV), município de

Lages/SC. Em seguida, os galhos foram seccionados em um tamanho de, aproximadamente, um metro de comprimento (Figura 6a).

As extremidades dos materiais foram protegidas com saco plástico, para evitar perda de água, e acomodados no interior de um estufim, sob uma casa de sombra (Figura 6b), a qual apresentava umidade relativa próxima de 80% e temperatura de aproximadamente 25 °C.

Figura 6 - (a) Galhos podados de *P. willdenovii* com as extremidades protegidas e (b) acomodados em estufim do Viveiro Florestal da UDESC/CAV.



3.3.3 Variáveis avaliadas e análise dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x6 (quatro técnicas de resgate e seis coletas sucessivas). As avaliações/coletas das brotações foram realizadas a partir do primeiro sinal de brotação e, aos 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias (de dezembro/2015 a abril/2016) após a aplicação dos tratamentos de resgate vegetativo. Em cada coleta, as brotações eram cortadas na altura da primeira gema e quantificado o número e comprimento (cm) das brotações, calculado-se a porcentagem de árvores brotadas por tratamento. Para a técnica de galhos podados, o número de brotos foi padronizado em relação ao comprimento dos galhos (número de brotos por metro⁻¹).

Os dados das árvores matrizas, diâmetro à altura do peito (DAP), altura total e quantidade de luz incidente na base do tronco, e as variáveis de brotações avaliadas (no período de maior emissão de brotos, aos 120 dias) foram analisadas pela correlação de Pearson. Os dados foram submetidos a análise de variância e, quando significativos, submetidos ao teste F. As médias das variáveis dos métodos de resgate vegetativo foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, e o tempo (datas das coletas) pela análise de regressão. A análise estatística foi realizada no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) e os gráficos elaborados pelo programa Microsoft Excel.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas variações nas características dendrométricas (altura e DAP) das árvores matrizes e da intensidade de luz na região onde foi realizado o anelamento (Tabela 1). A altura das matrizes variou entre 4,5 metros (árvore 5) a 13,2 metros (árvore 14) e o DAP entre 5,7 cm (árvore 5) a 42 cm (árvore 12).

Com relação a intensidade luminosa na base do tronco, pode-se verificar que as matrizes 5 e 15 apresentaram maior taxa de lux (8500 e 7030, respectivamente), portanto maior incidência de raios solares. Já as árvores 1, 2, 12 e 17 apresentaram menores taxas de lux (70, 20, 30 e 60, respectivamente) no horário de coleta dos dados.

Tabela 1 - Relação das árvores de *P. willdenovii* submetidas aos tratamentos de resgate vegetativo com seus respectivos valores de porcentagem de anelamento aplicado na circunferência do tronco; coordenadas geográficas; altitude (m); altura (m); diâmetro à altura do peito (DAP) (cm) e quantidade de luz incidente na base do tronco (lux).

Planta Matriz	Anelamento aplicado (%)	Altura (m)	DAP (cm)	Quantidade de luz (lux)
0	100	7.9	24.8	230
1	50	12.3	40.7	70
2	75	13.1	32.8	20
3	100	6.7	16.5	300
4	50	6.6	20.5	250
5	100	4.5	5.7	8500
6	50	4.7	18	250
7	75	7.8	18.5	300
8	100	6.4	20	360
9	100	9.3	28.5	2800
10	75	9.5	23.7	1900
11	50	7.5	24.5	100
12	75	12	29	30
13	50	11.5	42	810
14	75	13.2	31.4	900
15	100	6.8	20.5	7030
16	50	7.1	39	200
17	75	8.4	28.5	60
18	50	11.6	40	1700
19	75	8.8	26.6	160

Não foi observada correlação entre as variáveis DAP, altura da planta, luz incidente na base do tronco e a quantidade de brotações obtidas nas árvores submetidas aos métodos de resgate na época de maior porcentagem de brotos (janeiro de 2016) (Apêndice A).

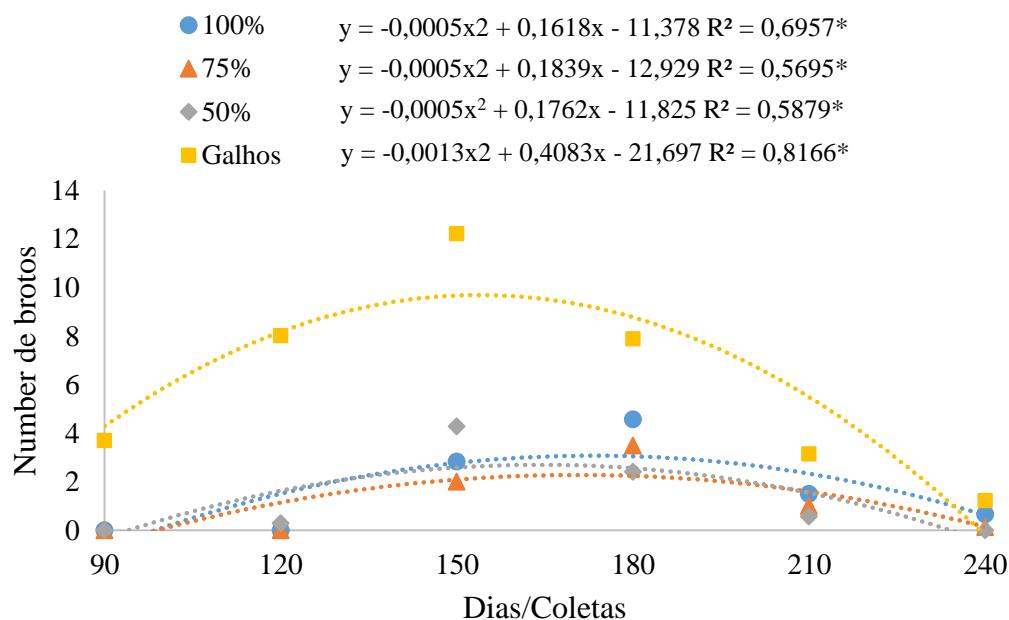
Corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, Pereira (2014) também não observou correlação do DAP com o número de brotos emitidos através das técnicas de resgate vegetativo para *Toona ciliata*. Em contrapartida, Pinto et al. (2013), estudando *Pterogyne nitens*, observou correlação positiva, sendo que o aumento de diâmetro da planta resultou em maior quantidade de brotações, além de maior vigor. O mesmo ocorreu na rebrookta de árvores de *Aniba rosaeodora*, na qual foi possível observar correlação significativa do DAP das árvores e o número de brotos, constatando que árvores com maior DAP apresentaram maior capacidade de emitir brotações (SAMPALIO et al., 2007). Poucos são os dados de literatura disponíveis para tentar compreender a influência do grau de maturação no crescimento em diâmetro e altura das plantas (WENDLING; XAVIER, 2001) e, consequentemente, na produção de brotações.

Alguns fatores podem ser preponderantes sobre a capacidade de rebrookta e sobrevivência de cepas de espécies arbóreas, entre eles destaca-se a idade, os níveis de substâncias de reserva na planta, o efeito das variações climáticas verificadas ao longo do ano e as características genéticas da espécie (SAKAI; SAKAI, 1998; LUOGA et al., 2004; TEWARI et al., 2004). Além disso, em regiões de clima temperado, a rebrookta de espécies florestais pode ser consideravelmente dependente de substâncias de reserva, como os carboidratos presentes nas raízes da planta. Esta dependência, normalmente está atrelada à flutuação estacional da reserva de carboidratos nas raízes (SAKAI; SAKAI, 1998).

Houve interação entre os métodos de resgate vegetativo e as datas de coletas das brotações (dias após a aplicação da técnica) para todas as variáveis avaliadas ($p<0,05$).

A máxima eficiência técnica (MET) para o número de brotos foi observado aos 157 dias para a técnica de galhos podados, aos 162 dias para o tratamento anelamento 100%, e aos 184 e 176 dias para os semianelamentos 75% e 50%.

Figura 7 - Número médio de brotos em árvores/galhos de *P. willdenovii* por coletas (dias após a aplicação da técnica) submetidas aos tratamentos de resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016. * Significativo a 5% de probabilidade de erro.

Durante as três primeiras coletas o método de galhos podados foi superior para o número médio de brotos quando comparado as demais técnicas aplicadas ($p<0,05$). Somente na coleta aos 180 dias, o número de brotos emitidos no tratamento de semianelamento 75% não diferiu daqueles emitidos pelos galhos podados (4,6 e 7,9 respectivamente). As duas últimas coletas não houve diferença significativa entre os tratamentos. No geral, no campo (anelamento e semianelamentos), as coletas aos 150 e 180 dias foram as de maior número de brotos (Figura 8), sendo que antes ou depois destas datas a quantidade de material vegetal coletado foi menor.

Os dias/coletas aos 150 e 180 dias correspondem aos meses de janeiro e fevereiro. Estes foram os meses com históricos de maiores temperaturas na região e sem déficit hídrico, o que pode ter contribuído na maior quantidade de emissão de novos brotos. Segundo Souza et al. (1991), a umidade do solo é um dos principais fatores envolvidos na capacidade de rebrota de cepas, uma vez que depende de índices pluviométricos adequados à reposição e reserva de água no solo.

Tabela 2 – Número médios de brotos em árvores/galhos de *P. willdenovii* submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).

Técnica de Resgate	Número de Brotos						Dias/Coleta					
	90	120	150	180	210	240	90	120	150	180	210	240
Anelamento 100%	0.0	b	0.0	b	2.8	b	3.5	b	1.5	a	0.7	a
Semianelamento 75%	0.0	b	0.0	b	2.0	b	4.6	ab	1.0	a	0.0	a
Semianelamento 50%	0.0	b	0.3	b	4.3	b	2.4	b	0.6	a	0.1	a
Galhos podados	3.7	a	8.0	a	12.2	a	7.9	a	3.2	a	1.2	a*

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

Figura 8 - Brotações aos 180 dias após o anelamento em árvores de *P. willdenovii* submetidas a técnicas de anelamento 100% (a) e semianelamento 75% (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Além das condições ambientais, o maior número de brotos nas coletas de janeiro e fevereiro pode ser explicado pela possibilidade destes brotos serem originados de gemas que permaneceram dormentes após a aplicação dos tratamentos e não geraram brotações após a primeira coleta ou ainda, serem produto de uma morfogênese, quando ocorre uma transformação de células do câmbio ao longo do tempo (RAST et al., 1988).

Na quinta e sexta coleta no campo, realizadas em março e abril/2016, houve diminuição na produção de brotações, provavelmente, pela redução metabólica e fisiológica das plantas devido ao decréscimo na temperatura média e, principalmente, amplitude térmica nestes meses.

Outro fator que pode ser responsável pela redução no número de brotações nestas coletas foi à cicatrização da parte anelada como resposta à aplicação do anelamento e semianelamento (Figura 9).

Figura 9 - Árvores de *P. willdenovii* em processo de cicatrização após 240 dias da aplicação de anelamento e semianelamento para fins de resgate vegetativo.

