Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Propagação clonal de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

Eveline Calderan Meneghetti

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2020

Eveline Calderan Meneghetti
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Propagação clonal de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Meneghetti, Eveline Calderan
Propagação clonal de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* / Eveline Calderan Meneghetti. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2020.

99 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Pínus híbrido 2. Minijardim clonal 3. Cultura *in vitro* 4. Enraizamento I. Título

À minha família,
de modo especial aos meus pais Evaldo e Angela,
exemplos de fé e amor!

Dedico

Ao meu esposo Guilherme, por ser meu porto seguro e
ao nosso filho Lucas, sal e luz de nossas vidas!

Ofereço

"A fé e a razão constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva à contemplação da verdade".

São João Paulo II

AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, Filho e Espírito Santo, que pela intercessão de Maria, me sustentaram e me deram sabedoria para concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcilio de Almeida, meu chefe e orientador, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma.

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, pela amizade, conselhos e por sempre me lembrar: "... e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz. Eu sei que a vida devia ser bem melhor e será, mas isso não impede que eu repita é bonita, é bonita e é bonita." (Adaptado de: "O que é? O que é?" Gonzaguinha).

Ao Grupo Pinus Brasil, principalmente ao Sr. Henrique Souza Fernandes, Ricardo Dias Fernandes e Celso Dias Fernandes, pela disponibilização do material vegetal utilizado nesta tese e por todas as informações cedidas.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/ USP), especialmente aos professores e colegas do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela contribuição em minha formação pessoal e profissional.

Ao Departamento de Ciência Biológicas (ESALQ/USP), que permitiu que eu conciliasse o trabalho à pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fernando A. Piotto, pela ajuda nas análises dos dados e pelo incentivo nos momentos desafiadores.

À querida Solizete, secretária da Pós-Graduação (ESALQ/USP), pela paciência, prontidão e alegria com que sempre me atendeu.

Ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas: Aline, Erika, Gabi, Ordilena, Rafinha, Renan, Matheus, Rodrigo, Gabriel, Dreyphus, Eloísa, Kéxa, Oliva, Guilherme, Lígia, Nathan, Victor e Isadora, sem vocês este trabalho não teria se concretizado, obrigada por toda ajuda e pelos cafés!

Agradeço também aos amigos que o laboratório me deu e que apesar da distância fazem parte da minha vida: Germana, Marilia, Natália, Kathy, Fabi, Leandro, Lívia e Chico.

Às amigas que ganhei durante a graduação: Cigana (Aline S.), Cui-k (Aline B.), Gasper (Thais), Keini, Relva (Juliana) e ½ a ½ (Mariana), pela amizade, respeito e apoio. Vocês são incríveis!

À minha psicóloga Priscila Pousa, por me ajudar a encontrar equilíbrio!

À toda equipe do Centro de Convivência Infantil "Ermelinda Ottoni de Souza Queiroz", em especial à diretora Sandra de Fátima Cruz, por tanto carinho e cuidado com nossa familia!

À minha mãe Angela e meu pai Evaldo, por todo amor e por me ajudarem com o Lucas quando voltei da licença maternidade, e depois nas férias esolares e durante os dias de enfermidades, sem o suporte de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui!

À minha irmã Karine, pelas conversas infinitas e pelas revisões de formatação, ao meu cunhado Caio, pelas correções e ajuda com a tradução para o inglês.

Ao meu esposo Guilherme, pelo companheirismo, respeito e amor em todos os momentos e por me ajudar a conquistar metas que eu nunca teria conseguido se não estivesse ao meu lado!

Ao meu filho Lucas, por me transformar a cada dia, por trazer novo sentido à minha vida, por me fazer rever valores e reestruturar meus sonhos, além de mostrar o que é o amor incondicional!

E por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero "Muito obrigada!".

SUMÁRIO

RESUMO..... 10

ABSTRACT..... 11

INTRODUÇÃO..... 13

Referências 16

1 SELEÇÃO DE MATRIZES PARA OTIMIZAÇÃO DA PROPAGAÇÃO DE *Pinus elliottii x Pinus caribaea*..... 19

Resumo 19

Abstract..... 19

1.1 Introdução 19

1.2 Material e Métodos..... 21

1.2.1 Localização da área experimental 21

1.2.2 Material vegetal 21

1.2.3 Preparo das miniestacas 23

1.2.4 Avaliações morfofisiológicas 24

1.2.5 Análise dos dados 24

1.3 Resultados e Discussão..... 25

1.4 Considerações Finais..... 29

Refefências..... 30

2 BALANÇO AUXINA/CITOCININA NA MORFOGÊNESE DO HÍBRIDO *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* 33

Resumo 33

Abstract..... 33

2.1 Introdução 34

2.2 Material e Métodos..... 35

2.2.1 Localização da área experimental 35

2.2.2 Material vegetal 36

2.2.3 Introdução e estabelecimento *in vitro* 36

2.2.4 Indução morfogênica 37

2.2.5 Análise dos dados 39

2.3 Resultados e Discussão..... 39

2.3.1 Introdução e estabelecimento do material *in vitro*..... 39

2.3.2 Indução morfogênica 40
2.4 Considerações Finais 46
Referências 47
3 OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* 51
Resumo 51
Abstract 51
3.1 Introdução 52
3.2 Material e Métodos 53
3.2.1 Localização da área experimental 53
3.2.2 Material vegetal 54
3.2.3 Introdução e estabelecimento *in vitro* 54
3.2.4 Multiplicação *in vitro* Fase I 55
3.2.5 Multiplicação *in vitro* Fase II 57
3.2.6 Alongamento 57
3.2.7 Análise dos dados 58
3.3 Resultados e Discussão 58
3.3.1 Introdução e estabelecimento *in vitro* 58
3.3.2 Multiplicação *in vitro* Fase I 59
3.3.3 Multiplicação *in vitro* Fase II 65
3.3.4 Alongamento 71
3.4 Considerações Finais 75
Referências 76
4 INDUÇÃO AO ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DO HÍBRIDO *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* 81
Resumo 81
Abstract 81
4.1 Introdução 82
4.2 Material e Métodos 83
4.2.1 Localização da área experimental 83
4.2.2 Material vegetal 83

4.2.3 Experimento I 84
4.2.4 Experimento II 85
4.2.5 Análise Histológica e Histoquímica 86
4.2.6 Análise dos dados 87
4.3 Resultados e Discussão 87
4.3.1 Experimento I 87
4.3.2 Experimento II 89
4.3.3 Análise Histológica e Histoquímica 91
4.4 Considerações Finais 94
Referências 94
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS 97
ANEXO 99

RESUMO

Propagação clonal de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

O gênero *Pinus* apresenta elevado interesse no setor brasileiro de árvores plantadas visto seu uso potencial em diversos setores industriais, o híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* apresenta características silviculturais competitivas, todavia ainda são poucos os trabalhos que abordam sua propagação. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a propagação clonal de *P. elliottii* x *P. caribaea*, utilizando técnicas de miniestaquia e micropropagação. Para tanto, o trabalho foi dividido em quatro capítulos, no primeiro buscou-se otimizar a propagação do híbrido pela seleção de matrizes, o segundo avaliou a atuação do balanço auxina/citocinina na morfogênese *in vitro*, o terceiro buscou a otimização de protocolo para a micropropagação e por fim, o quarto capítulo abordou a indução ao enraizamento de microestacas. A seleção de matrizes com o uso do Índice Multiplicativo para os caracteres dias para enraizamento e crescimento em altura foi confirmada pela análise de parâmetros genéticos estimados, mostrando a eficiência da seleção realizada. O balanço auxina/citocinina e o tipo de explante mostraram-se de extrema importância na organogênese do híbrido, a combinação 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA, 0,50 $mg.L^{-1}$ de BAP e a utilização dos segmentos nodais apresentaram o maior número médio de brotações, enquanto o desenvolvimento de raízes adventícias ocorreu predominantemente no tratamento 0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA e 0,09 $mg.L^{-1}$ de BAP nos segmentos apicais. O meio de cultura WV5 suplementado com 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA e 0,50 $mg.L^{-1}$ de BAP conduziu a uma maior formação de brotações tanto nos segmentos apicais quanto nos nodais em relação ao meio de cultura WPM com os mesmos reguladores de crescimento para a maior parte das matrizes analisadas; o uso de segmentos apicais como fornecedores de segmentos nodais mostrou-se importante para o estabelecimento de algumas matrizes; o carvão ativado apresentou respostas positivas e negativas na fase de alongamento dependendo da matriz, de modo que constatamos elevada influência do genótipo no desenvolvimento *in vitro* do híbrido, com isso, protocolos específicos devem ser adaptados para cada matriz. A indução ao enraizamento de microestacas mostrou-se um desafio; a melhor porcentagem de enraizamento *in vitro* (31,3%) ocorreu no tratamento com o meio de cultura ½ WV5 suplementado com 0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA e 20,0 $g.L^{-1}$ de sacarose sob exposição contínua à auxina. Dessa forma, conseguimos otimizar a propagação do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* via miniestaquia pela seleção de matrizes e desenvolvemos um protocolo básico para a micropropagação a partir de miniestacas possibilitando perspectivas para futuros estudos principalmente relacionados ao enraizamento.

Palavras-chave: Pínus híbrido, Minijardim clonal, Cultivo *in vitro*, Enraizamento

ABSTRACT

Clonal propagation of *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

The genus *Pinus* present high interest to the Brazilian planted tree industry because of its potential use in several industrial sectors, the *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* hybrid has competitive silvicultural characteristics, but there are still few studies that address its propagation. Thus, the present work aimed to optimize the clonal propagation of *P. elliottii* x *P. caribaea* using minicutting and micropropagation techniques. Therefore, the work was divided into four chapters. In the first we tried to optimize the propagation of the hybrid by matrix selection, the second evaluated the auxin/cytokine balance performance in vitro morphogenesis, the third sought to optimize the protocol for micropropagation and finally, the fourth chapter dealt with the induction of microcutting rooting. The matrices selection using the Multiplicative Index for the days characters for rooting and height growth was confirmed by the estimated genetic parameters analysis, showing the selection efficiency performed. Auxin/cytokine balance and explant type were extremely important to the organogenesis of the hybrid, the NAA 0.05 $mg.L^{-1}$, BA 0.50 $mg.L^{-1}$, and nodal segments higher average number of shoots, while adventitious root development occurred predominantly in the treatment of 0.27 $mg.L^{-1}$ NAA and 0.09 $mg.L^{-1}$ BA in the apical segments. WV5 culture medium supplemented with 0.05 $mg.L^{-1}$ NAA and 0.50 $mg.L^{-1}$ BA led to higher shoot formation in both apical and nodal segments compared to WPM culture medium with the same growth regulators for most of the matrices analyzed; the use of apical segments as nodal segment suppliers proved to be important for the establishment of some matrices; activated charcoal showed positive and negative responses in the elongation phase depending on the matrix, thus we found a high genotype influence on the in vitro development of the hybrid, consequently specific protocols must be adapted for each matrix. The induction of microcutting rooting was a challenge; the best percentage of in vitro rooting (31.3%) occured in the treatment with culture medium WV5 supplemented with 0.27 $mg.L^{-1}$ NAA and 20,0 $g.L^{-1}$ sucrose on continuous exposure to auxin. In this way, we were able to optimize the propagation of the *P. elliottii* x *P. caribaea* hybrid via minicutting through matrices selection and developed a basic protocol for micropropagation from minicuttings, providing perspectives for future studies mainly related to rooting.

Keywords: Hybrid pine, Clonal minigarden, In vitro culture, Rooting

INTRODUÇÃO

O setor brasileiro de árvores plantadas tem chamado a atenção nas últimas décadas por destacar-se como referência mundial pelas atividades de inovação, competitividade e sustentabilidade que coloca o Brasil entre os maiores produtores mundiais de papel, celulose e painéis, levando a taxas de exportação que beneficia a balança comercial nacional, gera empregos e renda por todo o país (Ibá 2019).

Os plantios dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* são os líderes do setor e apresentam elevada competitividade visto que são madeiras de baixo custo, formam florestas eficientes e produtivas, suportadas por certificação florestal que contribuem para a preservação das florestas naturais do país, além de fornecerem recursos renováveis e atuarem na absorção e manutenção de estoques de carbono (Foelkel 2007).

No Brasil, o plantio comercial do gênero *Pinus* iniciou-se na década de 60 no Estado de São Paulo devido à necessidade das indústrias de produção de madeira serrada, chapas de laminados, painéis e de produção de celulose, fornecendo fibras longas importantes na produção de papéis com maior resistência mecânica e melhor absorção de tinta, sendo que após alguns anos iniciou-se também a exploração de goma-resina (Kronka *et al.* 2005; Shimizu 2008).

Nesse aspecto o fornecimento de goma-resina levou o cultivo do *Pinus* sp à uma atividade econômica relevante no setor brasileiro de árvores plantadas devido aos seus sub-produtos do processo de destilação. A parte volátil é denominada terebintina, utilizada como solvente e como matéria-prima na indústria química e farmacêutica; e a parte sólida, conhecida como breu, é utilizada na fabricação de plásticos, tintas, vernizes, adesivos, lubrificantes, inseticidas e germicidas, atendendo a uma infinidade de indústrias dos mais diversificados setores (Kronka *et al.* 2005; Shimizu 2008; Aguiar *et al*. 2011).

Atualmente existe cerca de 1,6 milhão de hectares com o cultivo do gênero *Pinus* no Brasil, a região Sul do país concentra a maior área de produção, sendo o

Estado do Paraná o maior produtor nacional, responsável por 42% de todo o cultivo. O Estado de São Paulo por sua vez, ocupa a quarta colocação entre os estados produtores atingindo a marca de 8% de toda a produção nacional (Ibá 2019).

Essa distribuição ocorre pela divisão das regiões de clima temperado e de clima tropical e subtropical. Na região de clima temperado ocorre o plantio principalmente das espécies *P. elliottii* e *P. taeda*, por apresentam resistência à geada. Já a região de clima tropical e subtropical predomina o plantio das espécies *P. caribaea*, *P. kesiya, P. maximinoi, P. oocarpa*, *P. patula* e *P. tecunumanii*, visto que não toleram geadas, mas são sujeitas à períodos de deficiência hídrica (Shimizu 2008; Aguiar *et al*. 2011).

A hibridação de *P. elliottii* x *P. caribaea* foi primeiro descrita no ano de 1955, em Queensland, Austrália (Nikles 2000). Apresenta elevada superioridade híbrida decorrente da recombinação complementar de propriedades silviculturais competitivas de seus genitores como: taxa de crescimento, qualidade superior de ramos e madeira mais uniforme de *P. caribaea*, combinada com alta densidade de madeira, retidão de caule, resistência ao vento, ao frio e adaptabilidade aos locais úmidos, além de elevada produção de goma-resina de *P. elliottii* (Dieters *et al.* 1995; Dieters & Brawner 2007).

Devido a tais caracteristicas favoráveis, a demanda por mudas desse hídrido tem aumentando, principalmente em regiões que tradicionalmente realizavam plantio de *P. elliottii* (Nunes *et al.* 2018). Todavia, a produção de mudas é dificultada em decorrência da limitada fonte de sementes, associado ao fato de apresentar elevada heterogeneidade, fatores que contribuem para um maior interesse em sua propagação (Lv & Huang 2012).

A produção de mudas propagadas permite a multiplicação clonal de matrizes selecionadas com a herdabilidade de características que permitem a obtenção de ganhos em produtividade e propriedades tecnológicas da madeira, além de resistência a fatores bióticos e abióticos (Assis & Mafia 2007).

Nesse contexto, a miniestaquia tem se mostrado o método preferido para propagação deste híbrido, visto que é um método econômico e que exige mão de obra menos especializada em relação à micropropagação. Porém, com o amadurecimento das cepas, verifica-se uma crescente diminuição na taxa de enraizamento, além do desenvolvimento de sistemas radiculares inferiores em relação ao material juvenil (Rasmussen *et al.* 2009).

Já a micropropagação apresenta diversos pontos favoráveis a serem considerados, quando aplicada em programas de melhoramento florestal permite acelerar o processo para o uso final desejável, além de apresentar bons resultados na multiplicação de material de interesse e às melhores taxas de enraizamento, decorrente dos sucessivos subcultivos que levam ao resgate da juvenilidade (Campbell *et al*. 2003; Xavier *et al.* 2013).

Porém, apesar de todas as vantagens, poucos trabalhos abordam o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas para a propagação em massa desse híbrido (Nunes *et al.* 2018). Além disso, comparado à outras plantas, a cultura de tecidos de espécies florestais é dificultada, ainda mais em espécies com a produção de goma-resina e outros metabólitos que tornam-se entraves no desenvolvimento de protocolos eficientes de micropropagação (Lv & Huang 2012).

Nesse contexto, o excelente potencial do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea*, justifica o desenvolvimento de pesquisas que busquem alternativas para a superação desses desafios e contribuam para o seu desenvolvimento no setor silvicultural, dessa forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a propagação clonal de *P. elliottii* x *P. caribaea*, utilizando técnicas de miniestaquia e micropropagação. Para isso, quatro capítulos foram desenvolvidos:

1. Seleção de matrizes para otimização da propagação de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*
2. Balanço auxina/citocinina na morfogênese do híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

3. Otimização de protocolo para a micropropagação de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*
4. Indução ao enraizamento de microestacas do híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

Referências

Aguiar AV, Sousa VA, Fritzsons E, Pinto Junior JE (2011) Programa de melhoramento de *Pinus* da Embrapa Florestas, Documentos Embrapa Florestas 81p

Assis TF, Mafia, RG (2007) Hibridação clonagem. In: Borém A (ed) Biotecnologia Florestal, Viçosa, pp 93-121

Campbell MM, Brunner AM, Jones HM, Strauss SH (2003) Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. Plant Biotechnology Journal 1(3):141–154

Dieters M, Brawner J (2007) Productivity of *Pinus elliottii*, *P. caribaea* and their F1 and F2 hybrids to 15 years in Queensland, Australia. Annals of Forest Science 64 (7), 691–698. 10.1051/forest:2007049.

Dieters MJ, Nikles DG, Toon PG, Pomroy P (1995) Hybrid superiority in forest trees – concepts and application. In: Potts BM, Borralho NMG, Reid JB, Cromer RN, Tibbits WN, Raymond CA (Eds) Eucalypt plantations: Improving fibre yield and quality, Proc. CRC- IUFRO Conf. CRC for Temperate Hardwood Forestry, Hobart, pp152–155

Foelkel C (2007) As plantações de florestas no Brasil. In: Borém A (Ed) Biotecnologia florestal. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, pp13-24

Ibá (2019) Industria Brasileira de Árvores, Relatório 2019, São Paulo, 80p

Kronka FJN, Bertolani F, Herrera Ponce R (2005) A cultura do *Pinus* no Brasil. São Paulo, 160p

Lv C, Huang B (2012) Stem Tissue Culture of *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea.* International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, 1700-1703. 10.1109/iCBEB.2012.366

Nikles DG (2000) Experience with some *Pinus* hybrids in Queensland, Australia. In: Dungey HS, Dieters MJ, Nikles DG (Eds) Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium: Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Noosa, Queensland, pp 27-43

Nunes S, Marum L, Farinha N, Pereira VT, Almeida T, Sousa D, Mano N, Figueiredo J, Dias MC, Santos C (2018) Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 132:71–84. 10.1007/s11240-017-1311-7

Rasmussen A, Smithe TE, Hunt MA (2009) Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in diferente temperature environments. New Forest 38: 285-294

Shimizu JY (2008) *Pinus* na Silvicultura Brasileira. Embrapa Florestas, 223p

Xavier A, Wendling I, Silva RL (2013) Silvicultura Clonal: princípios e técnicas. Viçosa, MG. Ed. UFV. 279p

1 SELEÇÃO DE MATRIZES PARA OTIMIZAÇÃO DA PROPAGAÇÃO DE *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

Resumo

A propagação do híbrido *Pinus elliottii x Pinus caribaea* é de elevado interesse para o setor de árvores plantadas visto seu potencial na geração de recursos e pela fonte limitada de sementes. O objetivo deste trabalho foi selecionar matrizes do híbrido que apresentassem enraizamento adventício precoce associado a crescimento em altura, a fim de desenvolver uma estratégia de seleção para a otimização de sua propagação clonal. Para isso, miniestacas de 120 minicepas de um minijardim clonal foram analisadas em relação à sobrevivência, enraizamento e crescimento em altura pela aplicação do Índice Multiplicativo (IM). A análise de parâmetros genéticos estimados confirmou a eficiência da seleção realizada. Dessa forma, o IM mostrou-se uma ferramenta útil para a seleção de matrizes a fim de tornar o processo de produção clonal de mudas mais eficiente.