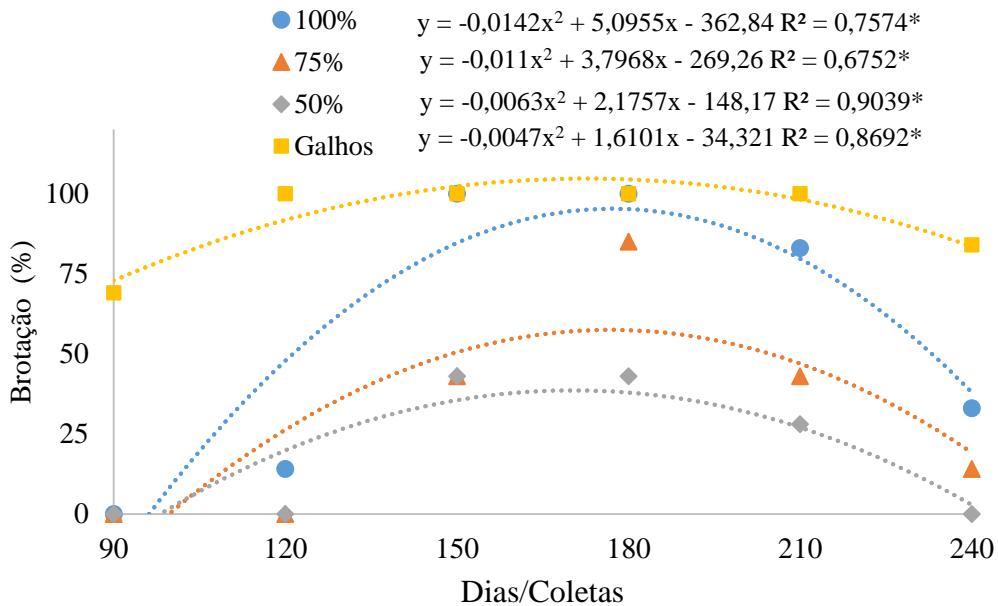


Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

O efeito da cicatrização foi observado em trabalho com *Eucalyptus cloeziana*, em que a cicatrização do local anelado foi intensa, em resposta à aplicação do anelamento em árvores de 5 e 10 anos de idade (ALMEIDA et al., 2007) e, também, observado para *Toona ciliata*, na qual a grande espessura da casca verificada na linha do anel (entre 10 a 40 cm de DAP), pode ter interferido no ritmo de emissão dos brotos em algumas árvores (PEREIRA, 2014). Segundo Dias et al. (2015), a competição por água, nutrientes, espaço e luz entre as brotações no decorrer do tempo também pode estar relacionada a esta redução.

Com relação a porcentagem de árvore/galho podados, aos 90 dias (novembro de 2015) após aplicação dos tratamentos, a poda de galhos foi a única metodologia que apresentou brotações (69%), sendo que os métodos de anelamentos a campo, nas árvores matrizes, ainda não tinham apresentado brotações (Figura 10). Esta técnica emitiu brotações em 100% dos galhos nas coletas de 120 (Figura 11b), 150 (Figura 11c), 180 (Figura 11d) e 210 dias (Figura 11e), sendo que somente aos 240 dias houve diminuição das brotações (84%) (Figura 11f).

Figura 100 - Porcentagem de árvores/galhos de *P. willdenovii* com brotações submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016. * Significativo à 5% de probabilidade de erro.

O resgate por galhos podados também mostrou ser uma técnica eficiente na indução de brotações epicórmicas de árvores de *Eucalyptus cloeziana*, uma vez que todos os galhos podados emitiram brotações após 40 dias de acondicionamento em casa de vegetação (ALMEIDA et al., 2007). O acondicionamento em casa de vegetação, ou similar, cria um microclima favorável para a sobrevivência e emissão de brotos em galhos podados.

O estufim do viveiro, local onde ficaram dispostos os galhos neste trabalho, possuía sistema de microaspersão que mantém a umidade relativa superior a 80% e a temperatura entre 20 e 30 °C, o que pode ter favorecido o surgimento das brotações precoces (aos 90 dias).

Figura 111 - Brotações em galhos podados de *P. widdenovii* aos 90 (a), 120 (b), 150 (c), 180 (d), 210 (e) e 240 (f) dias da técnica de resgate vegetativo (novembro/15 a abril/16).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Observou-se que, após 210 dias da aplicação dos tratamentos, a emissão de brotações foi reduzida, o que pode estar associado à exaustão das reservas nos ramos (Tabela 3). O mesmo comportamento foi observado em ramos destacados para indução de brotações de *Araucaria angustifolia*, no qual com o decorrer do tempo também houve diminuição na emissão de novos brotos (Wendling et al. 2009).

Já no campo, a porcentagem de árvores com brotações seguiu a mesma tendência do número de brotos, sendo que houve 100% de árvores brotadas nas coletas aos 150 e 180 dias no tratamento de anelamento, no qual não diferiu do tratamento dos galhos podados ($p<0,05$). A técnica de semianelamento em 50% do tronco foi a de menor porcentagem de

brotações/árvore em todas as coletas, não diferindo do semianelamento de 75% aos 210 e 240 dias (Tabela 3).

Tabela 3 – Porcentagem de brotação em árvores/galhos de *P. willdenovii* submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).

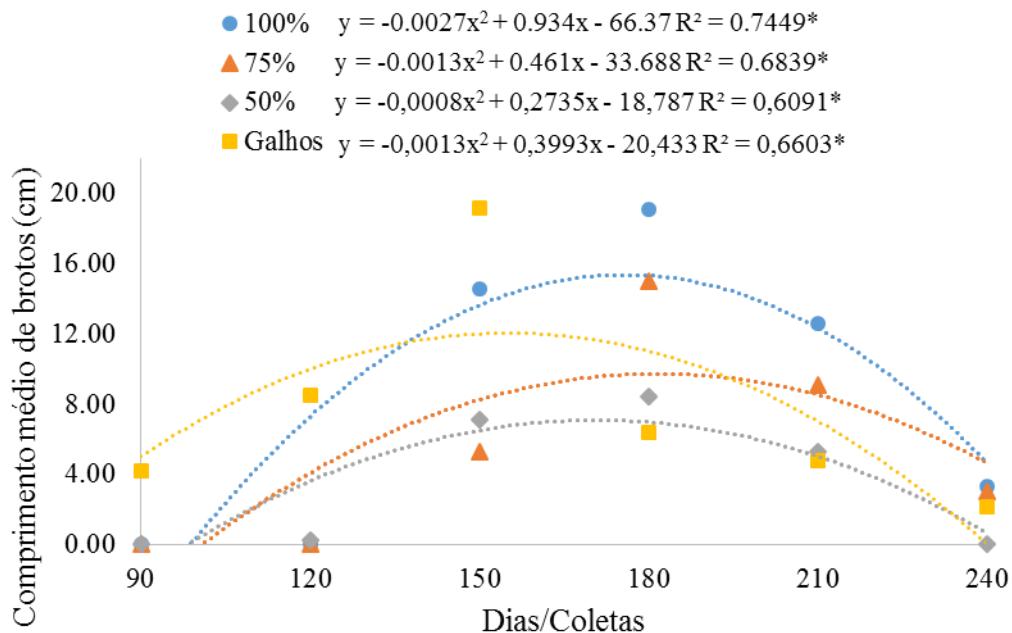
Técnica de Resgate	Brotação (%)					
	Dias/Coleta					
	90	120	150	180	210	240
Anelamento 100%	0.0 b	14.0 b	100.0 a	100.0 a	83.0 a	33.0 b
Semianelamento 75%	0.0 b	0.0 b	43.0 b	86.0 a	43.0 b	14.0 b
Semianelamento 50%	0.0 b	0.0 b	43.0 b	43.0 b	29.0 b	0.0 b
Galhos podados	69.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	85.0 a

A capacidade de brotação depende da espécie, da idade da árvore, das condições ambientais e da época do ano em que o corte é efetuado (CREMER et al., 1990). Fisiologicamente, a emissão das brotações basais pode ser explicada devido a ruptura total ou parcial da dominância apical aumentando a relação citocinina/auxina (HARTMANN et al., 2011). Outro fator, que pode ter induzido a emissão de novas brotações, é o estresse pelo anelamento, originando distúrbios funcionais nas árvores, as quais brotaram como estratégia de sobrevivência. Nas plantas, o estresse acontece pela interrupção do transporte de fotoassimilados e outros metabólicos orgânicos das partes mais altas para as mais baixas na planta, o qual é executado por elementos e células crivadas, situados no floema (TAIZ e ZEIGER, 2004). Com o uso das técnicas de decepa e de anelamento do caule também se conseguiu induzir a emissão de brotações basais nas árvores de *Tectona grandis* (BADILLA et al., 2016).

Ainda, fatores físicos como luminosidade, a espessura e a profundidade do corte (ALFENAS et al., 2004) também podem influenciar na emissão das brotações. Segundo Pereira (2014), em *T. ciliata*, o número de brotos emitidos pela técnica de anelamento (100%) foi quatro vezes superior em relação ao semianelamento (50%) (PEREIRA, 2014). Neste trabalho, também pode-se observar que o porcentagem de anelamento no tronco da árvore (100%, 75% ou 50% da circunferência) influencia na formação das novas brotações.

Para o comprimento dos brotos, a MET de todos os tratamentos foram atingidas em períodos bem próximos: aos 172, 179, 173 e 173 dias para as técnicas de galhos podados, anelamentos e semianelamentos 75 e 50% (Figura 12).

Figura 12 - Comprimento médio dos brotos (cm) emitidos em árvores/galhos de *P. willdenovii* submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016. *: Significativo à 5% de probabilidade de erro.

Com relação a técnica de resgate, os maiores comprimentos médios das brotações foram observados para a técnica de galhos podados nas coletas aos 90, 120 e 150 dias (4,2, 8,5 e 19,2 cm de altura, respectivamente), esta última coleta não diferiu do anelamento 100% ($p<0,05$) que teve comprimento médio de 14,5 cm (Tabela 4).

Tabela 4 – Comprimento médios de brotos em árvores/galhos de *P. willdenovii* submetidas ao resgate vegetativo (anelamento 100%, semianelamento 75%, semianelamento 50% e galhos podados) em função das coletas (dias após a aplicação da técnica).

Técnica de Resgate	Comprimento de brotos (cm)											
	Dias/Coleta											
	90	120	150	180	210	240						
Anelamento 100%	0.0	b	0.0	b	14.6	ab	19.1	a	12.6	a	3.3	a
Semianelamento 75%	0.0	b	0.0	b	5.7	c	15.1	a	9.1	ab	3.0	a
Semianelamento 50%	0.0	b	0.2	b	7.4	c	8.4	b	5.3	b	0.0	a
Galhos podados	4.2	a	8.5	a	19.2	a	6.4	b	4.7	b	2.1	a

Este resultado pode ser explicado pela estrutura do ambiente de acondicionamento (estufim), no qual os galhos estavam dispostos. Segundo Stamato Jr (2007), a cobertura plástica utilizada em estufas altera significativamente o balanço da radiação, quando comparado com o ambiente externo, devido à atenuação de incidência de radiação solar, resultando numa redução do balanço de radiação interna e, consequentemente, afetando temperatura, umidade e evapotranspiração. Sob este tipo de estrutura, o crescimento vegetativo é bastante intenso e a taxa de crescimento da parte aérea da planta aumenta gradativamente, de acordo com o aumento da temperatura, alcançando o máximo no intervalo dos 23 a 31° C.

A partir dos 180 dias as coletas dos galhos podados foram menores em tamanho, também podendo ser relacionada à exaustão das reservas do galho ao longo do tempo. No campo, as árvores também emitiram menores brotações, só que apenas na última coleta, aos 240 dias, pois o ínicio das emissões foi mais tardia.

Com relação a mortalidade das plantas, aos 240 dias após a aplicação dos tratamentos de anelamentos, não houve registro de morte de árvores submetidas aos tratamentos de anelamento e semianelamento, evidenciando que a espécie suporta a retirada de um anel parcial ou total da casca sem prejudicar a sobrevivência das árvores. Os galhos podados também permaneceram viáveis até o fim das avaliações (abril/2016), provavelmente, havendo influência positiva das condições climáticas de umidade e temperatura no interior do estufim, e bom isolamento das extremidades dos galhos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a potencialidade das técnicas testadas (anelamento, semianelamentos e galhos podados) como método de rejuvenescimento em plantas adultas de *P. willdenovii*. O método de galhos podados, novo e pouco difundido, merece destaque, pois além de apresentar, em geral, brotações precoces (em 90 dias) e em maior número e tamanho, proporciona o acompanhamento do desenvolvimento destas brotações, pois permite a realocação do material vegetal, próximo às etapas seguintes, de propagação vegetativa.

CONCLUSÃO

A emissão de brotações das árvores submetidas aos resgates vegetativos aplicados no campo ocorre, em média, a partir dos 150 dias e em maior número apenas aos 180 dias após a aplicação dos tratamentos.

A porcentagem de árvores com brotação no anelamento foi maior (100%) aos 150 dias que nos semianelamentos 75% e 50% (43% de brotação cada), apesar de não diferir estatisticamente dos galhos podados (100%) nesta coleta.

A técnica de galhos podados permitiu maior número de brotações aos 90, 120 e 150 dias após a aplicação dos tratamentos. Além da emissão precoce de brotos, a porcentagem de brotação foi em 100% dos galhos em quatro das seis coletas avaliadas.

É indicado o uso da técnica via galhos podados para o resgate vegetativo de *P. willdenovii* pois em média emitiu maior porcentagem de brotação, número e comprimento de brotos.

4 PARTE 2 – PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Persea willdenovii*

4.1 RESUMO

A espécie *P. willdenovii*, conhecida pelas propriedades medicinais da casca e em perigo de extinção, apresenta dificuldades na propagação, sendo necessário o rejuvenescimento dos propágulos. Deste modo, após a aplicação de técnicas de resgate vegetativo, as brotações surgidas foram utilizadas como fonte de material para a propagação *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar protocolos de propagação *in vitro* de material oriundo de resgate vegetativo de *P. willdenovii*. Na etapa de estabelecimento, foram testados três métodos de assepsia dos segmentos nodais (tamanho aproximado de 2 cm com uma gema): 1) concentrações de NaOCl (1; 2; 2,5; 3; 4 e 5% v/v⁻¹) em contato com os explantes por 15 minutos; 2) efeito do biocida PPM® de duas formas: 1ml L⁻¹ no meio de cultura, e 5 ml L⁻¹ sob agitação durante 4 horas e; 3) o material vegetal foi separado conforme a origem (oriundo do campo e do estufim) e aplicado os seguintes tratamentos: presença do biocida PPM® em meio de cultura (1,5 ml L⁻¹), e NaOCl (2% v/v⁻¹) por 15 e 20 minutos de contato com o explante. Na etapa de multiplicação *in vitro*, foram testados os meios de cultura MS e WPM e a adição da citocinina BAP nas concentrações de: 0; 2; 4 e 6 mg L⁻¹. Na etapa de indução de calos, foi testado a organogênese indireta via explante foliar. Os tratamentos foram: posição de contato da face foliar com o meio de cultivo (abaxial e adaxial) e a combinação dos hormônios vegetais BAP e ANA em diferentes concentrações (de 0 a 12 mg L⁻¹). Verificou-se que o material oriundo do campo apresentou grande contaminação, sendo descartado. A presença de PPM® no meio de cultura resultou em menores índices de contaminação fúngica (50%), quando comparado na sua ausência (76%). A assepsia no tempo de 20 minutos obteve os melhores resultados no combate da contaminação bacteriana (5%), menor oxidação (23%) e maior sobrevivência (76%) dos explantes. Observou-se no meio MS maior oxidação (48%) e menor sobrevivência (52%) dos explantes quando comparado ao meio WPM (26% e 74%, respectivamente). A máxima eficiência técnica com o uso do BAP (3 mg L⁻¹) foi de 1,22 e 1,75 3 mg L⁻¹, respectivamente para número médio de brotos e de folhas. Não houve indução de calos em explantes foliares após 120 dias de cultivo *in vitro*. Para a propagação *in vitro* de *P. willdenovii*, para a desinfestação de segmentos nodais é indicado o uso de NaClO (2% v/v) durante 20 minutos e de biocida PPM® (1,5 ml L⁻¹) no meio de cultura. Na etapa de multiplicação, recomenda-se o meio WPM e o uso de 3 mg L⁻¹ de BAP. Segmentos foliares não foram responsivos para a indução de calogênese.

4.2 INTRODUÇÃO

A micropropagação de plantas representa-se como alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico. Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a demanda de mudas de qualidade para a silvicultura (formação de povoamentos e a recuperação de áreas degradadas) e para a indústria farmacêutica (síntese de metabólitos secundários potencializados por meio do melhoramento genético), justifica a sua utilização (LIMA et al., 2007).

O cultivo *in vitro*, constitui uma estratégia importante para solucionar problemas não apenas no âmbito da propagação, mas também do melhoramento genético e da biotecnologia de plantas, especialmente das lenhosas perenes (ERIG; SCHUCH, 2003). De acordo com Paiva (2000), esta técnica vem sendo aplicada com sucesso para obtenção de mudas sadias para um grande número de espécies economicamente importantes ou com dificuldades de propagação, como é o caso de *Persea willdenovii*.

A cultura *in vitro* de *P. willdenovii*, ainda pouco explorada, apresenta potencial diante de outras técnicas de propagação assexuada, porém há entraves relacionados com o baixo potencial morfogênico e as contaminações dos explantes (FIOR et al., 2007).

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como tipo de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, dentre outros (DESCHAMPS, 1993; KOMALAVALLI; RAO, 2000).

Para o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação de uma espécie, é necessário primeiramente o estabelecimento *in vitro*. Espécies nativas lenhosas apresentam certa dificuldade no cultivo *in vitro*, em decorrência principalmente da oxidação e da contaminação dos explantes (SATO et al., 2001).

Diversas partes da planta matriz podem ser utilizadas como fonte de explante. A escolha do material vegetativo pode ser influenciada por vários fatores como: disponibilidade do material, nível de contaminação, juvenilidade do tecido, entre outros. Os requerimentos nutricionais também podem variar, assim como o tipo e quantidade de fitorreguladores (CID; TEIXEIRA, 2010). No entanto, vale ressaltar que o sucesso da micropropagação, independentemente do explante utilizado, está sujeito ao efeito do genótipo da planta matriz em resposta aos estímulos *in vitro* (STEIN et al., 2009).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos de propagação *in vitro* em material de resgate vegetativo de *P. willdenovii*.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

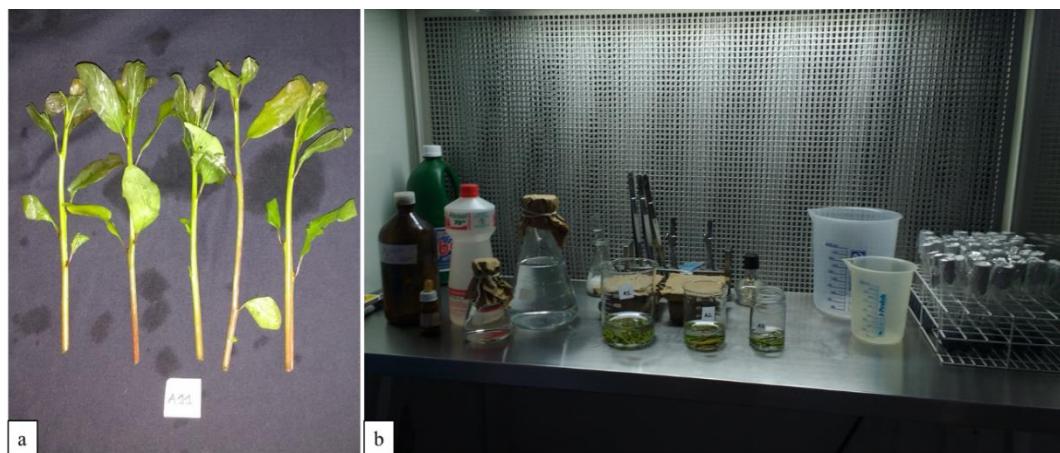
Para a propagação *in vitro* de *P. willdenovii* foram utilizadas brotações oriundas de resgate vegetativo. Durante as coletas das brotações, foi aplicado Frexus® (fungicida, bactericida e esporolicida a base de oxicloreto de cálcio) sobre o material vegetativo, na quantidade de $0,2\text{ g L}^{-1}$. O transporte das brotações originadas de árvores aneladas no campo foi feito em caixa de isopor contendo gelo no fundo e coberto por folhas de papel umedecido com água e conduzido para a Universidade do Estado de Santa Catarina, num prazo máximo de duas horas.

Os experimentos de propagação *in vitro* foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal - LMV do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC em Lages/SC durante o ano de 2016.

4.3.1 Estabelecimento *in vitro*

Para esta etapa, primeiramente, foi realizada uma lavagem superficial das brotações (Figura 13a) com o uso de detergente neutro e imersão em água corrente por 15 minutos. Em seguida, o material foi segmentado em tamanhos menores ($\pm 3\text{ cm}$) e levados para a câmara de fluxo laminar (Figura 13b), onde ocorreu a desinfestação dos explantes.

Figura 13 - Brotações de *P. willdenovii* utilizadas no estabelecimento *in vitro* (a) e câmara de fluxo laminar (b), no qual foi realizada a desinfestação e manipulação do material.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; KOOG, 1962) com 50% da concentração de sais originais, adicionados 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1\text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol, 6 g

L^{-1} de ágar e 1,5 g L^{-1} de carvão ativado. Os recipientes utilizados foram tubos (150 x 25 mm) contendo 15 ml L^{-1} de meio de cultura. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 120 °C e 1 atm por 20 minutos.

Foram avaliadas três metodologias para a desinfestação dos explantes.

Experimento I - foram testadas concentrações do agente desinfetante hipoclorito de sódio (NaClO): 1; 2; 2,5; 3; 4 e 5% de cloro ativo em contato com os explantes por 15 minutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições contendo três explantes em cada tratamento.