Palavras-chave: Índice multiplicativo, Ganho genético, Miniestaquia, Enraizamento

Abstract

The *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* hybrid propagation is a great interest to the planted tree sector given its potential for resource generation and limited seed supply. The objective of this work was to select hybrid matrices that presented early adventitious rooting associated with growth in height, in order to develop a selection strategy for the optimization of its clonal propagation. For this, minicuttings of 120 miniceps of a clonal minigarden were analyzed for survival, rooting and height growth by applying the multiplicative index (MI). The analysis of estimated genetic parameters confirmed the efficiency of the selection performed. Thus, MI proved to be a useful tool for matrix selection in order to make the clonal seedling production process more efficient.

Keywords: Multiplicative index, Genetic gain, Minicutting, Rooting

1.1 Introdução

A demanda mundial por madeira e seus produtos aliada ao apelo pela conservação dos recursos naturais, levam a busca por espécies florestais que apresentem rápido crescimento a fim de atender diversos setores industriais (Silva *et*

al. 2011). O híbrido *Pinus elliottii x Pinus caribaea*, se enquada nesse grupo, considerando seu rápido crescimento em relação à outras espécies do gênero, além de sua precocidade e maior produtividade por hectare, o que conduzem a uma diminuição dos custos operacionais e a um rápido retorno financeiro, aliado à uma ótima produção de goma-resina durante todo o ano, o tornam um potencial gerador de recursos e investimentos (Almeida *et al.* 2012).

Todavia, a produção de mudas desse híbrido por sementes não atende a demanda comercial, visto que a fonte de sementes é limitada, portanto, a produção comercial de mudas tem sido realizada pelo estabelecimento de minijardins clonais oriundos de minicepas provenientes de sementes via cruzamentos controlados (Lv & Huang 2012; Xavier *et al.* 2013). Esse sistema de produção de mudas depende do enraizamento adventício das miniestacas, e este processo ainda é um entrave na silvicultura de coníferas que são consideradas difíceis de enraizar, além disso, diversos fatores afetam o potencial de enraizamento como: idade, nutrição mineral e condições fisiológicas da planta fornecedora das miniestacas, substrato de enraizamento, condições ambientais e principalmente o genótipo (Mott & Amerson 1981; Bergmann & Stomp 1994; Xavier *et al.* 2013).

Considerando esses importantes parâmetros para a produção comercial de mudas e para que ocorra o estabelecimento de plantios produtivos, é urgente o desenvolvimento de técnicas adequadas na silvicultura e no melhoramento genético que permitam que genótipos superiores sejam identificados, como métodos de seleção capazes de explorar o material genético disponível, atuando no aumento do ganho genético sobre às características de interesse, principalmente em relação ao enraizamento adventício, de modo que materiais com maior potencial para esse parâmetro sejam selecionados precocemente (Mori 1988; Oda *et al.* 2007; Burin *et al.* 2018a).

Com isso, pode-se aplicar índices de seleção que tem o objetivo de identificar genótipos superiores para os parâmetros analisados, permitindo um contínuo aumento da produtividade florestal (Silva *et al.* 2011). Dentre os índices de seleção

desenvolvidos, o Índice Multiplicativo (IM) descrito por Elston (1963) tem sido aplicado em diversos trabalhos de melhoramento do gênero *Pinus* apresentando bons resultados em relação a outros índices (Moraes Neto & Melo 2006).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma estratégia de seleção para identificar matrizes de um minijardim clonal que apresentassem enraizamento precoce aliado a uma excelente taxa de crescimento em altura, a fim de otimizar a produção massal de mudas clonais de *P. elliottii* x *P. caribaea* em viveiros florestais.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Localização da área experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciências Florestais, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, Piracicaba, São Paulo.

1.2.2 Material vegetal

Para a realização deste estudo foram utilizadas miniestacas de *P. elliottii x P. caribaea* provenientes de minicepas (Figura 1) formadas partir de mudas seminais e então mantidas em canaletão de areia lavada constituindo um minijardim clonal com aproximadamente seis meses de idade localizado na Fazenda Pedra Maria do grupo Pinus Brasil na cidade de Buri, São Paulo.

Figura 1. Exemplo de minicepa utilizada para a coleta de miniestacas.

Antes da coleta foram escolhidas, dentro do sistema de produção de mudas, 120 minicepas (matrizes) que apresentavam elevada formação de miniestacas e com execelente vigor, de modo que essas características foram previamente selecionadas. A coleta foi realizada no dia 21/07/2016, onde quatro miniestacas com aproximadamente 8,0 cm de comprimento e 0,3 cm de espessura, de cada matriz foram armazenadas em uma caixa de isopor e enviadas para o Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, Piracicaba, São Paulo.

Com o recebimento das miniestacas, o material foi separado para a realização de dois experimentos, de modo que três miniestacas de cada uma das 120 matrizes foram encaminhadas para o procedimento de miniestaquia e as miniestacas restantes foram utilizadas no experimento de micropropagação descrito no Capítulo 2 desta tese conforme pode ser observado na Figura 2.

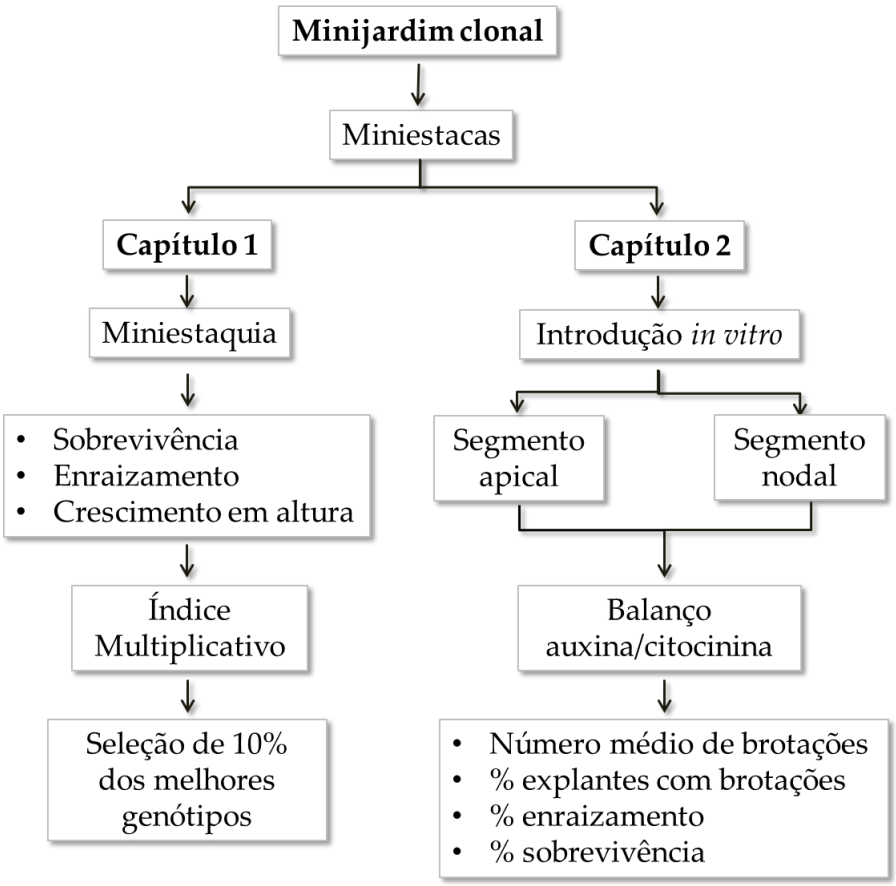

Figura 2. Resumo esquemático do uso das miniestacas para o desenvolvimento dos experimentos descritos no Capítulo 1 e 2 desta tese.

1.2.3 Preparo das miniestacas

As miniestacas de cada uma das matrizes tiveram suas folhas primárias do terço basal reduzidas à 2,0 mm de comprimento e a extremidade proximal foi cortada em bisel exatamente antes do procedimento de estaquiamento para diminuir a obstrução dos vasos condutores por goma-resina. Com isso, o material foi estaqueado em tubetes de 12,0 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro com capacidade total de 120 cm^3, preenchido com substrato comercial Vida Verde Florestal®.

Em seguida, as miniestacas foram mantidas em casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente sob acionamento das 8 às 17h a cada 15 minutos por 18 segundos, temperatura média de 25,0 °C e umidade relativa do ar de aproximadamente 80%. Aos 90 dias (3 meses) todo o material foi transferido para a

condição de pleno sol onde passou a ser irrigado por aspersão às 7, 9, 11, 13, 15 e 17h por três minutos.

1.2.4 Avaliações morfofisiológicas

As avaliações de sobrevivência, enraizamento e de dias para o enraizamento (DE) das miniestacas ocorreram a cada sete dias nos primeiros 90 dias (3 meses), após esse período foram realizadas a cada 15 dias até os 180 dias (6 meses) e posteriormente a cada 30 dias até os 240 dias (oito meses).

Para as avaliações de enraizamento e de DE, considerou-se como enraizada a miniestaca que apresentou raiz na extremidade inferior do tubete no dia da avaliação. A coleta de dados para crescimento em altura foi realizada utilizando-se uma régua graduada, do colo até o ápice da miniestaca, a avaliação ALT1 ocorreu aos 180 dias (seis meses) e ALT2 aos 240 dias (oito meses) após o estaquiamento.

1.2.5 Análise dos dados

Os dados foram submetidos ao Índice Multiplicativo (IM) conforme Elston (1963), a fim de classificar as matrizes com base na combinação dos parâmetros dias para enraizamento (DE) e crescimento em altura (ALT1 e ALT2), de modo a selecionar matrizes que desenvolvessem raízes adventícias em menos dias e com maior crescimento em altura nas duas avaliações.

Além disso, realizamos a análise de parâmetros genéticos estimados, pelo método dos quadrados mínimos, para os caracteres submetidos ao IM e aplicamos a análise de correlação de Pearson sobre os dados de sobrevivência e enraizamento aos 90 e 240 dias, para tanto utilizamos o software R versão 3.6.1.

1.3 Resultados e Discussão

A propagação a partir de um minijardim clonal oriundo de sementes obtidas via cruzamentos controlados apresenta aspectos favoráveis e desfavoráveis, dentre os favoráveis destaca-se a produção de materiais superiores que apresentam quantidade insuficiente de sementes e aumento da produtividade e adaptabilidade devido a propagação de diversos genótipos (heterogeneidade) (Xavier *et al.* 2013).

Dentre os desfavoráveis ressalta-se a impossibilidade em se clonar um genótipo adulto específico, visto que a propagação ocorre a partir de um minijardim clonal oriundo de sementes, e a heterogeneidade que pode se tornar um problema devido à dificuldade no desenvolvimento de protocolos de produção massal, pois cada indivíduo apresenta características distintas, principalmente em relação ao enraizamento que é um dos gargalos da produção clonal em larga escala (Xavier *et al.* 2013).

Nesse contexto, a Figura 3 mostra a elevada heterogeneidade das 120 minicepas para os parâmetros (DE e ALT2) e como o IM permitiu selecionar as matrizes que apresentavam os melhores resultados para esses parâmetros.

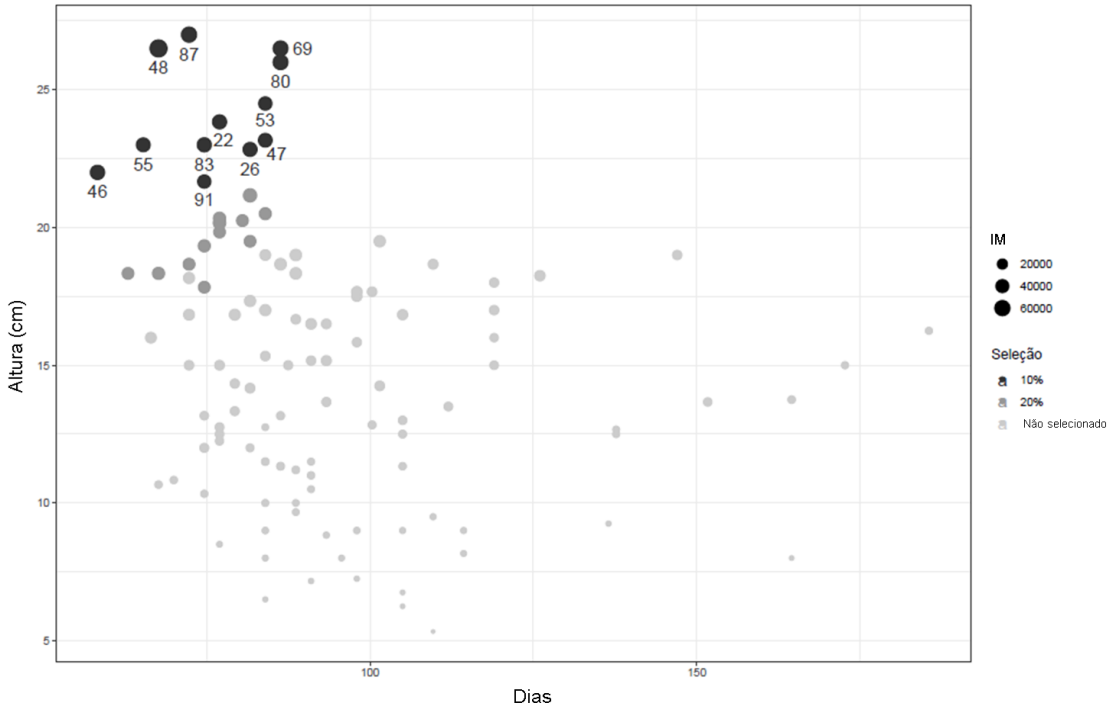

Figura 3. Matrizes de *P. elliottii* x *P. caribaea* em relação aos parâmetros dias para enraizamento (DE) e crescimento em altura (ALT2). Em preto 10% das melhores matrizes para esses parâmetros, em cinza escuro as que se enquadraram nas 20% melhores e em cinza claro as que não foram selecionadas.

A análise dos parâmetros genéticos estimados apresentada na Tabela 1, confirma a eficiência do IM para a seleção de matrizes. Em relação à DE as médias esperadas (10% e 20%) são menores que à média geral ($\bar{x}$), ou seja, o IM selecionou as matrizes que apresentaram enraizamento em menos dias e para as duas análises de crescimento em altura (ALT1 e ALT2), as médias esperadas (10% e 20%) são maiores que à média geral ($\bar{x}$), visto que o IM selecionou as matrizes que apresentaram maior altura no período de avaliação.

Tabela 1. Estimativa dos parâmetros genéticos de 120 minicepas de *P. elliottii x P. caribaea* para dias para enraizamento (DE) e crescimento em altura (ALT1 e ALT2).

Parâmetros estimados	DE	ALT1	ALT2
$\bar{x}$	92,80	12,88	15,21
$\hat{\Phi}_G$	323,77	13,80	18,95
$\hat{H}^2$	0,69	0,85	0,85
CV (%)	22,44	20,77	20,50
CVg (%)	19,39	28,85	28,62
CVg/CV	0,86	1,39	1,40
Gs (10%)	11,75* [17,45]	6,50 [6,70]	7,61 [7,84]
Gs (20%)	11,83 [14,99]	3,15 [5,24]	3,62 [6,01]
Média Esperada (10%)	81,05 [75,35]	19,38 [19,58]	22,82 [23,05]
Média Esperada (20%)	80,97 [77,81]	16,03 [18,12]	18,83 [21,22]

Onde: $\bar{x}$: média. $\hat{\Phi}_G$: estimativa do componente quadrático associado à variabilidade genotípica. $\hat{H}^2$: coeficiente de determinação genotípica. CV (%): coeficiente de variação experimental. CVg (%): coeficiente de variação genotípica. Gs: ganho de seleção. * seleção com base no IM em conjunto. [ ] seleção com base nos parâmetros individuais.

Vale ressaltar que ganho de seleção para DE poderia ser ainda maior se a aplicação do IM houvesse sido realizada apenas para esse parâmetro, como pode ser observado nos valores entre colchetes da Tabela 1. Todavia, como o IM foi calculado combinando DE e duas avaliações de ALT, o ganho individual para cada parâmetro foi menor, contudo, o IM ajudou a selecionar o ganho em conjunto.

Em relação aos outros parâmetros estimados na Tabela 1, verifica-se o elevado valor do coeficiente de variação genotípica (CVg) o que sugere a possibilidade de ganhos genéticos pela aplicação da seleção, evidenciando ainda que análises de melhoramento desses materiais são promissoras (Pires *et al.* 1996). Além disso, a relação entre o coeficiente de variação genotípica e o coeficiente de variação experimental (CVg/CV) foi superior a 1,0 para os caracteres ALT1 e ALT2, uma condição desejável no processo de seleção, visto que a variação genética supera a variação ambiental (Massaro *et al.* 2010). Todavia, segundo Resende (2007) valores

próximos a 0,82 também podem ser aceitos, dessa forma para DE o valor 0,86 pode ser considerado satisfatório.

Ainda nesse contexto, as estimativas dos coeficientes de determinação genotípica ($\hat{H}^2$) foram elevadas para todos os caracteres analisados, sendo favoráveis à seleção (Botrel *et al.* 2007), de modo que podemos inferir que esses caracteres estão sob forte controle genético, confirmando os dados de Borges *et al.* (2011) onde destacam o significativo componente genético para a capacidade de enraizamento adventício.

A partir desse processo, o técnico florestal do grupo Pinus Brasil realizou o plantio de mudas das matrizes (22, 26, 46, 47, 48, 53, 55, 69, 80, 83, 87 e 91) que se enquadraram nas 10% melhores para os parêmetros analisados, formando minijardins clonais com essas matrizes a fim de propagá-las separadamente das demais e otimizar a produção de mudas no viveiro. Com isso, a empresa destacou em seu relatório (dados não publicados) que dos 54% de enraizamento aos 90 dias após a estaquia, passou a atingir a porcentagem de 65% utilizando o material selecionado. Quando comparamos com os parâmetros estimados podemos confirmar os resultados esperados, além dos ganhos reais na produção de mudas pela empresa.

A análise de correlação entre sobrevivência e enraizamento aos 90 dias apresentou o valor de $r = 0,49$ ($p < 0,01$) e entre sobrevivência e enraizamento ao final do experimento (240 dias) o valor de $r = 0,96$ ($p < 0,01$), de modo que em ambos os casos foi significativo. O valor da correlação aos 90 dias foi menor, visto que parte das miniestacas analisadas ainda não haviam emitido raiz, porém mantinham-se vivas, já o elevado valor da correlação ao final do experimento confirma a correlação positiva entre esses parâmetros além de uma elevada dependêcia entre si, visto que ao final do experimento praticamente sobreviveram apenas as miniestacas que enraizaram.

Nossos resultados corroboram os dados obtidos por Burin *et al.* (2018b) que avaliaram o enraizamento de miniestacas para a seleção de clones de *Cabralea canjerana*, destacando a correlação entre sobrevivência e enraizamento adventício.

Com isso, ressaltamos que avaliações relacionadas ao enraizamento merecem destaque, visto que a longo prazo apenas o material enraizado sobrevive, além de ser capaz de realizar uma exploração eficiente do solo e apresentar fixação em campo (Saha *et al.* 2019).