Experimento II - foi testado o uso do biocida PPM® de duas formas: i) adicionado em 1 ml L^{-1} no meio de cultura e ii) explantes sob agitação por quatro horas, em contato com 5 ml L^{-1} do produto. No tratamento com adição do biocida em meio de cultura a assepsia foi realizada com NaClO 2% (v/v) por 15 minutos. E, no tratamento sob agitação, não houve contato com outro agente desinfetante, sendo os explantes introduzidos diretamente no meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições contendo três explantes em cada tratamento.

Experimento III - foi separado o material conforme o método de resgate vegetativo utilizado: oriundo do campo (anelamento e semianelamento) e do estufim (galhos podados). Foram testados os seguintes tratamentos: i) presença ou ausência do biocida PPM® em meio de cultura, na concentração de 1,5 ml L^{-1} , e ii) tempos de imersão em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo): 15 e 20 minutos de contato com o explante. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (biocida x assepsia), utilizando-se seis repetições de cinco explantes em cada tratamento.

O baixo número de repetições e a não utilização do tratamento controle foi estabelecido por causa do número de segmentos nodais limitados. Apesar da técnica de resgate vegetativo, que originou o material utilizado nestes experimentos, ter emitido um número considerável de brotações, o espaço entre uma gema e outra eram relativamente grandes, resultando em um baixo número de explantes.

Em todos os experimentos, exceto para o tratamento com agitação em biocida Plant Preserve Mixture (PPM®), após a assepsia, os explantes foram lavados três vezes com água destilada autoclavada e incubados em meio de cultura. O material foi mantido no escuro por sete dias e, após esse período, cultivado em sala de crescimento sob temperatura de 25°C ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 20 $\mu M\ m^{-2}\ s^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

As avaliações, de todos os experimentos, foram feitas durante um período de 28 dias, no qual, semanalmente, foram avaliadas a incidência de contaminação fúngica e bacteriana; oxidação e taxa de sobrevivência dos explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e/ou de regressão a 5% de probabilidade de erro através do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4.3.2 Multiplicação *in vitro*

Segmentos caulinares com uma gema previamente estabelecidos *in vitro*, de tamanho $3 \pm 0,5$ cm, foram utilizados para realização desta etapa (Figura 14). Foram avaliadas diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0; 2; 4 e 6 mg L⁻¹) em dois meios de cultura: meio MS (Apêndice a) e o meio WPM (apêndice b). Todos os meios foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 (4 concentrações de BAP e 2 meios de cultura) com seis repetições contendo seis explantes em cada tratamento.

Figura 14 - Explante de *P. willdenovii* utilizados para a etapa de multiplicação *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Os explantes foram cultivados em sala de crescimento sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $20 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Após um período de 60 dias, foram avaliados comprimento do ramo principal, número de brotos, comprimento médio dos brotos, número de folhas e, posteriormente, calculado a porcentagem de explantes com brotações. Os dados foram submetidos à análise de variância, as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey

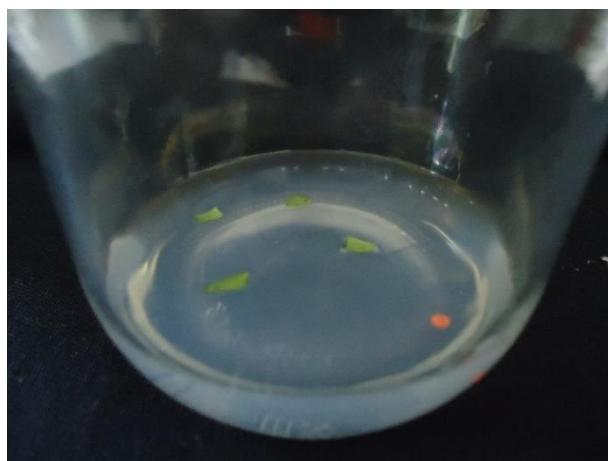
ou análise de regressão a 5% de probabilidade de erro através do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4.3.3 Indução de calos

As folhas, coletadas de ramos provenientes de resgate vegetativo, foram lavadas em água corrente e detergente neutro e, em seguida, segmentadas em porções menores (1 cm^2). Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foliares foram imersos em etanol 70% (v v⁻¹) por 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,0% de cloro ativo por 15 minutos, em seguida, enxaguados três vezes em água destilada autoclavada.

Os segmentos foram seccionados em explantes de $\pm 1\text{ cm}^2$ (Figura 15) contendo a nervura foliar central e inoculados na posição abaxial e adaxial da folha em frascos, de 100 mL, contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGEE; SKOOG, 1962). O meio foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 5,5 g L⁻¹ de ágar e os tratamentos constituíram-se de diferentes combinações de BAP e Ácido Naftaleno Acético (ANA) nas concentrações de 0 a 12 mg L⁻¹ (Tabela 5). O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem, a 120°C e 1 atm por 20 minutos.

Figura 15 - Explantes foliares de *P. willdenovii* utilizados para a indução de calos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Os explantes foram mantidas no escuro por 10 dias e, após este período, cultivados em sala de crescimento sob temperatura de 25°C ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{M m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias. As avaliações de contaminação, oxidação e crescimento de calos foram feitas semanalmente até atingir 120 dias após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 10 (A x D), sendo o *fator A* composto pelas posições da folha e o *fator D* as combinações de concentrações de ANA/BAP. Foram utilizandas cinco repetições de quatro segmentos foliares em cada tratamento.

Tabela 5 - Posição da face foliar e concentrações de BAP e ANA testados em meio de cultura MS na indução de calogênese de *P. willdenovii*.

Tratamento	Posição face foliar	Fitorregulador (mg.L⁻¹)	
		BAP	ANA
1	Abaxial	0	0
2	Abaxial	4	4
3	Abaxial	8	8
4	Abaxial	12	12
5	Abaxial	0	4
6	Abaxial	0	8
7	Abaxial	0	12
8	Abaxial	4	0
9	Abaxial	8	0
10	Abaxial	12	0
11	Adaxial	0	0
12	Adaxial	4	4
13	Adaxial	8	8
14	Adaxial	12	12
15	Adaxial	0	4
16	Adaxial	0	8
17	Adaxial	0	12
18	Adaxial	4	0
19	Adaxial	8	0
20	Adaxial	12	0

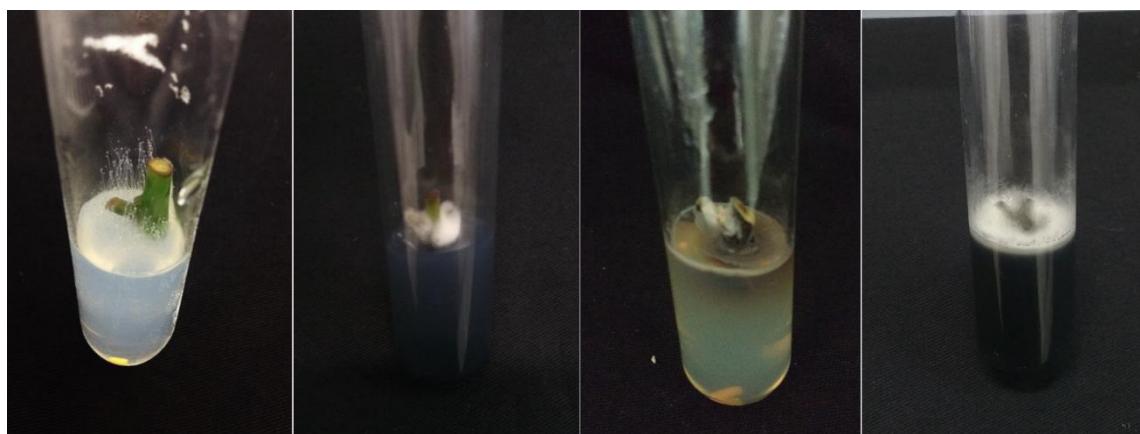
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Estabelecimento *in vitro*

Os experimentos I e II não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Verificou-se elevada ocorrência de contaminação durante as quatro semanas seguintes da retirada do material do escuro para o ambiente de luminosidade, sendo que entre 80 a 90% do explantes tiveram contaminações fúngicas e bacterianas (Figura 16).

Figura 16 - Contaminações em explantes de *P. willdenovii* oriundos do material de resgate vegetativo.



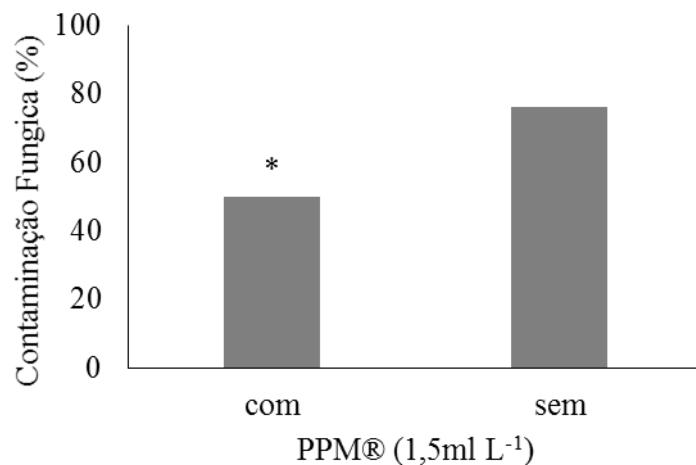
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

As plantas lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente, devido a contaminação e oxidação. Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000). Fior et al (2007), também relataram elevada proporção de contaminação por microorganismos de origem fúngica e bacteriana (74%) em semeadura *in vitro* e micropromoção de tecidos não juvenis de *P. willdenovii*. De acordo com os mesmos autores, após diversos subcultivos a contaminação de origem endógena permaneceu em parte do material.

No experimento III, os materiais vegetais oriundos do campo (resgate vegetativo via anelamento e semianelamento 75% e 50%, respectivamente) também apresentaram alto índice de contaminações fúngicas e bacterianas, os quais foram descartados, restando apenas o material oriundo do estufim.

Não houve interação ($p<0,05$) do tempo de imersão de NaOCl e a presença do biocida PPM® para as variáveis avaliadas. Com relação à contaminação por fungos, apenas o tratamento de biocida em meio de cultura foi significativo, sendo que a presença do PPM® correspondeu a menor porcentagem de contaminação (50%) quando comparado na sua ausência (76%) (Figura 17).

Figura 17 - Porcentagem de contaminação por fungo em explantes de *P. willdenovii* sob a presença/ausência do biocida PPM® ($1,5 \text{ ml L}^{-1}$) no meio de cultura MS 50%.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016. *Médias diferem entre si a 5% de probabilidade de erro.

O composto PPM® é um biocida de amplo espectro contra os contaminantes comuns na técnica de cultura *in vitro* (NIEDZ, 1998). Assim como neste trabalho, Jiménez et al. (2006) também observaram que a presença de PPM®, adicionado ao meio de cultura, foi eficaz para controlar a contaminação somente daqueles explantes oriundos de plantas em casa de vegetação, sendo que para o material oriundo do campo não obtiveram resultados satisfatórios em relação ao controle da contaminação. Fato este esperado, pois as plantas do campo estão mais expostas a contaminações superficiais (TEIXEIRA, 2001).

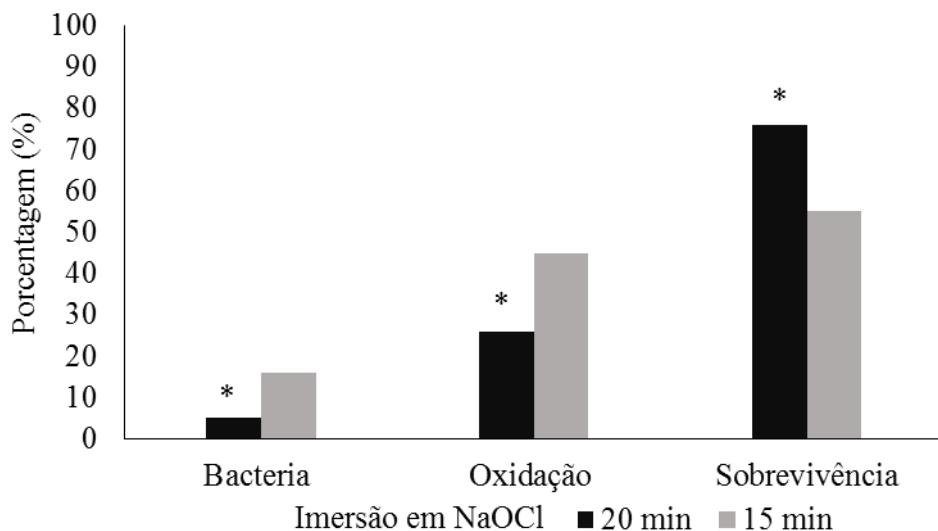
Segundo Babaoglu e Yorgancilar (2000), o uso de 2 mL L^{-1} de PPM® no meio de cultura também foi o suficiente para controlar contaminações microbianas sem afetar a germinação de sementes e o desenvolvimento de explantes de *Poterium sanguisorba*.

Este biocida, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (0,5 a 2 ml L^{-1}) tem sido eficiente em controlar contaminações de fungos ou de bactérias quando o inoculo encontra-se baixa densidade no explante. Porém, quando expostos a maiores densidades, concentrações

elevadas de PPM são requeridas (NIEDZ, 1998). Rowntree (2006) salienta que altas concentrações desse biocida podem levar a fitotoxicidade dos explantes.

Já as variáveis contaminação bacteriana, oxidação e sobrevivência dos explantes foram influenciadas pelo tempo de imersão do material em NaClO (Figura 18), sendo que os explantes em imersão por 20 minutos obtiveram os melhores resultados no combate a contaminação bacteriana (5%), menor oxidação (23%) e maior sobrevivência (76%) dos explantes.

Figura 18 - Porcentagem de contaminação bacteriana, oxidação e sobrevivência dos explantes de *P. willdenovii* sob o tempo de imersão em NaOCl (20 e 15 minutos) no estabelecimento *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016. *Médias diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Dentre os produtos mais comuns usados na assepsia dos explantes, está o hipoclorito de sódio, usado geralmente na concentração de 2%, entre 5-30 min, como neste trabalho. O mecanismo de ação do cloro não é bem conhecido, embora algumas hipóteses sugiram que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos microrganismos, assim formando compostos tóxicos que levam à inibição de enzimas essenciais (DONINI et al., 2005). Sua principal vantagem é a solubilidade em água e; portanto, fácil remoção, evitando efeitos residuais tóxicos que podem provocar pardeamento via oxidação fenólica (CID; ZIMMERMANN, 2006).

As concentrações e tempo de contato das soluções desinfestantes com o material vegetativo podem variar muito, sendo necessário à adequação de acordo com a espécie, sensibilidade do tecido a ser desinfestado e o nível de contaminação (MONTARROYOS, 2000).

Neste trabalho, os contaminantes bacterianos manifestaram-se após a primeira semana de avaliação, na base dos explantes cultivados *in vitro*, e continuaram a aparecer posteriormente. Em geral, o material vegetativo sobreviveu à contaminação bacteriana. Porém, estas contaminações atribuíram consideráveis limitações de desenvolvimento dos explantes.

A contaminação de origem endógena em espécies lenhosas é relatada por muitos autores (FIOR et al. 2007; BIASI et al. 1994; RODRIGUES et al. 1996; PALU et al., 2011) sendo considerada um fator crítico para o estabelecimento de protocolos, pois ao longo do tempo retardam o desenvolvimento do material.

É conhecido, de maneira geral, que baixas doses de um agente desinfetante associadas a curtos tempos de imersão favorecem a sobrevivência dos explantes, contudo, essa condição nem sempre promove uma desinfestação adequada. No caso inverso, de maior tempo de imersão, o controle do patógeno pode ser mais eficiente, porém, a viabilidade dos explantes pode ser reduzida, com perdas de material por fitotoxicidade (BARRUETO; ZIMMERMANN, 2006). Corroborando, a assepsia de explantes de erva mate (*Illex paraguariensis*) com NaClO por 35 minutos chegou a afetar 52,5% do material, já o tratamento com menor tempo de contato com o agente desinfestante (15 minutos) houve oxidação de apenas 15% do material estabelecido (HORBACH, 2008).

A oxidação fenólica também é considerada um entrave no desenvolvimento do cultivo *in vitro*. Neste trabalho, foi observado que o material vegetal teve maior número de oxidações na segunda e terceira semana de avaliação. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina. Este problema também foi relatado por Fior et al (2007) para *P. willdenovii* e para outras espécies do gênero Perseae, como *P. americana*, *P. indica* e *P. venosa* (NELL et al., 1983; RODRIGUES et al., 2001; RODRIGUES et al., 1998), nos quais, de modo geral, as respostas ao cultivo *in vitro* são similares.

A utilização de carvão ativado na concentração de 1,5 g L⁻¹ em testes preliminares diminuiu a oxidação dos explantes, ainda que presente nos estabelecimentos de *P. willdenovii* (Figura 19).

Figura 19 - Explantes de *P. willdenovii* oxidados (a) e cultivo de meio de cultura com carvão ativado (b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Os valores de oxidação encontrados neste trabalho não foram proporcionais ao tempo de contato de assepsia com NaClO, provavelmente, devido à proximidade de tempo dos tratamentos (15 e 20 minutos). Em testes preliminares, nos maiores tempos de contato com o hipoclorito não houve sobrevivência dos explantes.

As dificuldades no estabelecimento *in vitro* de *P. willdenovii* devido a contaminação e oxidação dos explantes continua apesar do rejuvenescimento do material vegetativo, possivelmente isto pode estar relacionado a genética da espécie. Outras espécies do gênero *Persea* também encontram entraves na micropropagação. O abacateiro (*Persea americana* Mill.), com estudos *in vitro* publicados desde 1987 sobre inúmeras cultivares, tem relatos semelhantes aos encontrados neste trabalho. Segundo Cooper (1987) estacas nodais *in vitro* da cultivar ‘Duke 7’ não foram bem sucedidas pois a taxa de crescimento diminuiu após 6 meses, com sintomas de desequilíbrio de nutrientes.

4.4.2 Multiplicação *in vitro*

Não houve interação dos fatores ($p<0,05$) (meios de cultura e concentrações de BAP) nas variáveis avaliadas. O meio de cultura influenciou na oxidação, sobrevivência e porcentagem de brotação dos explantes (Tabela 6). Nos explantes em meio MS, observou-se maior oxidação (48%) e menor sobrevivência (52%) quando comparado ao meio WPM (26% e 74%, respectivamente). Esse fato pode ser explicado devido a diferença de concentração dos

sais entre os meios. Segundo Saadat e Hennerty (2002), os meios de cultura MS e WPM são similares, pois ambos possuem em suas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, sacarose, e alguns compostos orgânicos, como vitaminas e aminoácidos. Entretanto, o meio de cultura WPM possui menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio) quando comparado ao meio MS, o qual contém altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio. Devido a isso, o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) é o mais usual e eficiente para espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998).

Tabela 6 - Oxidação, sobrevivência e brotação (%) de explantes de *P. willdenovii* cultivados em meio de cultura WPM e MS.

Meio de Cultura	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)	Brotação (%)
WPM	26,0 b*	74,0 a	53,0 a
MS	48,0 a	52,0 b	32,0 b

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016. *Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Tecidos de plantas lenhosas usadas na micropopulação podem ser afetados pela presença excessiva de componentes do meio nutritivo que conduzem a desordem metabólica e morfológica. Algumas espécies, quando cultivadas *in vitro*, são suscetíveis a uma reação de hipersensibilidade às condições de estresse do meio, desenvolvendo variações anormais, assinalada por desordens fisiológicas generalizadas, podendo, em casos extremos, levar à morte da cultura (ZIMMERMAN, 1984).

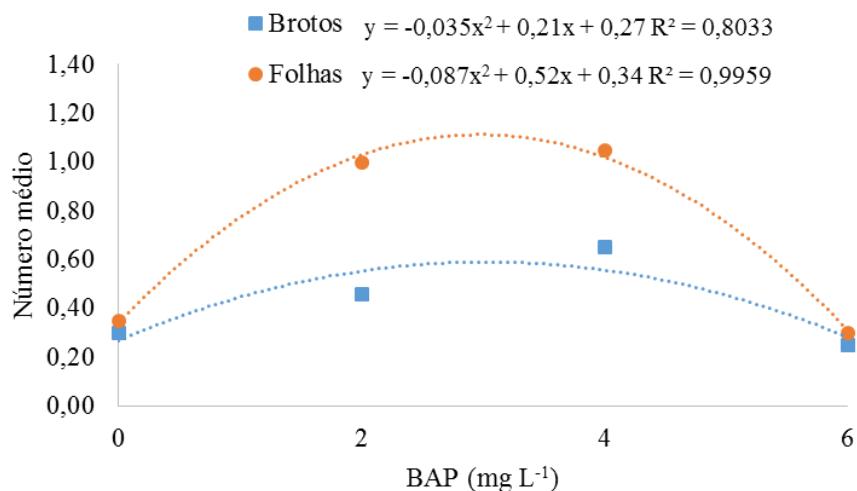
No entanto, as respostas fisiológicas das espécies são variadas. Segundo Bassan et al. (2006), para o cultivo *in vitro* de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.), o meio MS teve melhores respostas na sobrevivência e estabelecimento do que aqueles explantes mantidos no WPM, sugerindo que o MS é mais adequado às necessidades de desenvolvimento para esta espécie. Já para a micropopulação de caixeta, *Dydimopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch, Mantovani et al. (1999) indicaram o meio WPM. Esses resultados reforçam a tese de que o comportamento *in vitro* de uma espécie não pode ser previsto partindo do resultado de outras, devendo ser testado caso a caso.

A porcentagem média de brotação de *P. willdenovii* também foi superior naqueles explantes cultivados em meio WPM (53%) em comparação aqueles do meio MS (32%). Resultado semelhante também foi relatado para louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Steud.),

no qual houve maior desenvolvimento dos brotos cultivados em meio WPM do que aqueles em MS (MANTOVANI et al., 2001). No entanto, Amaral (2006), cita que as formulações salinas de MS ou WPM não afetaram a multiplicação em microestacas de cedro (*Cedrela fissilis*), mas que a presença de 5 µM de BAP favoreceu o aumento do número de gemas laterais.