Contudo, apesar da importância do enraizamento adventício na propagação de espécies de *Pinus,* não existe na literatura estudos que usam essa característica para a seleção de genótipos (Paludzyszyn Filho *et al.* 2002; Silva *et al.* 2011; Coutinho *et al.* 2017). Além disso, poucos trabalhos abordam a seleção precoce de matrizes, todavia como o tempo é um fator determinante em programas de melhoramento genético florestal (Beltrame *et al.* 2012), a seleção precoce de matrizes contorna o problema de escolha de materiais genéticos recalcitrantes à propagação como destaca Oliveira *et al.* (2015) em seu trabalho com *Eucalyptus cloeziana*.

Portanto, nosso trabalho comprova a importância da seleção precoce ao potencial de enraizamento adventício juntamente com caracteres já tradicionalmente avaliados para que com a seleção de genótipos superiores este possa ser propagado em larga escala.

1.4 Considerações Finais

A aplicação do Índice Multiplicativo mostrou ser eficiente para otimização da produção comercial de mudas de *P. elliottii* x *P. caribaea* e a análise de parâmetros genéticos estimados confirmou que a seleção pelos caracteres avaliados pode ser aplicada em matrizes do híbrido, resultando no aumento da porcentagem de miniestacas enraizadas em menos tempo.

Além disso, o uso desse índice abriu novas possibilidades para a aplicação em outros parâmetros relevantes no sistema de produção florestal, de modo a tornar o processo de seleção precoce de matrizes mais eficiente.

Referências

Almeida NF, Bortoletto Júnior G, Mendes RF, Surdi PG (2012) Avaliação da madeira de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* para produção de compensados. Scientia Forestalis 40(96):435-443

Beltrame R, Bisognin DA, Mattos BD, Cargnelutti Filho A, Haselein R, Gatto DA, Santos GA (2012) Desempenho silvicultural e seleção precoce de clones de híbridos de eucalipto. Pesquisa Agropecuária Brasileira 47(6):791-796. 10.1590/S0100-204X2012000600009

Bergmann BA, Stomp AM (1994) Effect of genotype on rooting of hypocotyls and in vitro-produced shoots of *Pinus radiata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:195-202

Borges SR, Xavier A, Oliveira LS, Melo LA, Rosado MA (2011) Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. Revista Árvore 35(3):425-434. 10.1590/S0100-67622011000300006

Botrel MCG, Trugilho PF, Rosado SCS, Silva JRM (2007) Melhoramento genético das propriedades do carvão vegetal de *Eucalyptus* spp. Revista Árvore 31(3):391-398. 10.1590/S0100-67622007000300004

Burin C, Bisognin DA, Lencina KH, Gimenes ES (2018a) Early selection of *Cabralea canjerana* for propagation by mini-cutting. Pesquisa Agropecuária Brasileira 53(9):1018-1024 10.1590/S0100-204X2018000800005

Burin C, Bisognin DA, Lencina KH, Somavilla TM, Pedroso MF (2018b) Enraizamento de miniestacas em diferentes épocas de coleta para a seleção de clones de canjerana. Revista Brasileira de Ciências Agrárias 13(2)1-7. 10.5039/agraria.v13i2a5530

Coutinho RT, Bespalhok Filho JC, Fritsche Neto R, Frizzo C (2017) Viabilidade da seleção precoce de *Pinus taeda* L. em diâmetro na altura do peito em programa de melhoramento genético. Scientia Forestalis 45(113):205-219. 10.18671/scifor.v45n113.21

Elston RC (1963) A weight free index for the purpose of ranking of selection with respect to several traits at a Biometrics. Alexandria 19:85-97

Lv C, Huang B (2012) Stem Tissue Culture of *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*. International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology 1700-1703. 10.1109/iCBEB.2012.366

Massaro RAM, Bonine CAV, Scarpinati EA, Paula RC (2010) Viabilidade de aplicação da seleção precoce em testes clonais de *Eucalyptus* spp. Ciência Florestal 20(4):597-609

Moraes Neto SP de, Melo JT de (2006) Índices de seleção para famílias de meios-irmãos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Planaltina, Embrapa Cerrados 21p

Mori ES (1988) Pomares de sementes florestais. Série Técnica IPEF 5(16):1– 27

Mott RL, Amerson HV (1981) A tissue culture process for the clonal production of loblolly pine plantlets. Technical Bulletin North Carolina Agricultural Research Service 271:3-14

Oda S, Mello EJ, Silva JF, Souza ICG (2007) Melhoramento florestal. In: Borém A (Ed) Biotecnologia Florestal. Viçosa, pp 51-71

Oliveira LS, Dias PC, AlmeidaM (2015) Avaliação genética do enraizamento de miniestacas de uma procedência de *Eucalyptus cloeziana.* Pesquisa Florestal Brasileira35(84):391-397

Paludzyszyn Filho E, Fernandes JSCC, Resende MDV (2002) Avaliação e seleção precoce para crescimento de *Pinus taeda.* Pesquisa Agropecuária Brasileira37(12):1719-1726

Pires IE, Cruz CD, Borges RCG, Regazzi AJ (1996) Índice de seleção combinada aplicado ao melhoramento genético de *Eucalyptus* spp. Revista Árvore 20(2):191-197

Resende MDV (2007) Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético. Colombo: Embrapa Florestas. 362p

Saha R, Ginwal HS, Chandra G, Santan Barthwal (2019) Integrated assessment of adventitious rhizogenesis in *Eucalyptus*: root quality index and rooting dynamics. Journal of Forestry Research. 10.1007/s11676-019-01040-6

Silva JM, Aguiar AV, Mori ES, Moraes MLT (2011) Variação genética e ganho esperado na seleção de progênies de *Pinus caribaea* var. *caribaea* em Selvíria, MS. Scientia Forestalis 39(90):241-252

Xavier A, Wendling I, Silva RL (2013) Silvicultura Clonal: princípios e técnicas. Viçosa, MG. Ed. UFV. 279p

2 BALANÇO AUXINA/CITOCININA NA MORFOGÊNESE DO HÍBRIDO *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

Resumo

A micropropagação do gênero *Pinus* apresenta diversos entraves e o conhecimento sobre a atuação dos reguladores de crescimento durante o cultivo *in vitro* é importante para o desenvolvimento de protocolos eficientes. Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar o balanço auxina/citocinina nas vias morfogênicas do híbrido *Pinus elliottii x Pinus caribaea.* Para tanto, miniestacas estabelecidas *in vitro* foram divididas em segmentos apicais e nodais e inoculadas em meio de cultura WPM com quatro tratamentos que variavam nas proporções auxina/citocinina. A rizogênese ocorreu predominantemente no tratamento com 0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA e 0,09 $mg.L^{-1}$ de BAP nos segmentos apicais, enquanto o tratamento com 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA e 0,50 $mg.L^{-1}$ de BAP nos segmentos nodais foi o mais eficiente para o desenvolvimento de brotações. Dessa forma, o balanço auxina/citocinina e o tipo de explante utilizado apresentam potenciais distintos nas etapas do cultivo *in vitro.*

Palavras-chave: Micropropagação, Multiplicação, Rizogênese, Reguladores de crescimento

Abstract

Pine micropropagation presents several obstacles and the knowledge about the plant growth regulators performance during in vitro cultivation is important for the development of efficient protocols. This work aimed to analyze the auxin/cytokine balance in the morphogenic pathways of the hybrid *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*. For this purpose, in vitro minicuttings were divided into apical and nodal segments and inoculated in WPM culture medium with four treatments that varied in auxin/cytokine proportions. Rhizogenesis occurred predominantly in apical segments in the treatment with 0.27 $mg.L^{-1}$ NAA and 0.09 $mg.L^{-1}$ BA, while treatment with 0.05 $mg.L^{-1}$ NAA and 0.50 $mg.L^{-1}$ BA in the nodal segments was the most efficient for shoot development. Thus, the auxin/cytokine balance and the type of explant used have distinct potentials in the in vitro culture stages.

Keywords: Micropropagation, Multiplication, Rhizogenesis, Plant growth regulators

2.1 Introdução

A cultura de tecidos engloba diversas técnicas, dentre as quais a micropropagação que apresenta elevado potencial de obtenção em larga escala e em reduzido intervalo de tempo plantas idênticas à original, sendo utilizada como alternativa à propagação tradicional de espécies florestais, além de auxiliar em programas de melhoramento genético (Grattapaglia & Machado 1998; Harry & Thorpe 1994).

Nos protocolos de micropropagação são estabelecidas fases que incluem: seleção do explante, desisfestação e estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimatização das microplantas às condições *ex vitro*. Porém, dependendo do material e do objetivo a ser alcançado, algumas fases podem ser mais prolongadas ou reduzidas, sendo até mesmo excluídas do protocolo (Xavier *et al.* 2013).

A seleção do explante é de extrema importância e deve levar em consideração o objetivo da micropropagação, para a propagação de genótipos de interesse, a multiplicação a partir de gemas axilares estimula a capacidade organogênica dos meristemas axilares pré-existentes. Isso permite maior estabilidade genética, menor variação somaclonal e evita o uso de altas concentrações de citocininas em relação à multiplicação mediante gemas adventícias ou via embriogênese somática, porém tende a apresentar menores taxas de multiplicação (Abdullah *et al.* 1986; Baxter *et al.* 1989; Monteuuis 2016). Na propagação de coníferas via gemas axilares, estas se desenvolvem a partir de meristemas quiescentes pré-existentes localizados na axila de cotilédones e folhas primárias, face adaxial de escamas e acículas e no centro do fascículo de braquiblastos (David 1982; Rocha & Niella 2002).

Todavia o processo de micropropagação em coníferas é conhecido por sua recalcitrância, principalmente no gênero *Pinus* (Harry & Thorpe 1994), além disso, a maioria dos protocolos utiliza cotilédones, epicótilos e brotações apicais de sementes

germinadas *in vitro* como explantes iniciais para a indução de brotações (Baxter *et al.* 1989; Alonso *et al.* 2006; Álvarez *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2010; Nunes *et al.* 2018), poucos trabalhos utilizam brotações oriundas de material adulto (Gupta & Durzan 1985; Cortizo *et al.* 2009; Wang & Yao 2017) e são escassas as pesquisas que utilizam explantes coletados de minicepas provenientes de sementes, sendo que esta é a principal fonte de material utilizada pelas empresas brasileiras na propagação do gênero *Pinus*.

Em relação aos reguladores de crescimento, os protocolos desenvolvidos indicam o uso conforme os padrões apontados por Skoog e Miller (1957), onde maiores proporções de citocininas são utilizadas para a formação da parte aérea, enquanto balanços favoráveis às auxinas, destinam-se à rizogênese (Mehra-Palta *et al*. 1978; Abdullah *et al.* 1989).

Porém, estabelecer o papel exato de cada regulador de crescimento durante o desenvolvimento morfogênico é complexo, pois cada um apresenta amplo espectro de atuação, além disso, os níveis endógenos de hormônios não podem ser desconsiderados, visto que interagem com os reguladores de crescimento aplicados exogenamente, motivo pelo qual existem numerosos relatos onde o tipo de resposta morfogênica observada foi diferente da esperada (Ahuja 1993; George *et al.* 2008).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi determinar o melhor balanço auxina/citocinina nas vias morfogênicas de *P. elliottii* x *P. caribaea* para o desenvolvimento de brotações via gemas axilares e para a rizogênese adventícia em explantes formados por segmentos apicas e nodais.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Localização da área experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, Piracicaba, São Paulo.

2.2.2 Material vegetal

Para a realização deste experimento foi utilizado o mesmo material descrito no Capítulo 1 desta tese.

2.2.3 Introdução e estabelecimento *in vitro*

Para a introdução do material *in vitro* uma miniestaca de cada uma das 120 matrizes teve suas folhas primárias reduzidas à 2,0 mm de comprimento e então desinfestada conforme a Tabela 1. Testes preliminares referentes ao meio de cultura para a introdução e estabelecimento *in vitro* foram realizados e o meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) apresentou o melhor desempenho. Dessa forma, as minestacas foram inoculadas em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 3,0 mL do meio de cultura de introdução MS sem a adição de reguladores de crescimento, com 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarose e 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar, tendo o pH ajustado para 5,8.

Tabela 1: Etapas do processo de desinfestação dos explantes para a introdução e estabelecimento *in vitro*.

Etapa da desinfestação	Produto	Tempo
Anterior à câmara de fluxo laminar		
Limpeza prévia dos explantes	Água corrente	10 minutos
Imersão em solução de fungicida	Orthocide® (2,40 g/L) + Tween 20® (3 gotas/100 mL)	15 minutos
Enxágue	Água deionizada autoclavada	3 vezes
Imersão em solução de Hipoclorito de Sódio	Hipoclorito de Sódio comercial 30% + Tween 20® (3 gotas/100 mL)	10 minutos
Dentro da câmara de fluxo laminar		
Enxágue	Água deionizada autoclavada	3 vezes
Imersão em água até a inoculação	Água deionizada autoclavada	Indeterminado

O período de estabelecimento foi de 28 dias e a cada sete dias o material foi avaliado em relação à manifestação bacteriana, contaminação fúngica, oxidação, mortalidade e estabelecimento *in vitro*. Ressaltamos que optamos por avaliar a

mortalidade nesta etapa do cultivo *in vitro*, visto que nos interessava contabilizar o número específico de mortos, de modo que a análise de sobrevivência englobaria explantes contaminados e oxidados que seriam descartados, comprometendo a análise de estabelecimento *in vitro*.

Durante o período de estabelecimento e também para a fase de indução morfogênica (item 2.2.4) o material foi mantido em condição de sala de crescimento com temperatura (26 ± 2º C), luminosidade (40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) e fotoperíodo de 16/08 horas (luz/escuro) controlados.

2.2.4 Indução morfogênica

Após o período de estabelecimento, as miniestacas que sobreviveram e que não apresentaram contaminação fúngica foram utilizadas para a confecção de dois tipos de explantes, segmento apical (por manter o meristema apical caulinar) e segmento nodal (segmento nodal localizado na porção distal da miniestaca) (Figura 1).

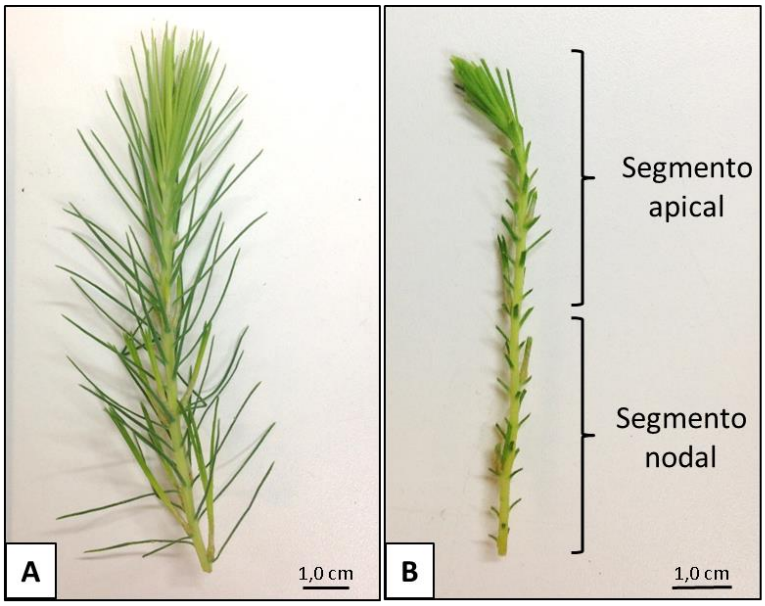

Figura 1. A. Miniestaca do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea*. **B.** Miniestaca com as folhas primárias cortadas e com a indicação da posição dos segmentos apicais e nodais.

Testes preliminares sobre a manutenção a longo prazo nos meios de cultura MS, ½ MS (meio de cultura MS com metade da concentração de sais e vitaminas) e WPM (Lloyd & Mccown 1980) foram realizados e o meio de cultura WPM foi definido como o meio padrão para este experimento de indução morfogênica.

Dessa forma, os segmentos apicais e nodais foram transferidos para tubos de ensaio (24 x 150 mm) contendo 5,0 mL do meio de cultura WPM suplementado com 800 $mg.L^{-1}$ de polivinilpirrolidona (PVP), 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarose, 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar, pH ajustado para 5,8 e com as concentrações dos reguladores de crescimento descritas na Tabela 2. Cabe ressaltar que a partir do quinto subcultivo todo material foi transferido para potes de vidro (capacidade de 200 mL, com 6,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) com 30,0 mL de meio de cultura dos respectivos tratamentos.

Tabela 2. Concentração dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) em meio de cultura WPM para a indução morfogênica em segmentos apicais e nodais de *P. elliottii* x *P. caribaea.*

Tratamento	**Balanço Auxina/Citocinina**	**Concentrações (mg. L^{-1})**	
		ANA	**BAP**
T1	0,1	0,05	0,5
T2	3,0	0,27	0,09
T3	2,0	0,30	0,15
T4	0,5	0,15	0,30

O material foi transferido (subcultivado) para um novo meio de cultura a cada 28 dias, exclusivamente para renovação do meio, sendo que a cada subcultivo foi avaliada a sobrevivência, o número de brotações desenvolvidas, a porcentagem de explantes com brotações desenvolvidas e a porcentagem de enraizamento.

Ao final dos subcultivos sete e dez, as brotações que apresentavam comprimento igual ou superior a 3,0 cm foram isoladas dos explantes e transferidas para o meio de cultura WPM, isento de reguladores de crescimento, para serem utizadas em outros experimentos.

Dessa forma, o experimento foi conduzido em arranjo fatorial inteiramente casualizado (2X4), testando-se dois tipos ds explantes (apical ou nodal) e quatro combinações de reguladores de crescimento, utilizando três repetições com quatro explantes cada.

2.2.5 Análise dos dados

Os dados mensurados foram submetidos à análise descritiva realizada com o auxílio do software R versão 3.6.1.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Introdução e estabelecimento do material *in vitro*

O protocolo de introdução e estabelecimento do material *in vitro* atingiu 53% de estabelecimento, atribuindo-se a principal causa das perdas à contaminação fúngica como pode ser observado na Figura 2, visto que não houve manifestação bacteriana nem oxidação dos explantes.

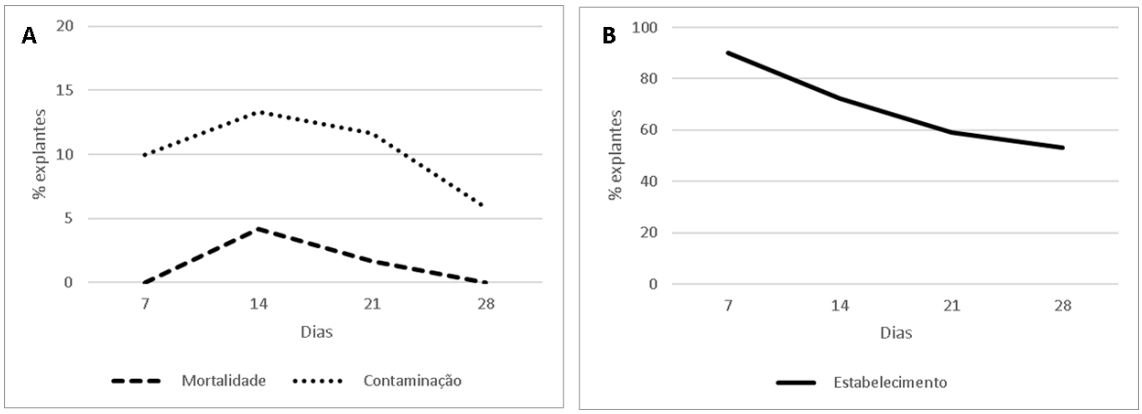

Figura 2. Resultado do estabelecimento *in vitro* de miniestacas de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* inoculados em meio de cultura MS pelo período de 28 dias. **A.** Porcentagem de mortalidade e contaminação fúngica. **B.** Porcentagem de estabelecimento *in vitro*.

A contaminação fúngica apresentou maior valor (13,33%) após 14 dias da introdução *in vitro*, sendo que ao final dos 28 dias do período de estabelecimento atingiu um total de 40,83%. Essa elevada porcentagem de contaminação foi esperada

por se tratar de explantes provenientes de minicepas que não haviam recebido aplicação profilática de fungicida antes da coleta.

Cortizo *et al.* (2009) durante o estabelecimento de explantes oriundos de plantas adultas de *P. pinea* provenientes do campo tiveram 44% de contaminação, por outro lado, Oliveira *et al.* (2012) que realizou aplicações profiláticas de fungicida a cada dois dias por 30 dias antes da coleta de brotações de *P. taeda* mantidos em casa de vegetação, conseguiu um estabelecimento de 86%.

Além disso, existe forte relação entre a exposição de substâncias utilizadas durante o processo de assepsia e a sobrevivência dos explante, de modo que a procedimento asséptico precisa controlar a contaminação sem levar os explantes a oxidação e a morte (Cortizo *et al.* 2009; Zanella *et al.* 2018). Nesse sentido, nossos resultados foram satisfatórios visto que não foi observada oxidação nos explantes e a porcentagem de mortalidade foi baixa (5,83%).

2.3.2 Indução morfogênica

O balanço auxina/citocinina e o tipo de explante utilizado (segmento apical ou nodal) resultaram em diferentes respostas morfogênicas em relação ao desenvolvimento de raízes adventícias e brotações axilares como pode ser observado na Figura 3.

A rizogênese ocorreu principalmente nos segmentos apicais mantidos no tratamento T2 (0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA + 0,09 $mg.L^{-1}$ de BAP), o tratamento que apresentava maior balanço auxina/citocinina, sendo que ao final do décimo subcultivo ocorreu o enraizamento de cerca de 80% dos segmentos apicais (Figura 4A). Isto provavelmente ocorreu em decorrência da presença do meristema apical caulinar, que além de ser o responsável pela manutenção da dominância apical impedindo o brotamento lateral, realiza o transporte basípeto de auxina estimulando o desenvolvimento de raízes adventícias (Taiz & Zeiger 2013).

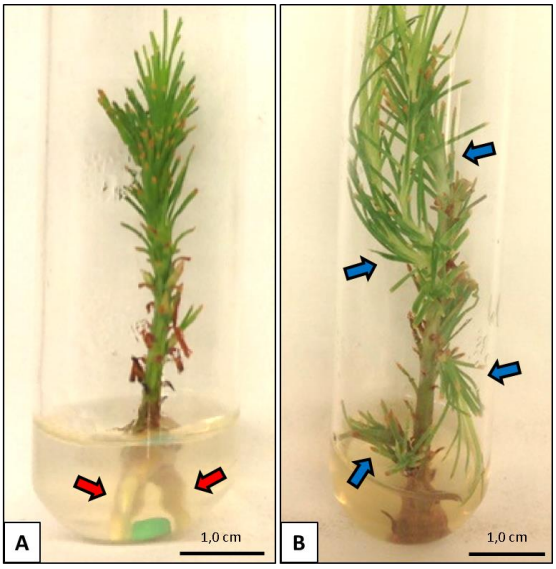

Figura 3. Explantes de *P. elittii* x *P. caribaea.* **A.** Segmento apical com o desenvolvimento de raízes adventícias (setas vermelhas). **B.** Segmento nodal com a presença de brotações axilares (setas azuis).

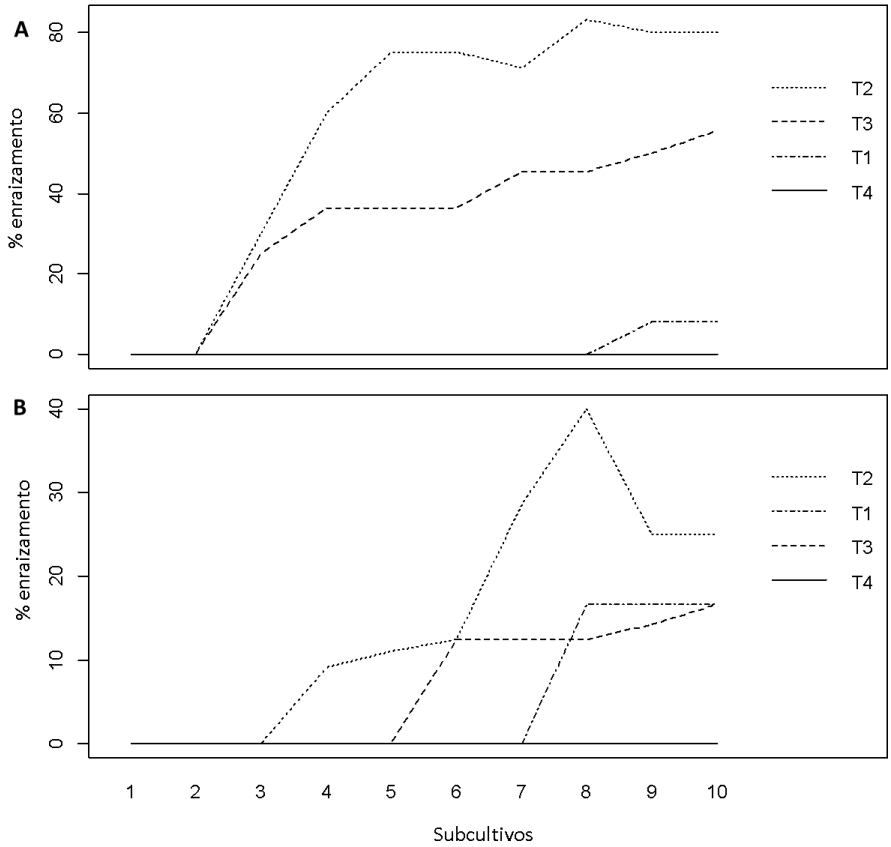

Figura 4. Porcentagem de enraizamento em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmento nodais do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* sob influência de quatro tratamentos ao longo de dez subcultivos.

Além disso, os segmentos apicais produziram menor número médio de brotações em relação aos segmentos nodais independente do tratamento e do subcultivo (Figura 5). Esse tipo de resposta é esperado visto que os segmentos nodais não apresentam o meristema apical caulinar, e consequentemente não há dominância apical, permitindo que as gemas axilares se desenvolvam e formem brotações, como destacado por Scaltsoyiannes *et al.* 1994 na micropropagação do híbrido *Pinus brutia* x *Pinus halepensis*.

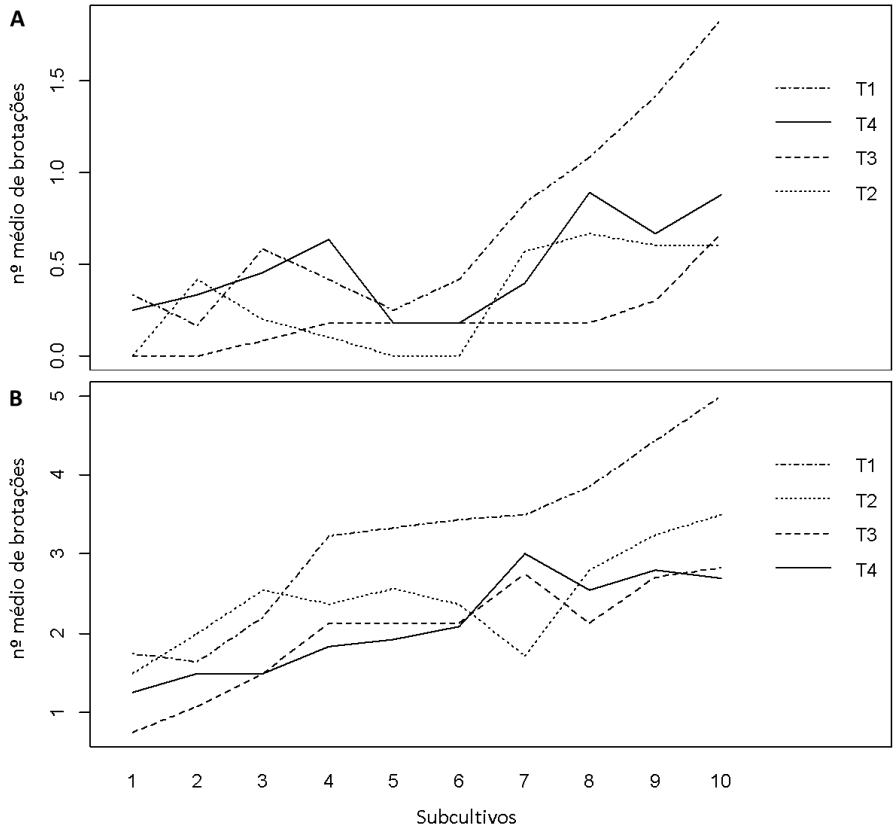

Figura 5. Número médio de brotações em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais do hídrido *P. elliottii* x *P. caribaea* sob influência de quatro tratamentos ao longo de dez subcultivos.

Considerando o balanço auxina/citociniona o tratamento T1 (0,05 mg.L^{-1} de ANA + 0,50 mg.L^{-1} de BAP) foi o mais eficiente na multiplicação para os dois tipos de explantes, de modo que ao final do décimo subcultivo o segmento apical apresentou média de duas brotações por explante e o segmento nodal cinco brotações por explante. Nossos dados corroboram com a literatura que possui diversos protocolos

para a multiplicação *in vitro* de espécies do gênero *Pinus* utilizando BAP isoladamente (De Diego *et al.* 2008, Cézar *et al.* 2015) ou em combinação com ANA (Kalia *et al.* 2007), em concentrações de que vão de 0,02 $mg.L^{-1}$ a 11,25 $mg.L^{-1}$ para a indução de brotações axilares.

Em um estudo recente realizado por Zanella e colaboradores (2018) para a micropropagação de *P. tecunumanii*, após o quarto subcultivo obtiveram número médio de brotações 3,7 e 2,2 para as concentrações de BAP 0,45 $mg.L^{-1}$ e 2,2 $mg.L^{-1}$ respectivamente. Dessa forma, o uso de concentrações menores de BAP tem apresentado melhores resultados, pois altas concentrações apesar de elevada indução podem levar a má formação de gemas e comprometer o alongamento das brotações nas fases subsequentes das micropropagação (Pérez-Bermúdez & Sommer 1987, Nunes *et al.* 2018).

Nesse contexto a Tabela 3 mostra o número de brotações isoladas dos explantes nos subcultivos 7 e 10. Com isso, confirma-se que o tratamento T1 e os segmentos nodais foram mais eficientes à multiplicação do híbrido, de modo que as brotações formadas se desenvolveram, puderam ser isoladas e utilizadas em outras etapas da micropropagação.

Tabela 3. Brotações isoladas com no mínimo 3,0 cm de comprimento em cada tratamento em segmentos apicais e nodais de *P. elliottii* x *P. caribaea.*

Brotações isoladas	**7º subcultivo**		**10º subcultivo**		**Total Final**
	Segmento Apical	**Segmento Nodal**	**Segmento Apical**	**Segmento Nodal**	
T1	2	4	0	15	21
T2	0	1	0	1	2
T3	0	3	0	2	5
T4	0	9	0	4	13

Outro aspecto a ser considerado em relação ao balanço auxina/citocinina é a porcentagem de explantes que apresentaram brotações, ou seja, essa análise leva em

consideração quantos explantes do total responderam ao estímulo *in vitro* para o desenvolvimento de brotações.

A Figura 6 mostra como os segmentos apicais apresentaram menor porcentagem de explantes com brotações em relação aos segmentos nodais ao longo dos dez subcultivos. Nosso resultado supera o obtido por Oliveira *et al.* (2012) que utilizaram segmentos nodais de material juvenil de *P. taeda* com 0,45 mg.L^{-1} de BAP e obtiveram 64,3% de explantes com brotações no segundo subcultivo, enquanto nós obtivemos cerca de 85,0% no tratamento T1 (0,05 mg.L^{-1} de ANA + 0,50 mg.L^{-1} de BAP) durante o segundo subcultivo.

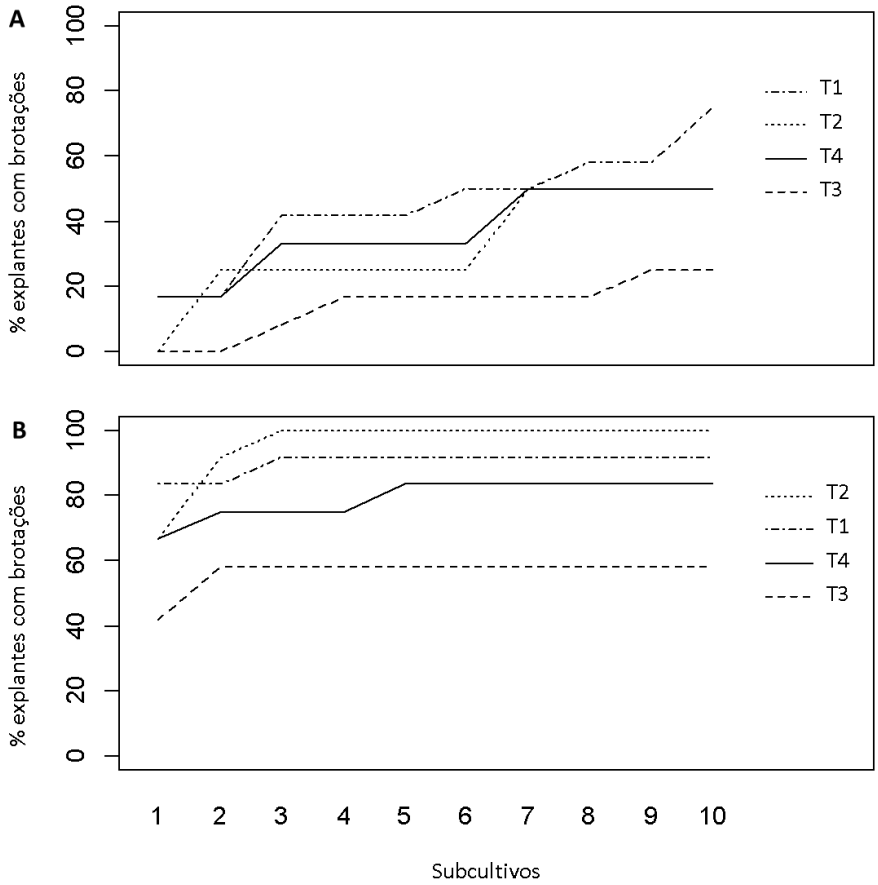

Figura 6. Porcentagem de explantes com brotações em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* sob influência de quatro tratamentos ao longo de dez subcultivos.

Além disso, logo no terceiro subcultivo a porcentagem de explantes com brotações oriundos dos segmentos nodais já havia estabilizado, diferentemente dos

formados pelos segmentos apicais onde o material mantido no tratamento T1 (0,05 mg.L^{-1} de ANA + 0,50 mg.L^{-1} de BAP) apresentou aumento da porcentagem de explantes com brotações no decorrer dos dez subcultivos.

Em relação a porcentagem de sobrevivência dos explantes, a Figura 7 mostra que esta foi maior nos explantes formados pelos segmentos apicais em relação aos segmentos nodais independentemente do tratamento. Quando relacionamos a sobrevivência com o número médio de brotações (Figura 5) percebe-se que os segmentos apicais apresentaram maior porcentagem de sobrevivência, porém menor número médio de brotações em relação aos segmentos nodais que apresentaram resultado contrário, indicando uma relação inversa entre o desenvolvimento de brotações e a sobrevivência do explante.

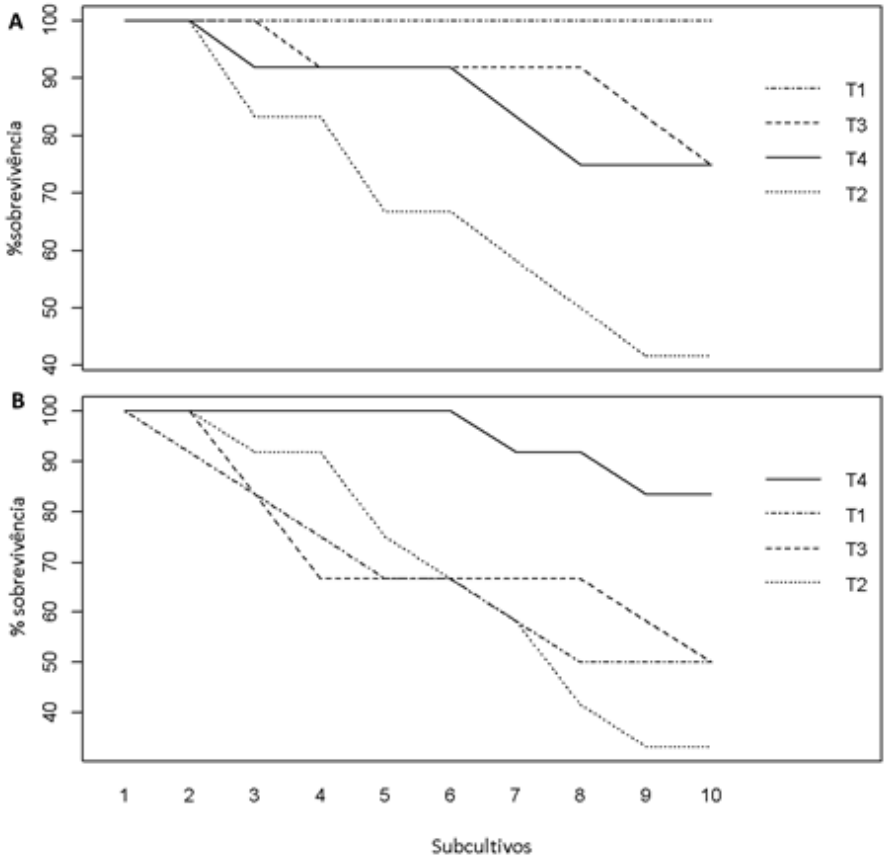

Figura 7. Porcentagem de sobrevivência em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* sob influência de quatro tratamentos ao longo de dez subcultivos.

Analisando o tratamento T1 nota-se que foi o tratamento com maior número médio de brotos (Figura 5), mas que apresentou sobrevivência de 50% ao final dos dez subcultivos (Figura 7), de modo que podemos inferir que o elevado metabolismo decorrente da produção de brotações leva o mesmo à um estresse fisiológico que pode acarretar sua morte. Nesse contexto, ressaltamos o proposto por Baxter *et al.* (1989), que indicou o uso dos segmentos com o meristema apical caulinar (segmentos apicais) como fornecedores de segmentos nodais que são utilizados para formação de brotações axilares, essa estratégia permite a manutenção de materiais de interesse por mais tempo nas condições *in vitro* com formação de novos segmentos nodais sem a necessidade de introdução frequente de explantes provenientes do campo para manter o banco clonal.

Com isso, observamos que dependendo do objetivo da micropropagação segmentos apicais ou nodais poderão ser utilizados de modo mais efetivo atuando na propagação de genótipos de interesse.

2.4 Considerações Finais

O balanço auxina/citocinina e o tipo de explante apresentam potenciais distintos nas etapas do cultivo *in vitro*. A manutenção do meristema apical caulinar ajuda no desenvolvimento de raízes adventícias, mas devido a dominância apical os segmentos apicais apresentam menor formação de brotações.

Para a multiplicação os segmentos nodais e o tratamento 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA + 0,50 $mg.L^{-1}$ de BAP são indicados e para o enraizamento adventício materiais com o meristema apical caulinar e o tratamento 0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA + 0,09 $mg.L^{-1}$ de BAP devem ser utilizados.

Por fim, a manutenção *in vitro* dos segmentos apicais como provedores de segmentos nodais representa uma estratégia viável para protocolos de multiplicação *in vitro* durante longos períodos, visto que os segmentos nodais tendem a morrer ao longo do tempo conforme a produção de brotações ocorre.