As concentrações de BAP influenciaram significativamente no número de brotações e de folhas novas (Figura 20). As doses intermediárias de BAP (2 e 4 mg L⁻¹) proporcionaram as melhores respostas, sendo que a máxima eficiência técnica (MET) para o número de brotos e de folhas foi de 3 mg L⁻¹.

Figura 20 - Número médio de brotações e de folhas novas em explantes de *P. willdenovii* cultivados *in vitro* sobre as doses de 0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹ de BAP.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

As citocininas são reguladores de crescimento consideradas fundamentais para indução e proliferação de gemas axilares *in vitro*. Entre os vários tipos de citocininas, o BAP, utilizado neste estudo, é o mais utilizado para a multiplicação de parte aérea, sendo usado em aproximadamente 60% dos meios de cultura destinados a multiplicação *in vitro* (SANTOS, 2001). Segundo Paiva e Aloufa (2009), o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação de diversas espécies, apresentando resultados positivos na multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias e, consequentemente, no aumento de folhas.

Para Pasqual e Barros (1992), assim como neste trabalho, o melhor resultado para multiplicação de segmentos nodais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.), foi

observado na concentração de 4 mg L⁻¹ de BAP. Em contrapartida, concentrações acima de 4 mg L⁻¹ não foram eficientes na indução de brotos axilares em segmentos nodais de muricí-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), provavelmente, devido ao efeito fitotóxico do regulador de crescimento BAP (NOGUEIRA, 2003).

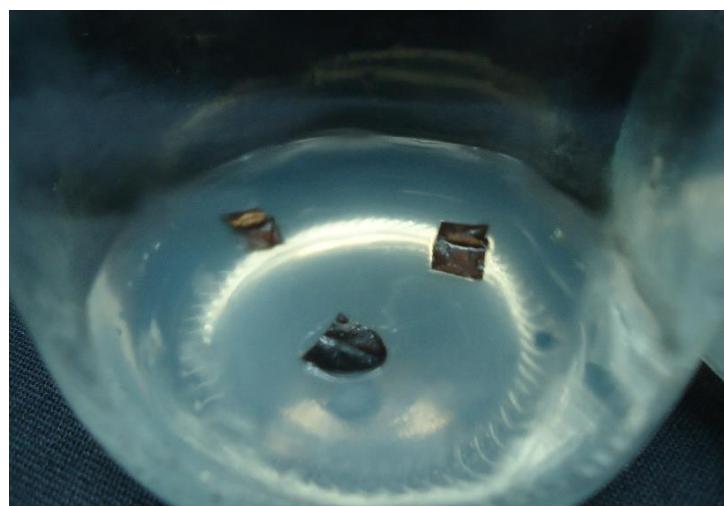
Segundo Brum et al. (2002) a multiplicação de brotações com o uso de BAP pode estar relacionada com a influência da carga genética da planta matriz, do regulador vegetal utilizado para o auxílio da divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dormência apical.

Os resultados obtidos na multiplicação *in vitro* de *P. willdenovii* são promissores e mostram a viabilidade do uso desta técnica em programas de multiplicação e conservação desta espécie. No entanto, novos trabalhos devem ser realizados visando o aumento no número de brotos explorando, como por exemplo, experimentos sobre a influência do ambiente (temperatura, luz, solidez do meio de cultura, etc) na indução de novos brotos.

4.4.3 Indução de calos

Não houve formação de calos nos explantes foliares expostos aos tratamentos avaliados. Observou-se, de uma forma geral, que as folhas apresentaram coloração verde claro até os 15 dias após a inoculação, tornando-se bege aos 60 dias de cultivo, e após este período, a coloração mudou para marrom. Aos 120 dias de cultivo *in vitro* houve morte dos tecidos dos explantes, provavelmente devido a falta de condições para o desenvolvimento (Figura 21).

Figura 21 - Explantes foliares de *P. willdenovii* oxidados após 120 dias em meio de cultivo para indução de calogênese.



A compreensão dos processos fisiológicos que regulam a desdiferenciação e a rediferenciação celular é uma etapa fundamental na regeneração de plantas *in vitro*. Essa mudança do desenvolvimento celular passa por sucessivos processos (SUGIYEMA, 1999), no qual não foi possível neste trabalho com *P. willdenovii*, porém não se sabe exatamente onde ocorreu o entrave.

Teoricamente, em uma primeira fase, denominada de aquisição de competência organogenética, ocorrem alterações citológicas em resposta aos sinais hormonais. Entende-se por competência celular a habilidade das células somáticas em expressar a capacidade de desdiferenciação celular. A fase seguinte, denominada de determinação, o programa celular é direcionado para um alvo morfogenético específico. A última fase, diferenciação, as células expressam a morfogênese ou a calogênese. Essas alterações no programa morfogenético são mais difíceis de serem controladas em espécies arbóreas em função da elevada presença de substâncias oxidativas (PREECE, 2008).

O tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogenético dependem, sobretudo, do explante, meio de cultura e fitoreguladores. Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Em geral, explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a indução de calo (PIERIK, 1990). Porém, neste experimento, a face de contato da folha com o meio de cultura não influenciou na indução da calogênese.

Em relação aos reguladores de crescimento, os tipos (BAP e ANA) e concentrações (0 a 12ml L⁻¹) utilizadas neste trabalho também não foram responsivas. Segundo Gueye et al. (2009) a concentração e o balanço de auxinas e citocininas são fatores determinantes na diferenciação celular e no padrão de desenvolvimento *in vitro*. As auxinas desencadeiam os processos de desdiferenciação (modelo indireto) e rediferenciação (modelo direto) *in vitro*, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas dos explantes (FEHE'R et al. 2003). Além disto, a alteração do programa ontogenético é regulada, especialmente, pela auxina exógena que, de acordo com sua concentração, pode favorecer determinada rota do desenvolvimento celular (GUEYE et al., 2009). Já as citocininas, estimulam a divisão celular e podem induzir a embriogênese somática (MELLO et al. 2000).

Várias espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de indução de calos utilizando reguladores vegetais (LAMEIRA et al., 1994). Ao contrário deste trabalho,

geralmente, de acordo com Tisserat (1985), concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie.

A escolha do fitorregulador a ser utilizado na cultura *in vitro* dependerá do tipo de morfogênese desejada; de seu nível endógeno no explante no momento da excisão; da capacidade do tecido sintetizar o regulador durante o período de cultura; e da possível interação entre os hormônios vegetais endógenos e aqueles adicionados ao meio (SANTOS, 2003). Nas condições deste trabalho, os fitorreguladores BAP e ANA e suas combinações, nas doses de 0 a 12ml L⁻¹, não contribuíram para a indução da calogênese de *P. willdenovii*, podendo ainda ser testados outros tipos de fitorregulares e concentrações.

Ainda que com limitações, os autores Witjaksono et al. (1999) estabeleceram protocolo na indução de embriogênese somática para *Persea americana* Mill., que pode ser utilizado como base para futuros trabalhos visando um método alternativo para a cultura de tecidos de *P. willdenovii*.

4.5 CONCLUSÃO

Para a micropromoção de brotações rejuvenescidas de *P. willdenovii*, na etapa de estabelecimento, é indicado a adição do biocida PPM® (1,5 mg L⁻¹) no meio de cultura, para o combate a contaminação fúngica, e a assepsia com o agente desinfetante hipoclorito de sódio 2% (v v⁻¹) durante 20 minutos, visando menor contaminação bacteriana e maior sobrevivência.

Na fase de multiplicação *in vitro*, o uso do meio de cultura WPM favorece a sobrevivência e a porcentagem de brotação, e a citocinina BAP, na dose de 3 mg L⁻¹, promove maior número de brotos e de folhas.

Na organogênese indireta, via segmentos foliares, o cultivo com BAP e ANA (e as concentrações combinadas de 0 a 12 mg L⁻¹) em ambas exposições faciais da folha (abaxial e adaxial) em contato com o meio de cultura, não foram responsivos para a indução de calogênese.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de resgate vegetativo de *P. willdenovii* foram eficientes na produção de novos brotos, especialmente o método de galhos podados, podendo ser utilizado em trabalho futuros aliados a outros métodos de propagação vegetativa.

São necessários outros estudos visando o estabelecimento de protocolos para a propagação *in vitro* de *P. willdenovii*. Naturalmente, a espécie cresce e se desenvolve lentamente, e o cultivo *in vitro* precisa ser aperfeiçoado constantemente para que essa técnica possa ser utilizada na propagação clonal. Assim como relatado em outros trabalhos, no presente estudo, apesar do rejuvenescimento do material, os explantes apresentaram baixo poder morfofisiológico de desenvolvimento *in vitro*.

A contribuição deste trabalho deve ser considerada como base para pesquisas futuras. Existem diversos fatores que devem ser pesquisados visando o estabelecimento de um protocolo com potencial de produção comercial de mudas e/ou para uso na biotecnologia dessa espécie, como testar outros agentes desinfetantes no estabelecimento, assim como o uso de bactericida; testar a influência da sacarose, assim como qualidade de luz e diferentes temperaturas da sala de crescimento para obtenção de maior número de brotos, dentre outros experimentos nas próximas fases (enraizamento e aclimatização).

Para obter resultados mais precisos e rápidos é fundamental a elucidação fisiológica e genética da planta, principalmente aspectos relacionados ao desenvolvimento (vegetativo e radicular), que determinam respostas diferentes, e podem estar causando estes entraves nos processos de propagação.

A popularidade da espécie e seus benefícios medicinais foram relatados por muitas pessoas ao longo da condução deste trabalho, sendo que as primeiras pesquisas e relatos científicos sobre as propriedades medicinais foram publicados recentemente por Somensi em 2015. É imprescindível a continuação de trabalhos sobre o manejo correto dos usos, produção de mudas e outras técnicas que contribuam para enriquecimento do cultivo em oposição a extinção de *P. willdenovii*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 442 p. 2004

ALMEIDA, F. D.; et al. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estacaia. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.3, p. 445-453, 2007.

ALONSO, M. et al. Biochemical responses of *Pinus pinaster* trees to fire-induced trunk girdling and crown scorch: secondary metabolites and pigments as needle chemical indicators. **Journal of Chemical Ecology, Pontevedra**, v. 28, n. 4, p. 687-700, 2002.

AMARAL, S.A.; SILVA,A. T. A.; MOTA, M. G. C. et al. Uso de tratamentos como antioxidantes de explantes (embrião, endosperma) de andiroba (*Carapa guianensis*). In: Seminário de iniciação científica da FCAP; seminário de iniciação científica da embrapa amazônia oriental, 7., 1997, Belém. **Anais...** Belém: FCAP, 1997. p.122-124.

AMARAL, V. F. M. Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 63 f. 2006.

ANDRADE, F. W. Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação. **Tese de doutorado.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USP, Piracicaba - SP, 2010.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. et al. Micropopagation de aroeira (*Myracrodrun urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

BARBOSA, R. DE C. S. B. C; GIESBRECHT, A. M; BARBOSA-FILHO, J. M; YOSHIDA, M; GOTTELEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazonica** (Supl.), v. 18, n. 1-2, p. 91 – 94, 1988.