Referências

Abdullah AA, Grace J, Yeoman MM (1986) Rapid micropropagation of Calabrian pine from primary and secondary buds on shoot explants. Canadian Journal of Forest Research 16:637-641

Abdullah AA, Grace J, Yeoman MM (1989) Rooting and establishment of Calabrian pine plantlets propagated *in vitro*: Influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. New Phytologist 113:193-202

Ahuja MR (1993) Micropropagation à la carte. In: Ahuja MR (Ed) Forestry Sciences – Micropropagation of Woody Plants**.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 41:3-9

Alonso P, Moncaleán P, Fernandéz B, Rodríguez A, Centeno ML Ordás RJ (2006) An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea*L.). Annals of Forest Science 63(8): 879-885

Álvarez JM, Majada J, Ordás RJ (2009) An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) isolated cotyledons. Forestry 82(2):175-184. 10.1093/forestry/cpn052

Baxter R, Brown SN, England NF, Ludlow CHM, Taylor SL, Womack RW (1989) Production of clonal plantlets of tropical pine in tissue culture via axillary shoot activation. Canadian Journal of Forest Research 19:1338-1342

Cézar TM, HigaAR, Koehler HS, Ribas LLF (2015) Influence of culture medium, explant length and genotype on micropropagation of *Pinus taeda*. Ciência Florestal, 25(1):13-22

Cortizo M, de Diego N, Moncaleán P, Ordás RJ (2009) Micropropagation of adult Stone Pine (*Pinus pinea* L.). Trees 23(1):835-842

David A (1982) In Vitro Propagation of Gymnosperms. In: Bonga JM, Durzan DJ (Eds) Tissue Culture in Forestry. Forestry Sciences, Springer, Dordrecht, vol 5, pp 72-108. doi.org/10.1007/978-94-017-3538-4_4

De Diego N, Montalbán IA, Fernández E, Moncaleán P (2008) In vitro regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. Canadian Journal of Forest Research 38:2607–2615

George EF, Hall MH, De Klerk GJ (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Berlin, 3ed, v1, 501p

Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa CNPH, v 2, pp 183-260

Gupta K, Durzan DJ (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4(4)177-179

Harry I S, Thorpe T A (1994) In vitro culture of forest trees. In: Vasil I K, Thorpe TA (Eds) Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 539-560

Kalia RK, Arya S, Kalia S, Arya ID (2007) Plantlet regeneration from fascicular buds of seedling shoot apices of *Pinus roxburghii* sarg. Biologia plantarum 51(4):653-659. 10.1007/s10535-007-0138-1

Lloyd G, Mccown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifólia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, 30:421-427

Mehra-Palta A, Smeltzer RH, Mott RL (1978) Hormonal control of induced organogenesis – Experiments with excised plant parts of loblolly pine. Tappi Journal, 61(1):37-40

Monteuuis O (2016) Micropropagation and production of forest trees. In: Park YS, Bonga JM, Moon HK (Eds) Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, pp 32-55

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497

Nunes S, Sousa D, Pereira VT, Correia S, Marum L, Santos C, Dias MC (2018) Efficient protocol for in vitro mass micropropagation of slash pine. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 54(2):175-183. 10.1007/s11627-018-9891-4

Oliveira LF, Ribas LLF, Quoirin M, Koehler HS, Amano E, Higa AR (2012) Micropropagation of *Pinus taeda* L. from juvenile material. Tree and Forestry Science and Biotechnology 6:96-101

Pérez-Bermúdez P, Sommer HE (1987) Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliottii* (Engelm.) embryos cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11(1):25-35. 10.1007/BF00036573

Rocha P, Niella F (2002) Research and development of vegetative propagation techniques for *Pinus* sp. in the Northeast region of Argentina. Eldorado: Misiones National University, 2002

Scaltsoyiannes A, Panetsos K, Economou A, Tsoulpha P (1994) Micropropagation of the pine hybrid *Pinus brutia* (Ten) x *Pinus halepensis* (Mill) by culturing fascicle shoots. Annals of Forest Science 51:175-182.

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology 11:118-30

Taiz L, Zeiger E (2013) Fisiologia Vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p.

Wang Y, Yao R (2017) Plantlet regeneration of adult *Pinus massoniana* Lamb. trees using explants collected in March and thidiazuron in culture medium. Journal of Forestry Research. 10.1007/s11676-017-0412-9

Xavier A, Wendling I, Silva RL (2013) Silvicultura Clonal: princípios e técnicas. Viçosa, MG. Ed. UFV. 279p

Zanella LB, Franciscon L, Grunennvaldt RL, Tomasi JC, Degenhardt-Goldbach J (2018) Micropropagation of *Pinus tecunumanii.* Ciência Florestal 28(2):651-660. 10.5902/1980509832058

Zhu L, Wu X, Qu H, Ji J, Ye J (2010) Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102:121–128. 10.1007/s11240-010-9711-y

3 OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

Resumo

Diversos fatores podem atuar no desenvolvimento de brotações *in vitro,* desde o tipo de explante, composição do meio de cultura até o genótipo do material. Com isso, o objetivo deste trabalho foi a otimização do protocolo para a micropropagação do híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* pela análise de tipos de explantes e meios de cultura em dez matrizes. Para a primeira fase da multiplicação, miniestacas estabelecidas *in vitro* foram divididas em segmentos apicais e nodais NI e inoculados em meio de cultura WPM ou WV5 multiplicação (0,05 mg.L^{-1} de ANA e 0,50 mg.L^{-1} de BAP). Na segunda fase, os segmentos apicais desenvolvidos, foram novamente divididos originando os segmentos nodais NII, e ambos (segmentos apicais e nodais NII) foram transferidos para o meio de cultura WV5 multiplicação. Para a fase de alongamento os segmentos nodais NI foram inoculados em meio de cultura WV5 isento de reguladores de crescimento com 2,0 g.L^{-1} de carvão ativado. O meio de cultura WV5 levou a uma maior formação de brotações tanto nos segmentos apicais quanto nos nodais NI na primeira fase da multiplicação. Todavia, na segunda fase o material oriundo do meio de cultura WPM apresentou elevada formação de brotações quando transferido para o meio de cultura WV5. O uso de carvão ativado mostrou-se eficiente para o alongamento de algumas matrizes, porém prejudicou o desenvolvimento de outras. Dessa forma, a genótipo dependência pode ser considerada relevante durante o desenvolvimento *in vitro* do híbrido de modo que protocolos específicos devem ser adaptados para cada matriz.

Palavras-chave: Meios de cultura, Multiplicação, Alongamento, Carvão ativado

Abstract

Several factors may affect in vitro shoots development, since explant type, culture medium composition to material genotype. Therefore, the objective of this work was to optimize the micropropagation protocol for the hybrid *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* by analyzing explant types and culture media in ten matrices. For the first multiplication phase, in vitro established minicuttings were divided into apical and nodal segments (NI) and inoculated in WPM or WV5 multiplication culture medium (0.05 mg.L^{-1} NAA and 0.50 mg.L^{-1} of BA). In the second phase, the developed apical segments were again divided into the NII nodal segments, and both (NII apical and nodal segments) were transferred to the WV5 multiplication culture medium. For the elongation phase the NI nodal segments were inoculated in WV5 culture medium free growth regulators plus 2.0 g.L^{-1} activated charcoal. The WV5

culture medium led to a higher shoots formation in both the apical and nodal segments (NI) in the first phase of multiplication. However, in the second phase the material from the WPM culture medium showed high bud formation when transferred to the WV5 multiplication culture medium. The activated charcoal use was efficient for the stretching of some matrices but hampered the development of others. Thus, the dependency genotype was relevant during the *in vitro* hybrid development so that specific protocols must be adapted for each matrix.

Keywords: Culture mediums, Multiplication, Elongation, Activated charcoal

3.1 Introdução

A composição do meio de cultura utilizado durante a micropropagação fornece as substâncias essenciais para o crescimento e atuam, em grande parte, no padrão de desenvolvimento do explante. Dessa forma, os meios de cultura existentes se baseiam nas exigências nutricionais da planta como um todo, considerando que algumas modificações são comumente requeridas para atender às necessidades *in vitro* (Caldas *et al.* 1998).

Diversas formulações são descritas na literatura sendo que seus principais componentes são: água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. As diferenças entre as formulações ocorrem principalmente quanto à composição e concentração de sais, fonte e concentração de carboidratos bem como de reguladores de crescimento, dessa forma, cada formulação proporciona diferentes respostas morfogenéticas no material *in vitro* (Thorpe & Kumar, 1993).

Além disso, considenrando que cada espécie e muitas vezes cada indivíduo possui requerimentos nutricionais próprios, e que essas necessidades mudam nos diferentes estágios de desenvolvimento, uma composição inadequada pode gerar deficiência ou toxicidade, aumentar o estresse e culminar na morte do material (Bonga & Von Aderkas 1992; Preece 1995).

Nesse contexto, em relação ao cultivo *in vitro* do gênero *Pinus,* diversas formulações são citadas na literatura, como, MS (Murashige & Skoog 1962), B5

(Gamborg *et al.* 1968), GD (Gresshoff & Doy 1972), GD modificado (GDm) (Mehra-Palta *et al.* 1978), SH (Schenk & Hildebrandt 1972), LP (Quoirin & Leproive, 1977), WPM (Lloyd & Mccown 1980), DCR (Gupta & Durzan 1985), WV3 e WV5 (Coke 1996a, 1996b), como também diluições das formulações citadas.

Para a indução de diferentes respostas morfogênicas pode-se acrescentar ao meio de cultura reguladores de crescimento e/ou outras substâncias, como o carvão ativado, indicado principalmente para a fase de alongamento e enraizamento das brotações (Mott & Amerson 1981; Thomas 2008). O mecanismo de ação do carvão ativado ainda é pouco esclarecido, todavia sabe-se que suas partículas apresentam muitos poros com uma grande área superficial onde muitas substâncias podem ser adsorvidas, desde compostos tóxicos, reguladores de crescimento e compostos fenólicos, podendo atuar também na liberação gradual de substâncias orgânicas promotoras de crescimento (Thomas 2008).

Nesse contexto, verifica-se que o desenvolvimento *in vitro* depende de diferentes fatores e da interação destes, e a resposta pode variar não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos da mesma espécie e até mesmo entre fontes de explantes de um mesmo genótipo (Cordeiro *et al.* 2014; Esposito-Polesi *et al.* 2018).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi otimizar um protocolo para a micropropagação do híbrido *Pinus elliottii x Pinus caribaea* avaliando a relação entre meios de cultura e tipos de explante de dez matrizes.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Localização da área experimental

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, Piracicaba, São Paulo.

3.2.2 Material vegetal

Foram utilizadas dez miniestacas com aproximadamente 8,0 cm de comprimento e 0,3 cm de espessura de cada uma das matrizes (46, 47, 48, 53, 55, 69, 80, 83, 87 e 91) selecionadas no Capítulo 1 desta tese, as matrizes 22 e 26 não foram utilizadas pois morreram no canaletão. Na data da coleta as matrizes apresentavam três anos em canaletão localizado na Fazenda Pedra Maria do grupo Pinus Brasil na cidade de Buri, São Paulo.

Uma semana antes da coleta iniciou-se a aplicação profilática com fungicida Orthocide® (2,4 $g.L^{-1}$) realizada diariamente nas minicepas das matrizes selecionadas. A coleta foi realizada no dia 30/11/2018 e em seguida as miniestacas foram armazenadas em uma caixa de isopor e então enviadas para o Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas para a realização deste estudo.

3.2.3 Introdução e estabelecimento *in vitro*

Para a introdução e estabelecimento *in vitro* cada miniestaca foi preparada tendo suas folhas primárias reduzidas à 2,0 mm de comprimento e então destinadas ao processo de assepsia que consistiu das seguintes etapas: água corrente por 10 minutos, solução de fungicida Orthocide® (2,4 $g.L^{-1}$) + Tween 20® (3 gotas/100 mL) por 15 minutos, água deionizada autoclavada (3 vezes), solução de hipoclorito de sódio comercial 30% + Tween 20® (3 gotas/100 mL) por 10 minutos, nesta etapa o material foi encaminhado à câmara de fluxo onde após decorrido o tempo foram enxaguados em água deionizada autoclavada (3 vezes) e então inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 3,0 mL do meio de cultura de introdução MS (Murashige & Skoog 1962) sem a adição de reguladores de crescimento, com 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarose e 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar, tendo o pH ajustado para 5,8.

O período de estabelecimento foi de 28 dias e a cada sete dias o material foi avaliado em relação à manifestação bacteriana, contaminação fúngica, oxidação, mortalidade e estabelecimento *in vitro*. Nesta etapa do cultivo *in vitro* optamos por

avaliar a mortalidade e não a sobrevivência dos explantes, visto que nos interessava o número específico de mortos, de modo que a análise de sobrevivência englobaria explantes contaminados e oxidados que seriam descartados, comprometendo a análise de estabelecimento *in vitro*.

As condições de cultivo tanto para o estabelecimento do material *in vitro* quanto para as demais estapas e experimentos foram: sala de crescimento com temperatura (26 ± 2º C), luminosidade (40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) e fotoperíodo de 16/08 horas (luz/escuro) controlados.

3.2.4 Multiplicação *in vitro* Fase I

Para a análise da atuação de meios de cultura na multiplicação *in vitro* de *P. elliotti* x *P. caribaea*, todas as miniestacas estabelecidas, foram divididas em segmento apical (segmento com a presença do meristema apical caulinar) e nodal NI, sendo então transferidos para tubos de ensaio (24 x 150 mm) contendo 5,0 mL dos meios de cultura descritos na Tabela 1. Os dois meios de cultura testados foram suplementados com 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético), 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina), 800 $mg.L^{-1}$ de PVP (polivinilpirrolidona), 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarose e 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar.

Tabela 1. Meios de cultura suplementados com os reguladores de crescimento ANA e BAP, visando a multiplicação *in vitro* de *P. elliottii x P. caribaea.*

Tratamento	Meio de Cultura	Concentrações ($mg.L^{-1}$)	
		ANA	BAP
M1	WPM	0,05	0,5
M2	WV5	0,05	0,5

Os segmentos apicais e nodais NI de cada uma das matrizes estudadas foram mantidos nesses tratamentos por quatro subcultivos sucessivos de 28 dias cada, para a renovação do meio de cultura de mesma composição. Ao final do quarto subcultivo

foi avaliado a porcentagem de sobrevivência, de explantes com brotações e o número médio de brotações desenvolvidas por explante.

Além disso, os explantes formados pelos segmentos nodais NI foram encaminhados para a fase de alongamento descrita no item 3.2.6. Em relação aos segmentos apicais, estes foram cortados para a formação de um novo segmento nodal denominado NII, com isso o segmento apical recém cortado juntamente com o novo segmento nodal NII foram encaminhados para a segunda fase da multiplicação *in vitro* descrita no item 3.2.5. Um resumo esquemático da sequência de experimentos realizados pode ser observado na Figura 1.

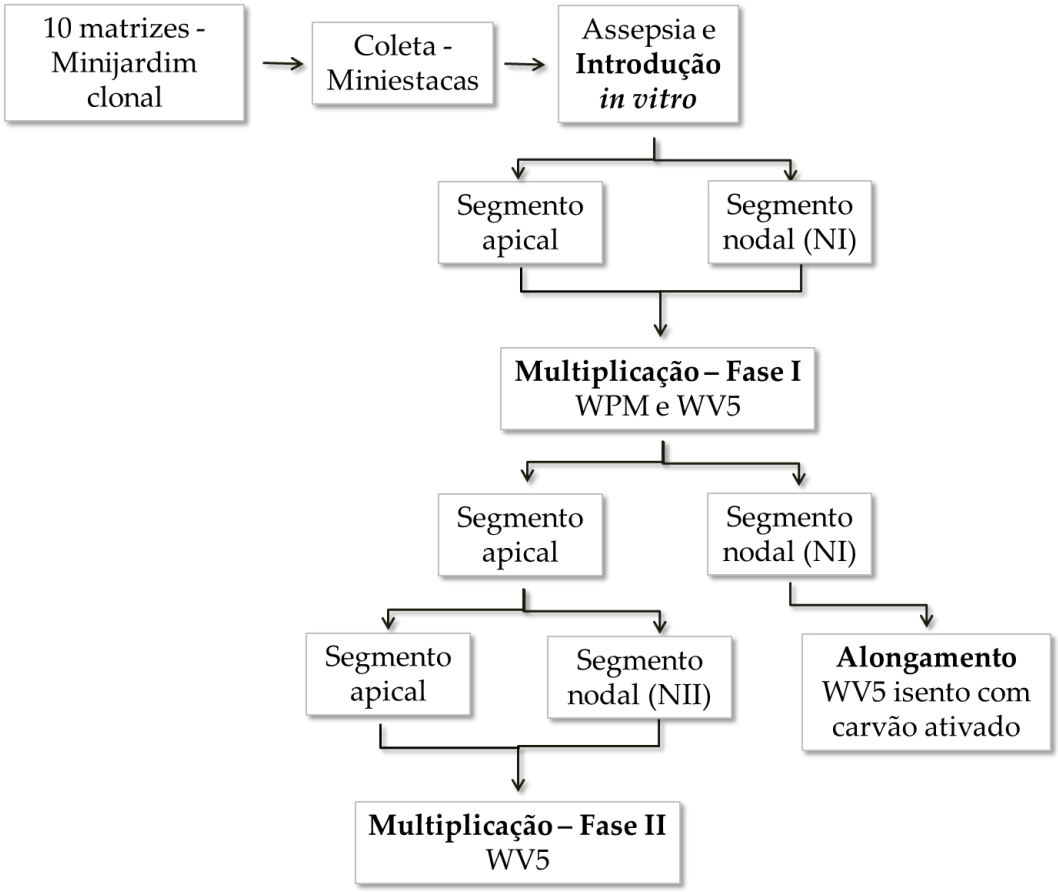

Figura 1. Resumo esquemático dos experimentos realizados para a otimização de protocolo para a micropropagação de *P. elliottii* x *P. caribaea*.

Dessa forma, o experimento foi conduzido em arranjo fatorial inteiramente casualizado (10X2X2), testando-se dez matrizes, dois tipos de explantes (segmento

apical ou segmento nodal NI) e duas formulações de meio de cultura de multiplicação, com cinco repetições por tratamento por matriz.

3.2.5 Multiplicação *in vitro* Fase II

Para a segunda fase da etapa de multiplicação *in vitro*, os segmentos apicais e nodais NII de todas as matrizes foram transferidos para potes de vidro (capacidade de 200 mL, com 6,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) com 30,0 mL do meio de cultura WV5 multiplicação (0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA e 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP) suplementado com 800 $mg.L^{-1}$ de PVP, 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarose e 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar. Mantidos por quatro subcultivos sucessivos de 28 dias cada, para o desenvolvimento de brotações.

A porcentagem de sobrevivência e de explantes com brotações além do número médio de brotações desenvolvidas por explante foram avaliados ao final do quarto subcultivo. Ressaltamos que nos subcultivos dois e quatro dessa fase, as brotações que apresentaram pelo menos 3,0 cm de comprimento foram isoladas de seus explantes, transferidas para meio de cultura WV5 isento de reguladores de crescimento e conduzidas para outros experimentos.

Com isso, o experimento foi organizado em arranjo fatorial inteiramente casualizado (10X2X2), a fim de analisar dez matrizes, dois tipos ds explantes (segmento apical e segmento nodal NII) e duas origens de formulações de meio de cultura de multiplicação, apresentando cinco repetições por tratamento por matriz.

3.2.6 Alongamento

Para a fase de alongamento os segmentos nodais NI das matrizes (46, 47, 48, 69 e 83) oriundos dos meios de cultura de multiplicação WPM e WV5 foram transferidos para potes de vidro (idem ao descrito no item 3.2.5) com 30,0 mL do meio de cultura WV5 alongamento, constituído de sais e vitaminas de WV5, porém

isento de reguladores de crescimento, com 800 mg.L^{-1} de PVP, 30,0 g.L^{-1} de sacarose, 2,0 g.L^{-1} de carvão ativado e 5,5 g.L^{-1} de ágar.

Os segmentos nodais NI foram mantidos nesses tratamentos por quatro subcultivos sucessivos de 28 dias cada, sendo que no segundo e quarto subcultivo as brotações com comprimento igual ou superior a 3,0 cm foram isoladas de seus explantes e transferidas para meio de cultura WV5 isento de reguladores de crescimento e conduzidas para outras etapas. Além disso, no final do quarto subcultivo avaliou-se a a porcentagem de sobrevivência dos segmentos nodais NI de cada matriz em meio de alongamento.

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial inteiramente casualizado (5X2), avaliando cinco matrizes e duas origens de meio de cultura de multiplicação, com cinco repetições por tratamento por matriz.

3.2.7 Análise dos dados

Os dados mensurados foram submetidos à análise descritiva realizada com o auxílio do software R versão 3.6.1.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Introdução e estabelecimento *in vitro*

Apesar de sua importância, a etapa de assepsia é pouco explorada no processo de micropropagação em coníferas (Sarmast 2018), nesse sentido, nossos dados mostram que a aplicação profilática de fungicida antes da coleta do material e o protocolo de assepsia utilizado, resultaram em uma excelente porcentagem de estabelecimento do material (96%), sendo que as poucas perdas ocorreram devido a contaminação fúngica, de modo que não houve manifestação bacteriana, oxidação e morte de nenhum explante (Figura 2).

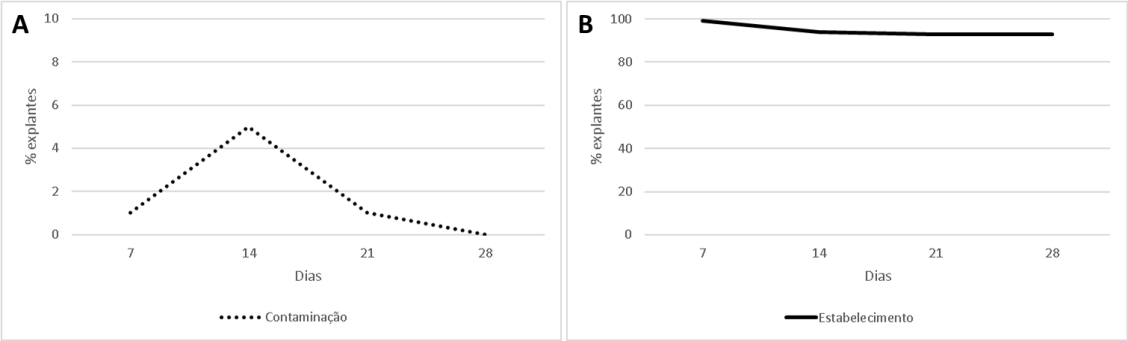

Figura 2. Resultado do estabelecimento *in vitro* de miniestacas de *P. elliottii* x *P. caribaea* inoculados em meio de cultura MS pelo período de 28 dias. **A.** Porcentagem de contaminação fúngica. **B.** Porcentagem de estabelecimento *in vitro*.

Estudos realizados com outras espécies do gênero *Pinus,* como o desenvolvido por Zanella *et al.* (2018) durante a introdução de brotações apicais de plantas de *P. tecunumanii* com um ano e meio de idade mantidos em casa de vegetação, conseguiram o estabelecimento de 83,33% dos explantes com aplicações profiláticas do fungicida Cercobin® (1,0 $g.L^{-1}$) e posterior assepsia com solução de fungicida (1,0 $g.L^{-1}$) seguido de 0,05% de cloreto mercúrio ($HgCl_2$) e 0,5% de hipoclorito de sódio (NaOCl). Confirmando a importância da aplicação profilática de fungicida antes da coleta do material para a introdução e estabelecimento *in vitro*.

Além disso, apesar de ser muito utilizado em protocolos de assepsia, nosso estudo não utilizou cloreto de mercúrio atingindo melhores resultados que os descritos na literatura (Oliveira *et al.* 2012; Zanella *et al.* 2018). Sarmast (2018) confirma os bons resultados obtidos pelo cloreto de mercúrio, mas relata sua toxidade e indica que seja evitado, nós ressaltamos seu potencial mutagênico, podendo aumentar as chances de alterações somaclonais e na fisiologia do explante.

3.3.2 Multiplicação *in vitro* Fase I

Os segmentos apicais e nodais NI de *P. elliottii* x *P. caribaea* apresentaram respostas variadas na formação de brotações em relação às matrizes e ao meio de cultura de multiplicação (WV5 ou WPM), como pode ser observado na Figura 3 que mostra o desenvolvimento *in vitro* do material ao longo de quatro subcultivos.

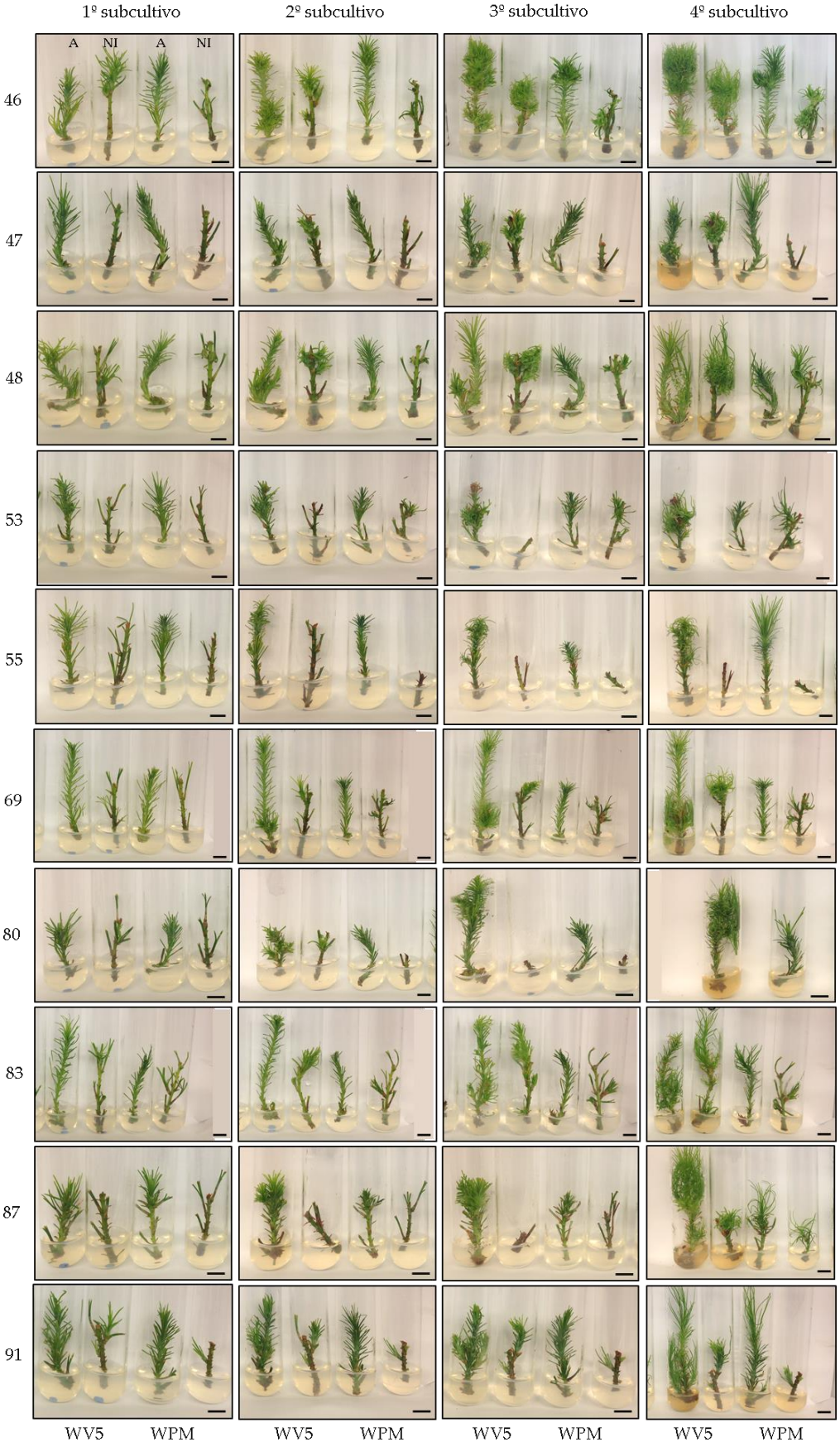

Figura 3. Desenvolvimento de dez matrizes de *P. elliottii* x *P. caribaea* em meio de cultura multiplicação (WV5 ou WPM) em segmento apical (A) ou segmento nodal (NI) (representados na primeira foto) ao longo de quatro subcultivos. Barra = 1,0 cm.

As diferenças observadas na Figura 3 confirmam os dados obtidos para a análise do número médio de brotações (Figura 4), de modo que os segmentos apicais apresentaram maior número médio de brotações no meio de cultura WV5 em relação ao WPM para todas as matrizes. A maior formação de brotações ocorreu nas matrizes 46 e 69 que desenvolveram uma média de 11 brotações por explante. Por outro lado, os segmentos nodais NI apresentaram respostas mais heterogêneas entre as matrizes, para seis delas (46, 47, 48, 69, 83 e 87) o meio de cultura WV5 levou a uma maior formação de brotações. Todavia, para a matriz 91 o meio WPM apresentou um número médio de brotações superior ao WV5 e a matriz 53 teve o desenvolvimento de brotações apenas no meio WPM. Já as matrizes 55 e 80 não apresentaram desenvolvimento de brotações nos segmentos nodais NI em nenhum dos dois meios de cultura.

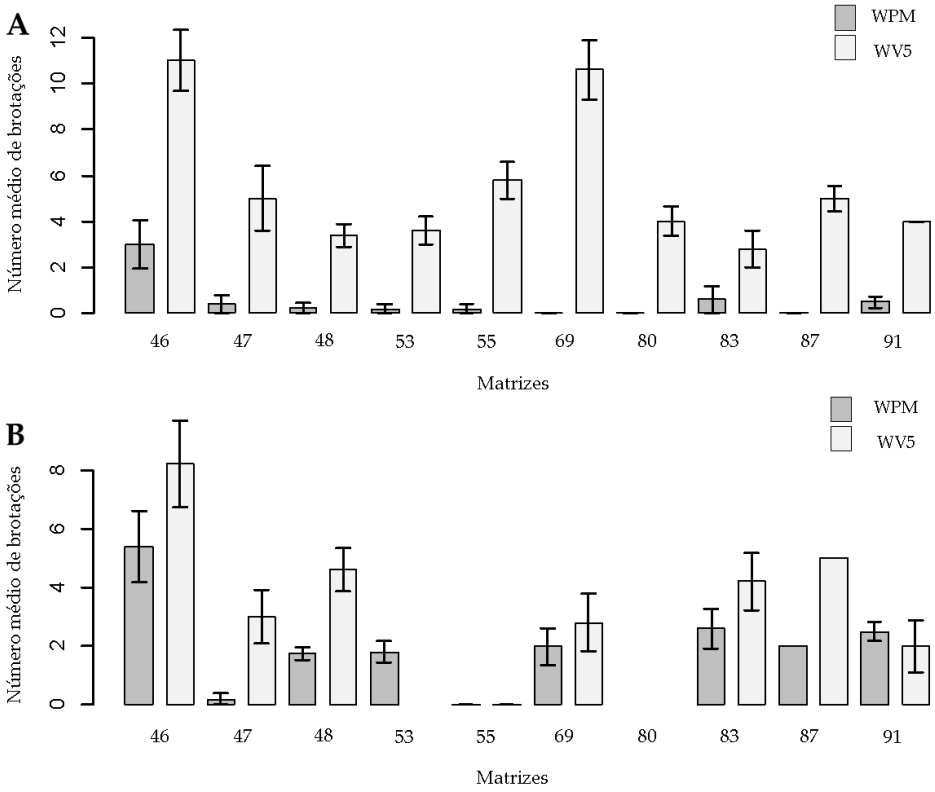

Figura 4. Número médio de brotações em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais NI de dez matrizes do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* nos meios de cultura de multiplicação WPM e WV5 ao final do quarto subcultivo. Barras indicam o erro padrão da média.

Nossos resultados diferem do observado por Oliveira *et al.* (2012) para *P. taeda*, onde obtiveram um número médio de brotações por explante superior nos segmentos nodais em relação aos segmentos apicais independente do meio de cultura avaliado. Todavia, a elevada formação de brotações nos segmentos apicais observada em nosso trabalho ocorreu apenas no meio de cultura WV5, corroborando com Nunes *et al.* (2018) que avaliaram a formação de brotações em explantes (brotações apicais de plântulas germinadas *in vitro*) de *P. elliotti* em meio de cultura MS ou WV5 suplementados com 2,2 $mg.L^{-1}$ de BAP e obtiveram maior formação de brotações no meio WV5.

Preece (1995) discute sobre a atução dos nutrientes como precursores nas vias metabólicas para a síntese de hormônios endógenos que podem levar a um melhor desenvolvimento das brotações, neste caso, provavelmente a elevação dos níveis endógenos de citocininas suficiente para superar a dominância apical e promover o desenvolvimento de brotações no segmento apical.

A avaliação da porcentagem de explantes com brotações confirma nossos dados para o número médio de brotações, de modo que praticamente todos os explantes apicais utilizados no experimento desenvolveram brotações no meio de cultura WV5 (que apresenta formulação mais rica em nutrientes), o que não ocorreu para o meio de cultura WPM (cuja formulação é mais pobre em nutrientes) como pode ser observado na Figura 5.

Nossos resultados com os segmentos apicais confirmam os dados obtidos com *P. pinea* por Sul e Korban (2004), que mostraram a influência das concentrações de sais presentes nos meios de cultura na formação de brotações, de modo que o meio de cultura ½ MS (MS com a metade da concentração dos sais) apresentou 35% de explantes com brotações, enquanto meios mais pobres como o SH e Gamborg B5 apresentaram 17% e 9% respectivamente.

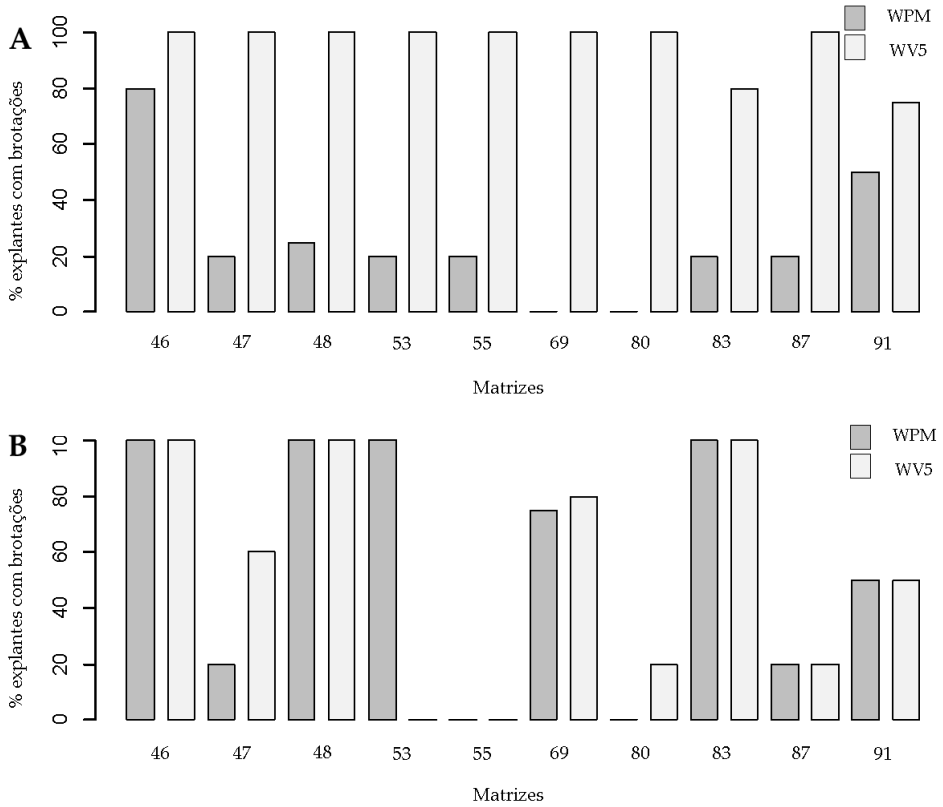

Figura 5. Porcentagem de explantes com brotações. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais NI de dez matrizes do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* nos meios de cultura de multiplicação WPM e WV5 ao final do quarto subcultivo.

Em relação aos segmentos nodais NI, a porcentagem de explantes com brotações foi semelhante entre os dois meios de cultura para a maior parte das matrizes (46, 48, 69, 83, 87 e 91), exceto para a matriz 53, onde apenas os segmentos nodais NI inoculados no meio WPM desenvolveram brotações. A matriz 80 teve apenas 20% dos segmentos nodais NI emitindo brotações no meio WV5. Além disso, a matriz 55 não apresentou o desenvolvimento de nenhuma brotação em nenhum dos dois meios utilizados. Dessa forma, para os segmentos nodais NI a maior variação de respostas não ocorreu em relação aos meios de cultura, como observado nos segmentos apicais, mas sim entre as matrizes.

Com isso, podemos inferir que os segmentos nodais NI por não apresentarem o meristema apical caulinar, apresentam maior potencial de formação de brotações em relação aos segmentos apicais. A dominância apical inibe o desenvolvimento de brotações, pois estas dependem de uma alteração em sua

fisiologia, seja de modo direto pela aplicação de concentrações mais elevadas de reguladores de crescimento ou de modo indireto pela disponibilidade de nutrientes em um meio de cultura, como ocorreu em nosso estudo.

A Figura 6 mostra nossos resultados em relação à sobrevivência dos explantes, onde os segmentos apicais apresentaram melhores resultados em relação aos segmentos nodais para a maior parte das matrizes. Para sete matrizes (47, 48, 53, 55, 69, 80 e 83) os segmentos apicais apresentaram 100% de sobrevivência nos dois meios de cultura, já para as matrizes 46 e 91 ocorreu 100% de sobrevivência no meio WPM e aproximadamente 80% em WV5, sendo que um resultado inverso foi observado para a matriz 87.

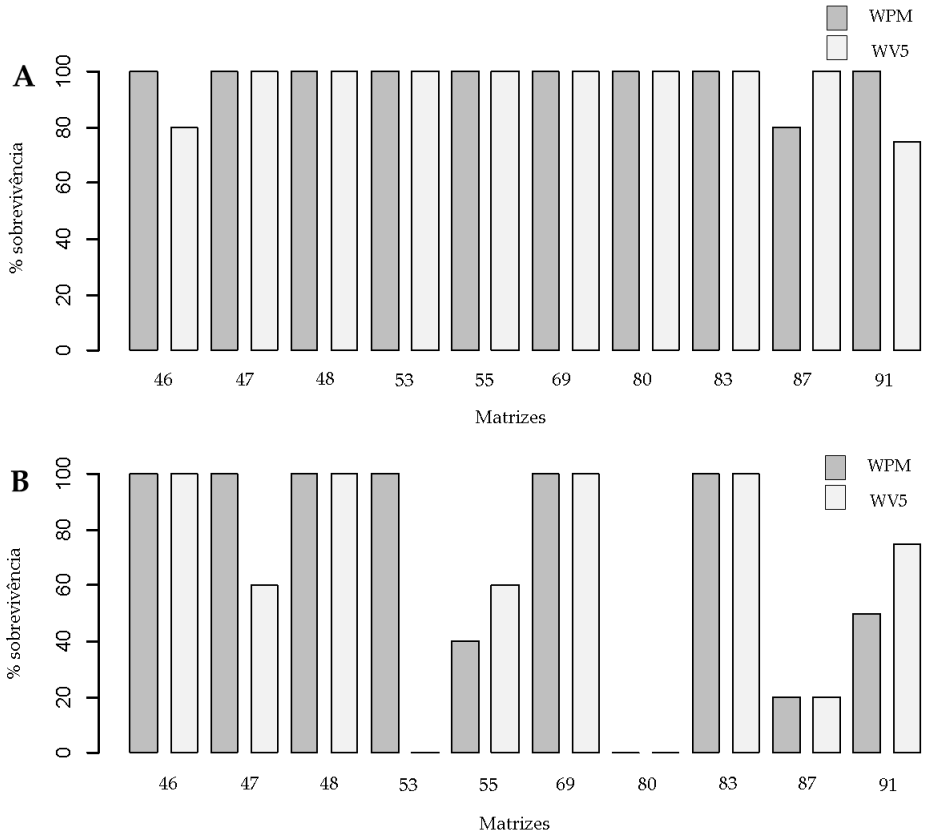

Figura 6. Porcentagem de sobrevicência em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais NI de dez matrizes do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* nos meios de cultura de multiplicação WPM e WV5 ao final do quarto subcultivo.