BARCELÓ-MUÑOZ, A. et al. Micropopagation of adult avocado. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** v. 58, p. 11-17, 1999.

BARROS, C. F; CALLADO, C. H; COSTA, C. G; PUGIALLI, H. R. L; CUNHA, M; MARQUETE, O. **Madeiras da Mata Atlântica**, Vol I. 1a ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997. 86p.

BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMANN, M. J. A. **Contaminação *in vitro* de plantas.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 20 p., 2006.

BASSAN, J.S; REINIGER, L.R.S; ROCHA, B.H.G; SEVERO, C.R.P; FLÔRES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390. 2006.

BATISTA, A. N. L. et al. Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 321-323, 2010.

BIASI, L. A. 1995. KOLLER, O. C.; KÄMPF A. N. Micropropagação do abacateiro Ouro Verde a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 29(7): 1051-1058. 1994.

BIOATIVAS (Minas Gerais) (Org.). Relatório final: **Lista Vermelha da Flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2007. 69 p. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/relatoriolistasmg_vol2.pdf>. Acesso em: 23 mar 2016.

BORGES, K. N; NOBLICK, L. R; LEMOS, M. J. S. Contribuição ao conhecimento da flora medicinal da microrregião de Feira de Santana (BA) I. **Sitentibus**, v. 3, n. 5, p. 101 – 116, 1986.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 1403-1409, 2002.

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

CALDAS, L.S., et al. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p. 81-130.

CARVALHO, L.R; CARVALHO, M.L.M; DAVIDE, C. A. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae. **Revista brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, 2009.

CARVALHO, L.R.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 2, p.15-25, 2006.

CARVALHO, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras. **Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras**, vol. 2. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 627 p.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; DE MORAIS, A. R.; DE CASTRO, N. E. A.; CHAPERON, H.; QUILLET, G. Results of studies on the use of *Eucalyptus cuttings* in Congo-Brazzaville. In: NIKLES, D. G.; BURLEY, J.; BARNES, R.D. (Ed.). **Progress and problems of genetic improvement of tropical forest trees.** Oxford: Commonwealth Forestry Institute, 1978. p. 1040-1059. Proceedings of a joint workshop, IUFRO working parties, Brisbane, 1977.

CID, L.P.B.; ZIMMERMANN, M.J. A contaminação in vitro de Plantas. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Boletim de Pesquisa, 122).

CONSEMA-RS. Lista de espécies Criticamente em Perigo no Conselho Estadual do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul. Acesso:

http://www.sema.rs.gov.br/conteudo.asp?cod_agrupador=4 em 25 de novembro de 2014.

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

DAVIDE, A.C.; CARVALHO, L.R.C.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **CERNE**, v.9, n.1, p.29-35, 2003.

DAVIDE, J. **Úlcera gastroduodenal.** 2009. Disponível em:
<http://www.alertonline.com/pt/medical-guide/ulcera-gastroduodenal>. Acesso em 29 mar. 2016

DIAS, P. C. Propagação vegetativa de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) por estaquia e miniestaquia. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Florestais), Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2011.

DONINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J.A. DE; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Arquivo do Instituto de Biologia, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J.C.B. **Recomposição de Matas Ciliares: orientações básicas.** São Paulo: IF/Série Registros, n.4, 1990. 14p.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento in vitro de plantas de marmeiro (*Cydonia oblonga* mill.) cultivares MC, Adams ePortugal. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 8, n. 2, p. 107-115, 2003.

ELDRIDGE, K. et al. *Eucalypt domestication and breeding.* Oxford: Clarendon Press, p. 228-246, 1994.

EMBRAPA. 1998. Mapa Convenção cartográfica: escala 1:250.000. Rio de Janeiro. 2 p.

Espécies Ameaçadas online. Ano 2, n 9, Rio de Janeiro, 2007. Acesso: <http://www.biodiversitas.org.br/boletim/> em 25 de Novembro de 2014.

FALKENBERG, D. B. 2003. Matinhas nebulares e vegetação rupícola dos Aparatos da Serra Geral (SC/RS), sul do Brasil. 594f. **Tese** (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FEHE'R, A.; PASTERNAK, T.P. & DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 74, p. 201-228, 2003.

FERRARI, M. P. et al. Propagação vegetativa de espécies florestais. Colombo, **Embrapa Florestas**, Documentos 94, 22p, 2004.

FERREIRA, M.C. et al. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p.21-43

FERREIRA, M.; SANTOS, P. E. T. **Melhoramento genético do eucalyptus no Brasil: breve histórico e perspectivas**. In: IUFRO conference on silviculture and improvement eucalypts conferência iufro sobre silvicultura e melhoramento de eucaliptos, 1997, Salvador. Proceedings. Anais... Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1997. v. 1. p. 178-182. 1997.

FIOR, C. S. et al. Aspectos da propagação de *Persea willdenovii* Losterm. (Lauraceae). **Rodriguésia**, v.58, n.1, p.27-4, 2007.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.

FRANCO, C. M. micropropagação e transformação genética de pinhão-manso (*J. curcas* L.). Dissertação. Instituto agronômico. Campinas 67p. 2013.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the Technology**. 2nd ed London: Hardcover, p.98-165.1993.

GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L. et al. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **In Vitro Celular & Developmental Biology Plant**. v. 47, p. 87-90, 2005.

GRATTAPAGLIA; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, p.183-260. 1998.

GREENWOOD, M. S.; HUTCHISON, K. W. Maturation as an developmental process. In: AHUJA, M. R. e LIBBY, W. J. **Clonal forestry: genetics and biotechnology.** Budapest: Springer-Verlag, p. 14 – 33, 1993.

GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D., HILBERT, J.L.; VERDEIL, J.L. & BLERVACQ, A.S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 98, p. 47-58, 2009.

HACKETT, W. P. Juvenility and maturity. In: **Cell and tissue culture in forestry.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 216-231, 1987.

HARTMANN, H. T; KESTER, D. E; DAVIES JR, F. T; GENEVE, R. L. Hartmann and Kester's **Plant propagation: principles and practices.** 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 915 p, 2011.

HATSCHBACH, G. G.; ZILLER, S. R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná.** SEMA/GTZ, Curitiba. 1995. 139p.

HORBACH, M. A. Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire-Aquifoliaceae). 2008. 52 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS. 2008.

HUANG, L. C. et al. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p. 252 – 264, 1990.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1992. **Manual técnico da vegetação brasileira.** Rio de Janeiro: Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 92 p.

JIMÉNEZ, V. M. et al. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 86:389–395; 2006.

JOHNSON, T. et al. Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. **In Vitro Cell Dev Bio Plant.** v.48, n. 3, p. 369-376, 2012.

KOPPEN, W. **Climatología.** México: Fondo de Cultura Económica. 1948.

LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P.; PINTO, J. E. B. P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures in vitro. **Ciência Rural,** Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, set./dez. 1994.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000.

LATT, C.R.; NAIR, P.K.R.; KANG, B.T. Reserve carbohydrate levels in the boles and structural roots of five multipurpose tree species in a seasonally dry tropical climate. **Forest Ecology and Management**, v.146, p.145-158, 2001.

Lista das Espécies Florestais e Arbustivas de Interesse Econômico na Amazônia Ocidental. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia – INPA. Acesso: https://www.inpa.gov.br/sementes/arquivos/tabela_Nome_Cientifico_Usos.pdf em 25 de Novembro de 2014.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Combined Proceedins International **Plant Propagators Society**, Washington, v. 30, p. 327 - 421, 1981.

LUOGA, E.J.; WITKOWSKI, E.T.F.; BALKWILL, K. Regeneration by coppicing (resprouting) of miombo (African savanna) trees in relation to land use. **Forest Ecology and Management**, v.189, p.23-35, 2004.

MA, X. et al. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v.48, n.3, p. 324-334, 2012.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P. et al. Micropropagação de caixeta *Dydimopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.10, n.5, p.15-33, 1999.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Steud.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.11, n.2, p.93-101, 2001.

MARTINS, E. R & SANTOS, R. H. S. Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo. **Informe Técnico**, UFV, v. 73, p. 1 – 26, 1995.

MARTINS-RAMOS, D; CHAVES, C. L; BORTOLUZZI, R. L. da C; MANTOVANI, A. Florística de Floresta Ombrófila Mista Altomontana e de Campos em Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista brasileira Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 156-166, abr./jun. 2011.

MAZZA, M. C. M. et al. Potencial de aproveitamento medicinal de espécies do sub-bosque dos bracatingais da região de Curitiba, PR. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2000. 27p.

MELLO, M.O. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *Bauhinia forficata* shoot regeneration: histological analysis of organogenesis pathway. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 43, n.4, 2000.

MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A. et al. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture.** Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-126.

MONTARROYOS, A. V. V. **Contaminação in vitro.** ABCTP Notícias, Brasília, n. 36/37, p. 5-10. 2000.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology plant,** Waterbury, v.15, p. 473-497, 1962.

NELL, D. D.; KOTZÉ, J. M.; SNYMAN, C. P. In vitro propagation of *Persea indica*. **Yearbook South African Avocado Growers Association.** V. 6, p. 92. 1983.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **HortTechnology** 8:598–601; 1998.

NOGUEIRA, R. C. Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. 88 f. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

OCCHIONI, P.; FILHO A. de M. Estudo anatômico do lenho secundário do Puchury - Rana. *Ocotea fragrantissima* Ducke. **Rodriguésia.** V. 21, p. 1 - 12. 1947.

PAIVA, P.D.O.; CARDOSO, M. das G.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Identificação de compostos liberados no meio de cultura pelo processo de oxidação em cultivo *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* ait.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24 (edição especial), p. 50-55, 2000.

PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 300-304, 2009.

PALU, E.G., CORREA, L.S., SUZUKI, A.N., BOLIANI, A.C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura** 33: 587-592. 2011.

PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeito do ácido naftaleno acético e da 6- benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 7, p. 1017-1019, jul. 1992.

PEREIRA, de O. M. Resgate vegetativo e propagação via estquia e miniestaquia de *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (F. Muell.) Bahadur. **Dissertação.** UFPR, Curitiba – PR, 2014.

PEREIRA-FERRER, H. Aportes al conocimiento taxonómico del género *Persea* (Lauraceae) en Venezuela. *Hoehnea*. v. 39, n. 3, p. 435-478, 2012.

PEREIRA, G.A; CORREA, L.S; BOLIANI, A.C. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira ‘Grande naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Fruticultura* Edição Especial: p.222-226, 2011.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores.** Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p

PREECE, J. Plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. p. 403-422. In: George, E.F.; Hall, M.A.; & De Klerk, G. (orgs.). **Plant Propagation by Tissue Culture.** Dordrecht, Springer, 2008.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 82, p. 59–121, 2002.

RAST, E.D; BEATON, J.A.; SONDERMAN, D.L. Photographic guide to selected external defect indicators and associated defects in black walnut. Broomall: United States Department of Agriculture, 1988.

REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmento foliar. **Cultivo in vitro de Plantas Medicinais**, p. 35, 2009

REFLORA. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em 13 Mar. 2017.

REITZ, R. & KLEIN, R.M. 1978. **Projeto Madeira de Santa Catarina.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 378 p

RIBEIRO, F. A.; et al. Influência da anelagem e reguladores de crescimento na indução de brotação de cepas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 3, p. 247-254, 1992.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 26 p. 2008.

RICHTER, H. G. Mature Secondary Xylem. In: METCALFE, C. R. 1987. **Anatomy of the Dicotyledons** 2a . ed. Oxford, Claredon Press. III. 162-171 p. 1987.

RODRIGUES, A. P.; SERGIO, P. M.; TEIXEIRA, M. R.; PAIS, M. S. *In vitro* break of dormancy of axillary buds from woody species (*Persea indica* and *Arbutus unedo*) by sectioning with a laser beam. **Plant Science** 161(1): 173-178. 2001.

RODRIGUES, L. R. et al. Técnicas de asepsia en la micropropagación del aguacate (*Persea americana* Mill.). Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. v. 40, p. 195-199, 1996.

RODRIGUES, L. R.; FIOR, C. S.; LEONHARDT, C.; SILVA, L. C.; NILSON, A. D. Ensaios com o cultivo *in vitro* de explantes nodais de canela-sebo (*Persea venosa* Nees & Martius ex Nees). **Iheringia** 50: 99-112.1998.

ROSA, L. S. , WENDLING, I. , SOUZA JUNIOR, L. Brotações epicórmicas no resgate vegetativo de árvores selecionadas de *Ilex paraguariensis* st. Hil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3. 2003, Chapecó. **Anais**. [Chapecó]: EPAGRI, 2003.

ROWNTREE, J. K. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 87:191–201; 2006

SAADAT Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting shoot multiplication of *Persian walnut* (*Juglans regia* L.). **Scientia Horticulturae**, Amesterdam, v.95, n.1, p.257-260, 2002.

SAKAI, A.; SAKAI, S. A test for the resource remobilization hypothesis: tree prouting using carbohydrates from above-ground parts. **Annals of Botany**, v.82, p.213-216, 1998.

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

SANTIN, D. et al. Poda e anelamento em erva-mate (*Ilex paraguariensis*) visando à indução de brotações basais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 56, p. 97-104, 2008. SANTOS, C. G. Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. 2001. 110 f. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SANTOS, D. N. Caracterização de massas pró-embriogênicas em pinhão-manso (*Jatrophacurcas* L.). **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) — Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SATO, A. Y. et al. *Celtis* sp micropropagation: contamination and oxidation control. **Cerne**, v. 7, p. 117 – 123, 2001.

SILVA, da S. C. L; NOGUEIRA, P.; SEGATTO, C.; BORTOLOTTI, L. F.; LAJUS RESCHKE, C.; LUZ, da L. G. Rizogênese das estacas de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (vellozo) rohwer) através da utilização de fitohormônio. Revista científica eletrônica de agronomia, n. 28, 2015.

SILVA, J. G.; PERELLÓ, L. F. C. Conservação de espécies ameaçadas do Rio Grande do Sul através de seu uso no paisagismo. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, Piracicaba, v. 5, n. 4, p. 01-21, 2010.

SOMENSI, B. L. Avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica do extrato hidroalcoólico obtido das cascas de *Persea willdenovii* Kosterm (Lauraceae).

Dissertação. Universidade do Vale do Itajaí, 2015. L

SOUZA, A. V. et al. Germinação de embriões e multiplicação in vitro de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, p. 1532-1538. 2003.

STEINER, N. et al. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v.2, p. 20-28. 2008.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology** v. 2, p. 61-64, 1999.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas.** Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/237120652_Limitacoes_ao_processo_de_cultivo_in_vitro_de_especies_lenhosas Acesso em: 30 abril de 2016.

TEWARI, S.K.; KATIYAR, R.S.; RAM, B.; MISRA, P.N. Effect of age and season of harvesting on the growth, coppicing characteristics and biomass productivity of *Leucaena leucocephala* and *Vitex negundo*. **Biomass and Bioenergy**, v.26, p.229-234, 2004.

TISSERAT, B. **Embryogenesis, organogenesis na plant regeneration.** In: DIXON, R. A. (Ed.) Plant cell culture, a practical approach. Oxford: IRL Press, p.79-105, 1985.

VIEIRA, C. M. et al. **Especies de interesse conservacionista na Reserva ecológica de Macaé de Cima.** In: Lima & Guedes-Bruni (Coord.). Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica. 1a ed. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. p. 297 – 306, 1997.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J. M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology** 20: 921-928. 2000.

WEDLING, I; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**. V. 8, n.1, p.187 - 194, jan./dez. 2001.

WENDLING, I. Rejuvenescimento de clones de *eucalyptus grandis* pela técnica de miniestaquia e micropopragação seriada. Tese de doutorado em Ciência Florestal-Universidade Federal de Viçosa, MG. 2002.

WENDLING, I. et al. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomia Costarricense**, San Jose, Costa Rica, v. 33, n. 2, p. 309-319, 2009.

WITJAKSONO, R.E., LITZ, R.E. & PLIEGO-ALFARO, F. 1999. Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In Somatic embryogenesis in woody plants (S.M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v.5, p.197-214

WERF, H., van der & RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. Ann. Missouri. **Bot. Gard.** 83: 409-418. 1996.

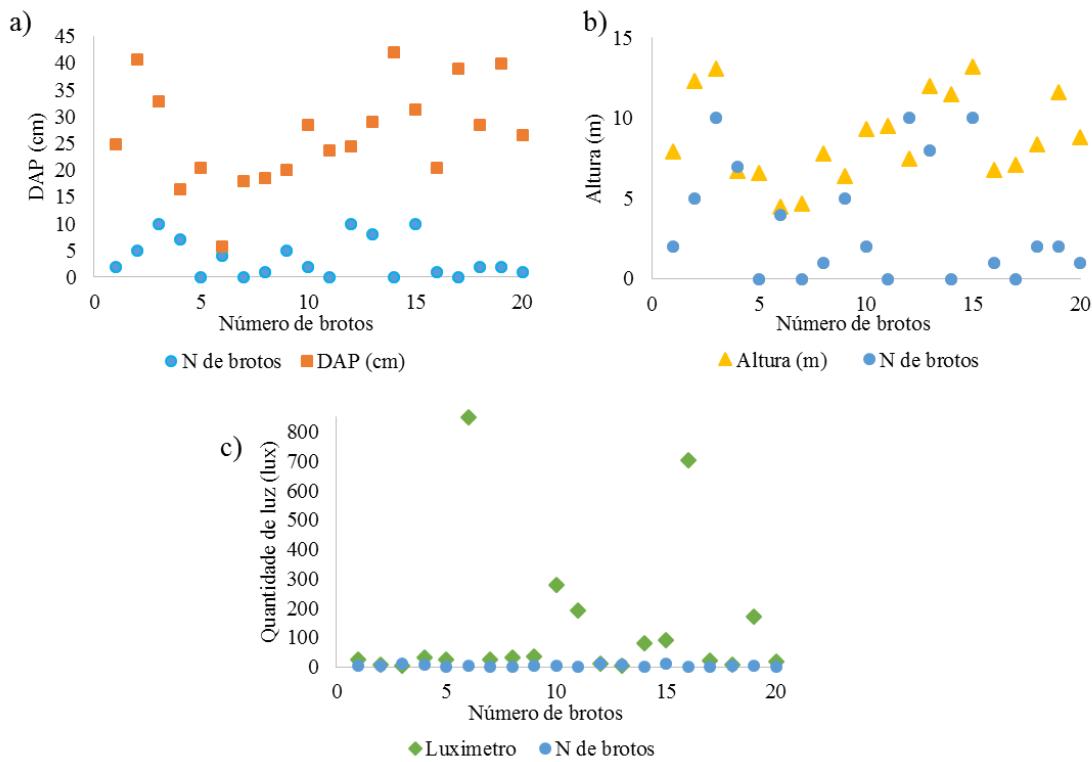
XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 272 p. 2009.

ZIMMERMAN, R .H. Apple. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V; YAMADA, U. **Handbook of plant cell culture**, New York, v.2, n.1, p.369-395, 1984.

ZIMMERMANN, M.; BROWN, C. L. **Trees structure and function**. New York, Spring Verlag, 336 p, 1974.

7 APÊNDICES

A) Correlação do número de brotos em função do DAP (a), altura (b) e índice de luz (c) na base do tronco em árvores de *P. willdenovii* submetidas as técnicas de resgate vegetativo (aos 120 dias após a aplicação dos tratamentos) ($p<0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

B) SOLUÇÃO ESTOQUE MEIO MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962):

Solução Estoque	Componentes	Concentração na solução estoque (1 L)	Concentração Final
A	NH_4NO_3	82,5 g	1,650 g.L^{-1}
B	KNO_3	95 g	1,9 g.L^{-1}
C	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	74 g 3,38 g 1,72 g 5 mg	370 mg.L^{-1} 16,9 mg.L^{-1} 8,6 mg.L^{-1} 0,025 mg.L^{-1}
D	CaCl_2 ou $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	66,6 g 85,12 g	333 mg.L^{-1}
E	H_3BO_3 KH_2PO_4 Kl $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,24 g 34 g 166 mg 50 mg 5 mg	6,2 mg.L^{-1} 170 mg.L^{-1} 0,83 mg.L^{-1} 0,25 mg.L^{-1} 0,025 mg.L^{-1}
F	Na_2EDTA $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,725 g 5,57 g	37,25 mg.L^{-1} 27,85 mg.L^{-1}
G	Ác. Nicotínico Piridoxina Tiamina Glicina	50 mg 50 mg 50 mg 200 mg	0,5 mg.L^{-1} 0,5 mg.L^{-1} 0,5 mg.L^{-1} 2 MG.L^{-1}

C) Solução estoque Meio WPM (Wood Plant Media – Lloyd e McCown, 1980)

Solução estoque	Componentes	Concentração na solução estoque (1 L)	Concentração Final
A	NH ₄ NO ₃	40 g	400,0 g.L ⁻¹
B	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	55,6 g	556 mg.L ⁻¹
C	CaCl ₂ 2H ₂ O	9,6 g	96 mg.L ⁻¹
D	H ₃ BO ₃ KH ₂ PO ₄ NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,62 g 17,0 g 0,025 g	6,2 mg 170 mg 0,25 mg
E	MgSO ₄ 7H ₂ O MnSO ₄ H ₂ O ZnSO ₄ 7H ₂ O CuSO ₄ 5H ₂ O	37 g 2,23 g 0,860 g 0,025 g	370 mg 22,3 mg 8,6 mg 0,25 mg
F	Na ₂ EDTA FeSO ₄ 7H ₂ O	3,73 g 2,78 g	37,3 mg.L ⁻¹ 27,8 mg.L ⁻¹
G	Ác. Nicotínico Piridoxina Tiamina	0,100 g 0,100 g 1 g	1 mg.L ⁻¹ 1 mg.L ⁻¹ 10 mg.L ⁻¹