Por outro lado, segmentos nodais NI tiveram 100% de sobrevivência nos dois meios de cultura apenas para quatro matrizes (46, 48, 69 e 83), 100% em WPM e 60%

em WV5 para a matriz 47, enquanto as matrizes 55 e 91 apresentaram maior sobrevivência no meio de cultura WV5 (60% e 80% respectivamente) em relação ao WPM (40% e 50% respectivamente), já a matriz 53 apresentou 100% de sobrevivência em WPM e 0% em WV5, a matriz 87 apresentou 20% de sobrevivência nos dois meios de cultura e por fim todos os segmentos nodais da matriz 80 não sobreviveram.

Nossos dados corroboram com Vejsadová e Lukášová (2010) para *P. uncinata* que obtiveram porcentagem de sobrevivência mais elevada no meio de cultura WV5 em relação aos meios WPM e MS. Além disso, Oliveira *et al.* (2012) para *P. taeda*, também obtiveram maior sobrevivência para os segmentos apicais (86%) em relação aos nodais (76%) no meio WV5 em comparação aos mantidos nos meios WV3, DCR e MS.

3.3.3 Multiplicação *in vitro* Fase II

Nesse experimento avaliamos a resposta da multiplicação *in vitro* das matrizes em meio de cultura WV5 após passarem quatro subcultivos em meio de cultura WPM e WV5 multiplicação. Nosso intuito foi verificar se o material mantido no meio com menores concentrações de nutrientes (WPM) quando transferido para um meio mais concentrado (WV5) passaria a responder melhor, ou se o meio de origem influenciaria as respostas *in vitro* nas etapas seguintes.

A Figura 7 mostra resultados bem distintos dos observados na análise de número médio de brotações da "Multiplicação *in vitro* fase I" (Figura 4), de modo que os segmentos apicais oriundos do meio de cultura WPM apresentaram desenvolvimento de brotações quando transferidos para o meio de cultura WV5, confirmando a atuação dos nutrientes na morfogênese *in vitro*.

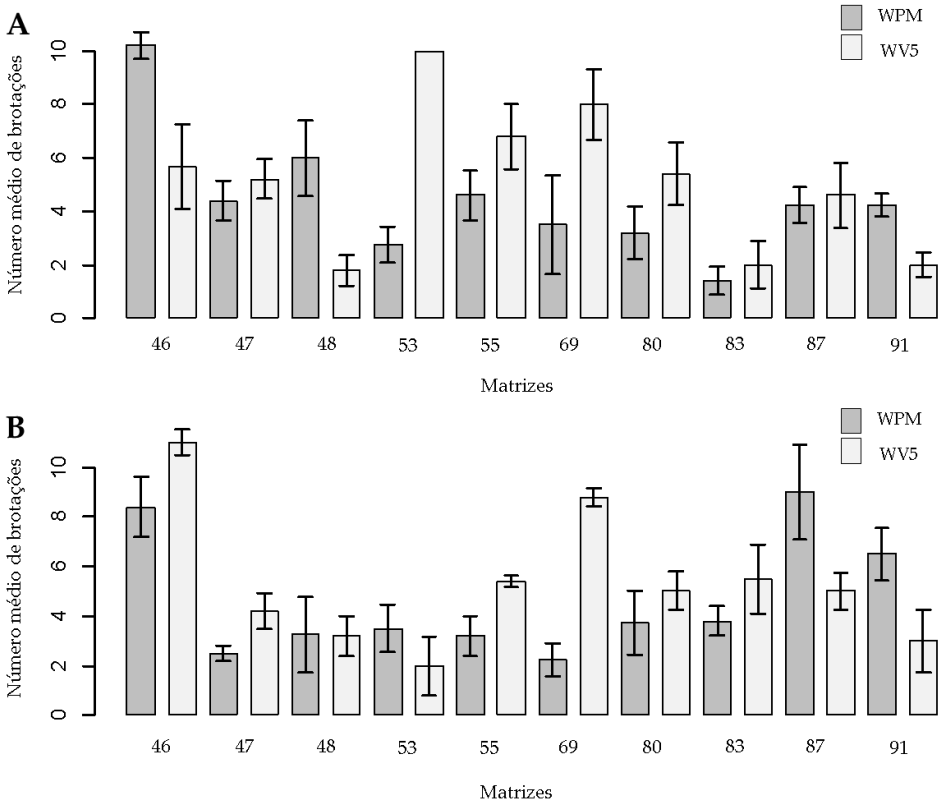

Figura 7. Número médio de brotações em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais NII de dez matrizes do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* em meio de cultura de multiplicação WV5 ao final do quarto subcultivo, comparando explantes que vieram do meio de cultura WPM ou WV5 na "Multiplicação *in vitro* Fase I". Barras indicam o erro padrão da média.

Cabe salientar que, considerando a formação e manutenção de um microjardim clonal provedor de microestacas para a formação de mudas em escala comercial. O uso alternado entre os meios de cultura WPM e WV5 pode ser uma estratégia para controlar ou promover a formação de brotações dependendo da demanda de material no viveiro (Meneghetti *et al.* 2019).

Em relação aos segmentos nodais NII o padrão de resposta foi semelhante ao dos segmentos nodais NI (Figuras 4), exceto para as matrizes 55 e 80 (Figura 8) que não haviam formado brotações na "Multiplicação *in vitro* fase I" e na "Multiplicação *in vitro* fase II" apresentaram média de aproximadamente 4 e 5 brotações por explante nos segmentos nodais NII oriundos do meio de cultura WPM e WV5 respectivamente. Esse resultado é relevante, visto que conseguimos estabelecer *in*

vitro a partir de segmentos nodais NII duas matrizes que não apresentaram resposta para os segmentos nodais NI na primeira fase da multiplicação *in vitro*.

Figura 8. Desenvolvimento da matriz 80 de *P. elliottii* x *P. caribaea* em meio de cultura WV5 multiplicação, à direita segmento apical e à esquerda segmento nodal NII.

Ressaltamos duas possíveis razões para tal resultado, a primeira devido ao fato dos segmentos nodais NII terem sido formados a partir dos segmentos apicais após um período de cultivo *in vitro* (4 subcultivos de 28 dias), de modo que sendo provenientes de um material já estabelecido não passaram pelo processo de assepsia, além de já estarem adaptados às condições heretotróficas do cultivo *in vitro*. O segundo aspecto é discutido por Baxter *et al.* (1989), que avaliaram a formação de brotações em segmentos apicais e nodais em diferentes posições nos explantes de três espécies de *Pinus* e obteveram melhores resultados para os segmentos nodais imediatamente proximais ao segmento apical, confirmando nossos melhores resultados para os segmentos nodais NII em relação aos NI para a maior parte das matrizes.

Os dados de porcentagem de explantes com brotações apresentado na Figura 9, confirmam nossos resultados discutidos acima. Ressaltamos a elevada porcentagem de explantes apicais oriundos do meio WPM com brotações, e a responsividade dos explantes nodais NII das matrizes 53 (para o meio WV5), 55 e 80 (para os meios WV5 e WPM), visto que não haviam apresentado o desenvolvimento de brotações na "Multiplicação *in vitro* fase I" (Figura 5).

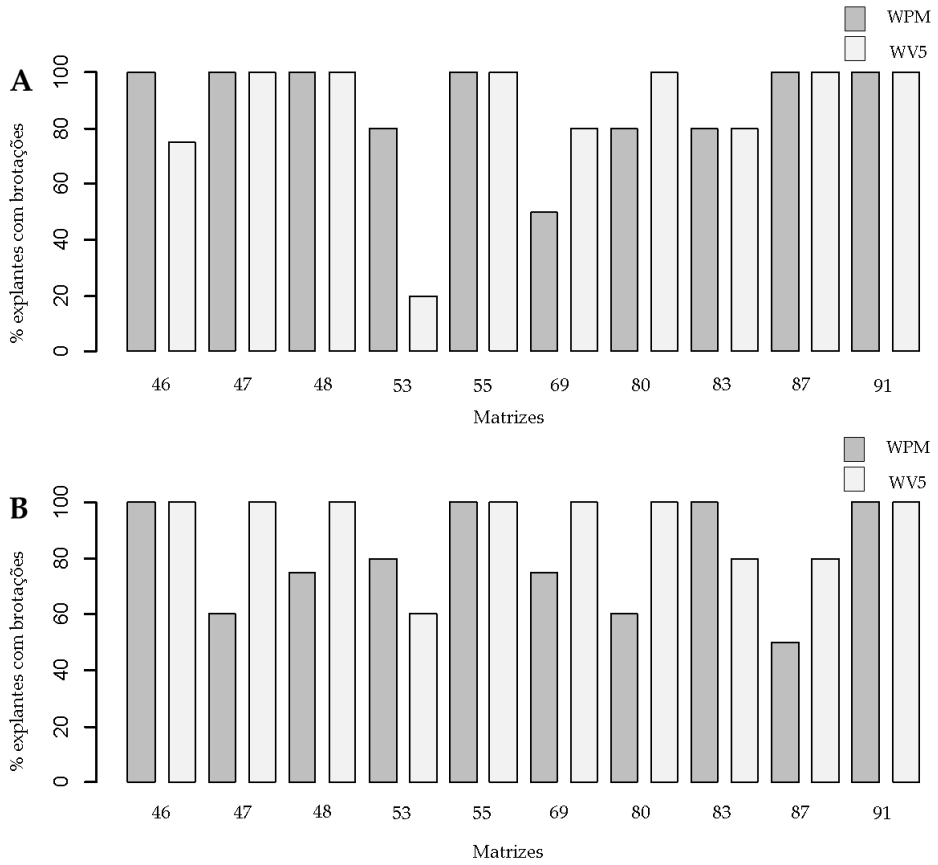

Figura 9. Porcentagem de explantes com brotações. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais NII de dez matrizes do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* em meio de cultura de multiplicação WV5 ao final do quarto subcultivo, comparando explantes que vieram do meio de cultura WPM ou WV5 na "Multiplicação *in vitro* Fase I".

A análise de sobrevivência apresentada na Figura 10, aponta para uma queda na sobrevivência dos segmentos apicais oriundos do meio WV5 para as matrizes 53, 69 e 83 em relação à sobrevivência desses explantes na "Multiplicação *in vitro* fase I" (Figura 6). Uma possível razão para esses resultados pode ser decorrente de uma menor tolerância das matrizes 53 e 83 à elevada concentração de sais do meio de cultura WV5, principalmente com relação ao nitrogênio, por longos períodos de cultivo *in vitro,* como citado por George *et al.* (2008) sobre o efeito tóxico que a elevada concentração de nitrogênio presente no meio de cultura MS pode acarretar em algumas espécies. Por outro lado, a matriz 69 apresentou maior formação de brotações no meio de cultura WV5 (média de 8 brotações por expante), de modo que essa elevada formação de brotações exige um elevado metabolismo que pode levar o explante à um estresse fisiológico culminando na morte do mesmo.

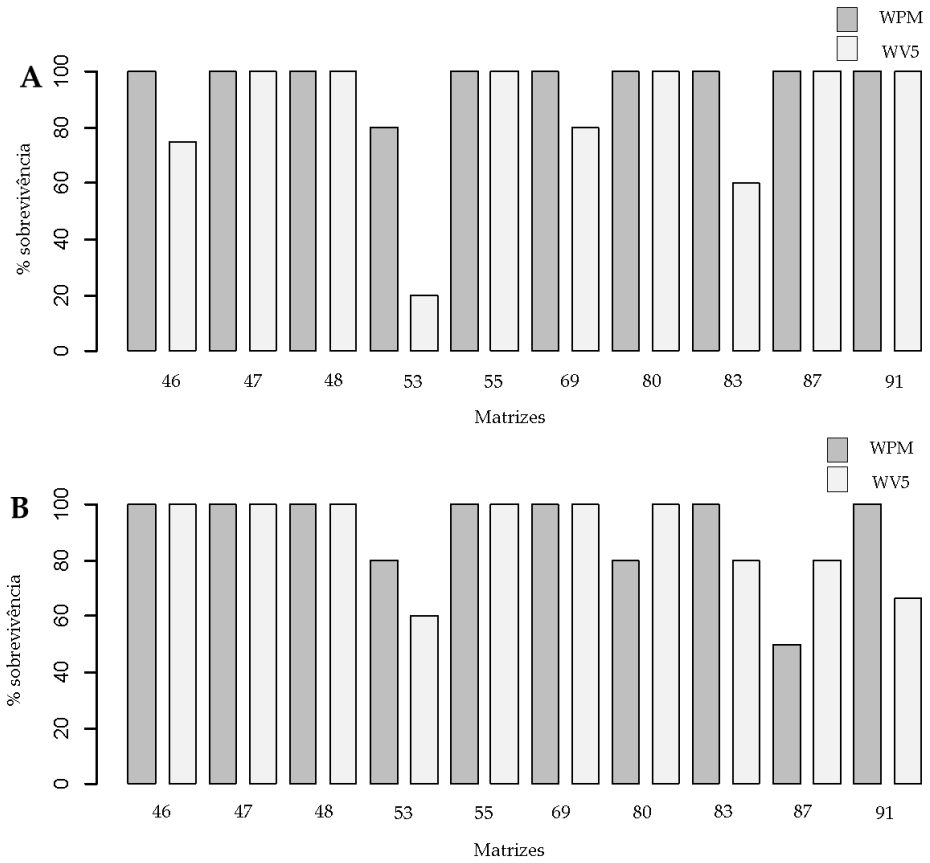

Figura 10. Porcentagem de sobrevicência em dois tipos de explantes. **A.** Segmentos apicais e **B.** Segmentos nodais NII de dez matrizes do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* em meio de cultura de multiplicação WV5 ao final do quarto subcultivo, comparando explantes que vieram do meio de cultura WPM ou WV5 na "Multiplicação *in vitro* Fase I".

Em relação aos segmentos nodais NII, a sobrevivência foi mais elevada na "Multiplicação *in vitro* fase II" do que na "Multiplicação *in vitro* fase I" para a maior parte das matrizes. Nesse sentido, ressaltamos que alguns protocolos de micropropogação utilizam apenas os segmentos nodais como fonte de explantes para o desenvolvimento de brotações axilares (Oliveira *et al.* 2012; Wang & Yao 2017). Nossos resultados evidenciam a importância da manutenção do meristema apical caulinar, visto que o gênero *Pinus,* que representa uma planta com sistema monopodial de ramificação, apresenta muitas vezes a necessidade da presença deste meristema para sua sobrevivência. Além disso, o explante formado pelo segmento apical cresce *in vitro*, de modo que passa a ser fornecedor de segmentos nodais (conforme proposto por Baxter *et al.* (1989) e discutido no Capítulo 2 desta tese) já

condicionados ao ambiente *in vitro*, aumentando assim o sucesso do estabelecimento do material, a formação e a manutenção de um microjardim clonal.

Outro aspecto a ser considerado, é o número de brotações isoladas com comprimento igual ou superior a 3,0 cm nos segmentos apicais e nodais NII oriundos do meio de cultura WPM e WV5 (Tabela 2). Nota-se que o número de brotações isoladas variou em relação à matriz, meio de origem e tipo de explante.

Tabela 2. Brotações isoladas ao final do segundo e quarto subcultivo com pelo menos 3,0 cm de comprimento em segmentos apicais (A) e nodais (NII) oriundos dos meios de cultura WPM ou WV5 na etapa de multiplicação em dez matrizes do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea,* em meio de cultura WV5 multiplicação.

Matriz	Meio de origem	2º subcultivo		4º subcultivo		Total	
		A	NII	A	NII	A	NII
46	WV5	1	6	2	7	3	13
	WPM	3	0	8	1	11	1
47	WV5	0	0	0	1	0	1
	WPM	0	0	0	0	0	0
48	WV5	4	6	0	6	4	12
	WPM	0	0	0	0	0	0
53	WV5	0	0	0	0	0	0
	WPM	0	1	1	0	1	1
55	WV5	0	0	0	0	0	0
	WPM	0	0	0	0	0	0
69	WV5	0	14	4	7	4	21
	WPM	0	0	0	0	0	0
80	WV5	2	2	4	3	6	5
	WPM	0	0	0	0	0	0
83	WV5	0	5	2	12	2	17
	WPM	0	2	0	2	0	4
87	WV5	6	4	2	10	8	14
	WPM	0	0	2	2	2	2
91	WV5	1	5	0	5	1	10
	WPM	0	0	0	7	0	7

Em relação às matrizes, o maior número de brotações isoladas (28 brotações) ocorreu na matriz 46, de modo que houve o isolamento de brotações nos dois tipos de explantes oriundos dos dois meios de cultura. Porém, o resultado inverso também foi observado, onde nenhuma brotação foi isolada na matriz 55 em nenhum dos tipos de explante para ambas as origens de meio de cultura (WPM e WV5), confirmando dessa forma, nossa discussão sobre a genótipo dependência no desenvolvimento *in vitro* do híbrido *P. elliotti* x *P. caribaea*.

Ao analisarmos os resultadores referentes ao tipo de explante, o maior número de brotações isoladas ocorreu nos segmentos nodais NII para a maior parte das matrizes (47, 48, 69, 83, 87 e 91), o que era esperado visto que a ausência da dominância apical, exercida pelo meristema apical caulinar, facilita e favorece o crescimento das brotações axilares (Scaltsoyiannes *et al.* 1994).

Por fim, em relação ao meio de cultura obtivemos maior número de brotações isoladas no meio de cultura WV5, corroborando com os dados de Oliveira *et al.* (2012), que não realizou o isolamento das brotações, mas avaliou o crescimento destas e constatou uma taxa de crescimento maior no material mantido no meio WV5 em relação aos meios WV3, DCR e MS. Segundo os autores, esse maior crescimento pode ser devido à elevada concentração de mio-inositol presente no meio WV5, visto que é uma fonte de carboidrato e já foi citado por como estimulante de crescimento de brotações (George *et al.* 2008).

3.3.4 Alongamento

O uso do carvão ativado para o alongamento de brotações é amplamente descrito para diversas espécies de *Pinus (*David 1982; Baxter *et al.* 1989; Stojicic *et al.* 1999; Alonso *et al.* 2006), de modo que alguns autores consideram o uso do carvão ativado como essencial para a etapa de alongamento (De Diego *et al.* 2010; Wang & Yao 2017). Todavia, apesar de geralmente serem satisfatórios, os resultados podem

ser diversos dependendo da espécie estudada e de outros fatores ainda não esclarecidos (Pan & Staden 1998).

Nesse sentido, avaliamos o desenvolvimento e alongamento de brotações axilares de segmentos nodais NI nas matrizes 46, 47, 48, 69 e 83 e sua relação com o meio de cultura de origem na etapa "Multiplicação *in vitro* fase I", a Tabela 3 mostra o número de brotações com pelo menos 3,0 cm de comprimento que foram isoladas.

Tabela 3. Brotações isoladas ao final do segundo e quarto subcultivo em meio de cultura WV5 alongamento com pelo menos 3,0 cm de comprimento em segmentos nodais NI oriundos dos meios de cultura WPM ou WV5 multiplicação em cinco matrizes do hídrido *P. elliottii* x *P. caribaea.*

Matriz	Meio de origem	2º subcultivo	4º subcultivo	Total
		NI	NI	
46	WV5	5	7	12
	WPM	1	5	6
47	WV5	0	0	0
	WPM	0	0	0
48	WV5	0	3	3
	WPM	3	2	5
69	WV5	0	0	0
	WPM	0	10	10
83	WV5	10	6	16
	WPM	7	1	8

As matrizes 46 e 83 apresentaram maior número de brotações isoladas nos segmentos nodais NI oriundos do meio de cultura WV5 multiplicação, diferentemente das matrizes 48 e 69 que desenvolveram mais brotações alongadas nos segmentos nodais NI provenientes do meio de cultura WPM, já a matriz 47 não teve nenhuma brotação alongada independentemente do meio de origem (Figura 11).

Figura 11. Segmentos nodais NI de *P. elliottii* x *P. caribaea* em meio de cultura WV5 alongamento **A.** Matriz 46 com o desenvolvimento de brotações axilares alongadas. **B**. Matriz 47 sem brotações axilares e segmentos nodais NI em senescência.

A análise de sobreviência (Figura 12) corrobora com os dados de brotações isoladas, ressaltamos porém, que as matrizes 46 e 83 apresentaram maior número de brotações isoladas para os segmentos nodais NI oriundos do meio de cultura WV5, também apresentaram maior porcentagem de sobrevivência nesse material, e de forma oposta, a matriz 47 que não apresentou nenhuma brotação isolada teve baixa sobrevivência em meio de cultura WV5 alongamento, independentemente do meio de origem. Além disso, a matriz 69 que formou brotações isoladas apenas nos segmentos nodais NI provenientes do meio de cultura WPM multiplicação, teve baixa sobrevivência dos explantes oriundos do meio de cultura WV5.

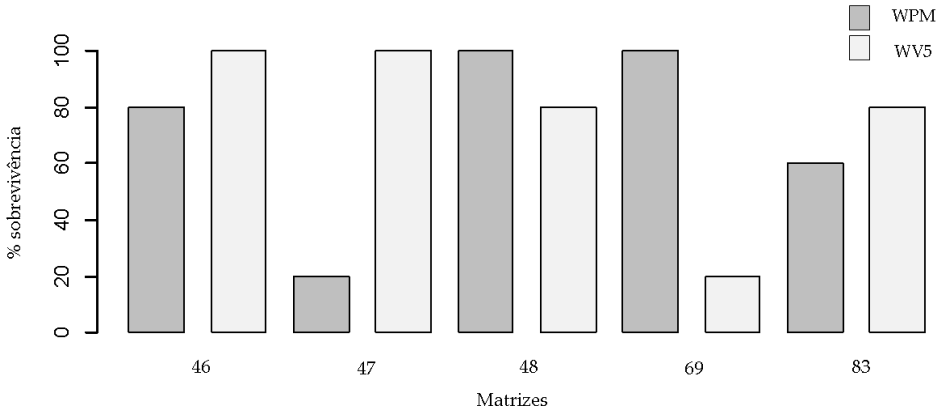

Figura 12. Porcentagem de sobrevicência de segmentos nodais NI em meio de cultura WV5 alongamento ao final do quarto subcultivo, oriundos dos meios de cultura WPM ou WV5 na "Multiplicação *in vitro* Fase I" em cinco matrizes do hídrido *P. elliottii* x *P. caribaea*.

Quando analisamos a sobrevivência dos segmentos nodais NI da matriz 47 na "Multiplicação *in vitro* fase I" (Figura 6) percebemos que os segmentos mantidos em meio de cultura WV5 multiplicação apresentaram 60% de sobrevivência, diferentemente dos explantes das outras matrizes que apresentaram 100% de sobrevivência. Todavia, quando analisamos a sobrevivência dos segmentos nodais NII na "Multiplicação *in vitro* fase II" (Figura 10) observamos que a sobrevivência desses explantes da matriz 47 foi de 100%, com isso descartamos a possibilidade de uma possível intolerância à elavada concentração de sais do meio WV5, o que nos permite inferir que esta matriz não se adaptou às condições proporcionadas pelo meio de cultura com carvão ativado.

Ainda nesse sentido, em relação a matriz 69 não podemos inferir o mesmo, pois os segmentos nodais NI oriundos do meio WPM multiplicação apresentaram 100% de sobrevivência em meio de alongamento e apenas o material oriundo do meio WV5 multiplicação apresentou baixa sobrevivência no meio com carvão ativado. Além disso, ao observarmos a tabela de brotações isoladas na "Multiplicação *in vitro* fase II" (Tabela 2) a matriz 69 apresentou maior número de brotos alongados no material oriundo do meio de cultura WV5 (21 brotações), resultado inverso do obtido na fase de alongamento, ou seja, teve mais brotações isoladas no material oriundo do meio de cultura WPM (10 brotações).

Uma possível explicação para este fato pode estar relacionada a ação adsorvente do carvão ativado, diversos trabalhos de micropropagação discutem sobre a adsorção de compostos que podem prejudicar o desenvolvimento *in vitro*, porém, a capacidade de adsorção do carvão ativado não é seletiva (Pan & Staden 1998).

A literatura apresenta alguns trabalhos sobre a adsorção de tiamina, outras vitaminas, nutrientes como ferro e zinco, além do trabalho de Ebert *et al.* (1993) onde destacam que os componentes do meio de cultura competem no processo de adsorção, além de alguns apresentam maior afinidade que outros, de modo que o

uso do carvão ativado pode inativar molécular essenciais para o desenvolvimento *in vitro*, resultando em efeitos negativos na cultura (Pan & Staden 1998).

Nesse contexto, em relação à matriz 69 o material oriundo do meio de cultura WV5 multiplicação poderia estar adaptado a uma elevada disponibilidade de nutrientes, diferentemente do material oriundo do meio WPM multiplicação, que representa um meio mais pobre em nutrientes, portanto não sentiu carência nutricional e se adaptou melhor ao meio de cultura de alongamento com carvão ativado.

Diante desses resultados, podemos dizer que o carvão ativado foi excelente para o alongamento de brotações em algumas matrizes (46 e 83) e sem efeito (48) ou até mesmo prejudicial (47 e 69 para o material oriundo do meio WV5 multiplicação) para outras. Com isso, encontramos na literatura estudos que obtiveram resultados positivos e negativos para o uso do carvão ativado em meio de alongamento na mesma espécie, como no trabalho de Alonso *et al.* (2006) que avaliaram o alongamento de brotações adventícias oriundas de explantes cotiledonares de *P. pinea* sob estímulo do carvão ativado ou de reguladores de crescimento e afirmaram que o uso de carvão ativado foi melhor que o uso dos reguladores. Todavia, no estudo realizado por García-Férriz *et al*. (1994) o carvão ativado não promoveu o alongamento das brotações adventícias também oriundas de cotilédones de *P. pinea*.

Dessa forma, o uso do carvão ativado na fase de alongamento foi benéfico dependendo do genótipo do material, de modo que a genótipo dependência foi um fator relevante no desenvolvimento *in vitro* do híbrido.

3.4 Considerações Finais

Foi possivel estabeler um protocolo básico para a micropropagação do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* a partir de miniestacas. O meio de cultura WV5 suplementado com 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA e 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP foi eficiente para

promover o desenvolvimento de brotações axilares tanto em segmentos apicais quanto nodais da maior parte das matrizes avalaliadas.

O material mantido em meio de cultura WPM quando transferido para o meio WV5 recuperou o desenvolvimento formando brotações. Dessa forma, o uso alternado entre os subcultivos do meio de cultura WPM e WV5 pode ser uma estratégia para a manutenção de um microjardim clonal.

Em relação ao uso do carvão ativado, este foi eficiente no alongamento de brotações para algumas matrizes, porém prejudicou o desenvolvimento de outras, caracterizando genótipo dependência.

Ainda nesse sentido, em todas as fases da micropropagação percebemos a elevada influência do genótipo nas respostas *in vitro*, a matriz 46 por exemplo, apresentou respostas excelentes independentemente do tipo de explante e meio de cultura, enquanto outras matrizes apresentaram respostas distintas em relação aos explantes, meios de cultura e tratamento de origem na etapa anterior da micropropagação.

Dessa forma, para a micropropagação de genótipos especificos serão necessárias adaptações deste protocolo básico.

Referências

Alonso P, Moncaleán P, Fernandéz B, Rodríguez A, Centeno ML Ordás RJ (2006) An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). Annals of Forest Science 63(8): 879-885

Baxter R, Brown SN, England NF, Ludlow CHM, Taylor SL, Womack RW (1989) Production of clonal plantlets of tropical pine in tissue culture via axillary shoot activation. Canadian Journal of Forest Research 19:1338-1342

Bonga JM, Von Aderkas P (1992) In vitro culture of trees – Forestry Series. Kluwer Academic Publishers 38:66-106

Caldas LS, Haridasan P, Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Ed) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1:37-64.

Coke JE (1996a) Basal nutrient medium for in vitro cultures of Loblolly pines. US Patent 5534434.

Coke JE (1996b) Basal nutrient medium for in vitro cultures of Loblolly pines. US Patent 5534433

Cordeiro GM, Brondani GE, Oliveira LS, Almeida M (2014) Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labil. Scientia Forestalis 42:337-344

David A (1982) In vitro propagation of gymnosperms. In: Bonga J, Durzan D, Nijhoff M (Ed) Tissue culture in forestry. The Hague, Boston, London, 89p.

De Diego N, Montalbán IA, Moncaleán P (2010) In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees. South African Journal of Botany 76:158–162.

Ebert A, Taylor F, Blake J (1993) Changes of 6-benzylaminopurine and 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33:157–162

Esposito-Polesi NP, Oliveira LS, Baccarin FJBJ, Almeida CV, Almeida M (2018) Different culture conditions applied to in vitro shoot multiplication of two *Eucalyptus benthamii* explant sources. Journal of Forestry Research 1:1-13. 10.1007/s11676-018-0816-1

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158

García-Férriz L, Serrano L, Pardos JA (1994) In vitro shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcutting production in stone pine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:135–140

George EF, Hall MH, De Klerk GJ (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Berlin, 3ed, v1, 501p

Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid Lycopersicum esculentum (tomato). Planta107:473-497

Gupta PK, Durzan DJ (1985) Shoot multiplication from matures trees of Douglas fir, Pseudotsuga menziesii, and sugar pine, *Pinus lambertiana*. Plant Cell Reports 4:177-179

Lloyd G, Mccown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifólia, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society 30:421-427

Mehra-Palta A, Smeltzer RH, Mott RL (1978) Hormonal control of induced organogenesis – Experiments with excised plant parts of loblolly pine. Tappi Journal 61(1):37-40

Meneghetti EC, Oliveira LS, Almeida M (2019) Multiplicação *in vitro* de *Neoregelia johannis* (Carriére) L.B. Smith em meio líquido sob diferentes concentrações de nutrientes. Iheringia 74:1-8. 10.21826/2446-82312019v74e2019012

Mott RL, Amerson HV (1981) A tissue culture process for the clonal production of loblolly pine plantlets. Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Research Service 271:3-14

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497

Nunes S, Sousa D, Pereira VT, Correia S, Marum L, Santos C, Dias MC (2018) Efficient protocol for in vitro mass micropropagation of slash pine. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 54(2):175-183. 10.1007/s11627-018-9891-4

Oliveira LF, Ribas LLF, Quoirin M, Koehler HS, Amano E, Higa AR (2012) Micropropagation of *Pinus taeda* L. from juvenile material. Tree and Forestry Science and Biotechnology 6:96-101

Pan MJ; Staden JV (1998) The use of charcoal in in vitro culture – A review. Plant Growth Regulation 26:155-163

Preece JE (1995) Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? Plant Tissue Culture and Biotechnology 1(1):26-36

Quoirin M, Lepoivre P (1977) Etudes de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus. Acta Horticulturae 78:437-442

Sarmast MK (2018) In vitro propagation of conifers using mature shoots. Journal of Forestry Research 9(3):565–574. 10.1007/s11676-018-0608-7

Scaltsoyiannes A, Panetsos K, Economou A, Tsoulpha P (1994) Micropropagation of the pine hybrid *Pinus brutia* (Ten) x *Pinus halepensis* (Mill) by culturing fascicle shoots. Annals of Forest Science 51:175-182.

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50:199-204

Stojicic D, Budimir S, Culafic L (1999) Micropropagation of *Pinus heldreichii.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59:147–150.

Sul IW, Korban SS (2004) Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. Plant Growth Regulation 43:197-205. doi.org/10.1023/B:GROW.0000046013.47892.4f

Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances. 26(6):618-631. 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003

Thorpe TA, Kumar PP (1993) Cellular control of morphogenesis. In: Ahuja MR (Ed.) Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 11-29

Vejsadová H, Lukášová M (2010) Shoot organogenesis induction from genetically verified individuals of endangered bog pine (*Pinus uncinata* subsp. *Uliginosa*). Journal of Forest Science 56:341-347

Wang Y, Yao R (2017) Plantlet regeneration of adult *Pinus massoniana* Lamb. trees using explants collected in March and thidiazuron in culture medium. Journal of Forestry Research. 10.1007/s11676-017-0412-9

Zanella LB, Franciscon L, Grunennvaldt RL, Tomasi JC, Degenhardt-Goldbach J (2018) Micropropagation of *Pinus tecunumanii.* Ciência Florestal 28(2):651-660. 10.5902/1980509832058

4 INDUÇÃO AO ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DO HÍBRIDO *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

Resumo

O desenvolvimento de raízes adventícias é essencial para a produção de mudas propagadas, todavia muitas espécies florestais são recalcitrantes ao enraizamento. Técnicas de cultivo *in vitro* podem auxiliar na superação desse entrave, dessa forma, o objetivo deste trabalho foi induzir o enraizamento *in vitro* de microestacas do híbrido *Pinus elliottii x Pinus caribaea.* No primeiro experimento avaliamos o potencial de enraizamento de materiais de microjardins clonais estabelecidos a partir de minicepas com oito e um ano de idade. No segundo experimento verificamos a resposta do material sob *pulsing* ou exposição contínua aos reguladores de crescimento. Como resultado no primeiro experimento, tivemos o desenvolvimento de raízes adventícias apenas no material das minicepas mais jovens, a melhor porcentagem de enraizamento (28%) ocorreu no tratamento com 0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA. No segundo experimento conseguimos 31,3% de enraizamento sob exposição contínua de 0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA. Com isso ressaltamos sobre a necessidade de renovação do material nos minijardins clonais, visto a perda da capacidade de enraizamento adventício com a maturidade do material.

Palavras-chave: Organogênese, *In vitro*, Reguladores de crescimento, *Pulsing*

Abstract

The development of adventitious roots is essential to produce propagated plants, but many forest species are recalcitrant to the rooting. In vitro cultivation techniques can help in overcoming this barrier, so the objective of this work was to induce the in vitro rooting of *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* hybrid cuttings. In the first experiment evaluated the rooting potential of materials from clonal microgardens established from eight and one year old miniceps. In the second experiment we verified the material response under pulsing or continuous exposure to growth regulators. How result of the first experiment, we had adventitious roots development only in the material from the younger miniceps, the best rooting percentage (28%) occurred in the treatment with 0.27 $mg.L^{-1}$ NAA. In the second experiment, we achieved 31.3% rooting under continuous exposure of 0.27 $mg.L^{-1}$ NAA. Thus, we emphasize the need for material renewal in clonal minigardens, given the loss of adventitious rooting capacity with the material maturity.

Keywords: Adventitious organogenesis, In vitro, Growth regulators, Pulsing

4.1 Introdução

Um dos maiores desafios na propagação clonal de espécies florestais relaciona-se à capacidade de enraizamento adventício, que é a formação de raízes a partir de tecidos não-radiculares (Rasmussem *et al*. 2015). Esse processo envolve três etapas: indução, iniciação e expressão; a indução ocorre quando células-alvo recebem sinais bioquímicos/fisiológicos que levam essas células a passar por alterações anatômicas resultando na etapa de iniciação e então expressão da raiz que ocorre quando primórdios radiculares se alongam e ficam visíveis (George 1993; Gaspar *et al.* 1994; Monteuuis 2016).

Dessa forma, percebe-se que o processo é complexo e regulado em diferentes níveis, porém sabe-se que o declínio na capacidade de enraizamento adventício está associado à idade e maturidade das plantas (Greenwood & Hutchison 1993; Pizarro & Díaz-Sala 2019).

Os principais métodos de propagação do híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* são a estaquia e a miniestaquia, todavia, à medida que as cepas e minicepas amadurecem as brotações apresentam menores taxas de enraizamento e/ou produzem sistemas radiculares com capacidades inferiores em relação ao material juvenil, corroborando com os dados da literatura sobre a maturação ser um dos principais obstáculos em sistemas de produção clonal (Rasmussen *et al*. 2009).

A micropropagação é uma das técnicas utilizadas como uma alternativa para reverter a maturação por um processo conhecido como rejuvenescimento, este processo ocorre pelos sucessivos subcultivos em meio de cultura, geralmente contendo citocininas, resultando no resgate da juvenilidade. (Bonga & von Aderkas 1993; Wendling *et al.* 2014).

Após essa etapa, em estudos realizados com espécies do gênero *Pinus,* as brotações são transferidas para um meio de cultura de enraizamento, geralmente com níveis de sais e carboidratos reduzidos, visto que a menor cencentração de nutrientes, principalmente de nitrogênio, parece favorecer o enraizamento adventício; além de uma combinação de auxina e citocinina (Ragonezi *et al.* 2010;

Moot & Amerson 1981). Todavia, apesar de todos os trabalhos realizados até o momento, muitos genótipos apresentam limitações nesta fase o que dificulta sua propagação à nivel comercial.

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi induzir o enraizamento adventício *in vitro* de microestacas de *P. elliottii* x *P. caribaea,* a fim de superar sua recalcitrância e produzir mudas a partir da micropropagação.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Localização da área experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, Piracicaba – SP.

4.2.2 Material vegetal

As microestacas utilizadas neste estudo foram oriundas de dois microjardins clonais estabelecidos *in vitro* que denominados como "Microjardim clonal I" e "Microjardim clonal II". Para o estabelecimento do "Microjardim clonal I" foram utilizadas miniestacas oriundas de um canaletão com oito anos de idade, já o "Microjardim clonal II" foi estabelecido a partir de miniestacas das matrizes selecionadas no Capítulo 1 desta tese (22, 26, 46, 47, 48, 53, 55, 69, 80, 83, 87 e 91) coletadas em um canaletão com um ano de idade.

Os processos de introdução e estabelecimento foram os mesmos para os dois microjardins clonais: as miniestacas tiveram as folhas primárias cortadas, foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguida de imersão em solução de fungicida Orthocide® (2,4 $g.L^{-1}$) + Tween 20® (3 gotas/100mL) por 15 minutos, água deionizada autoclavada (3 vezes), solução de hipoclorito de sódio comercial 30% + Tween 20® (3 gotas/100mL) por 10 minutos, sendo então encaminhadas para a

câmara de fluxo onde foram enxaguadas em água deionizada autoclavada (3 vezes) e então inoculadas em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 3,0 mL do meio de cultura de introdução MS (Murashige & Skoog 1962) sem a adição de reguladores de crescimento, com 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarose e 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar, tendo o pH ajustado para 5,8.

Os explantes que sobreviveram e que não apresentaram contaminação fúngica foram cortados em segmentos apicais e nodais e transferidos para o meio de cultura multiplicação WPM (Lloyd & Mccown 1980) suplementado com 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético), 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina), 800 $mg.L^{-1}$ de polivinilpirrolidona (PVP), 30,0 $g.L^{-1}$ de sacarose e 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar. Os subcultivos para renovação do meio de cultura se deram a cada 28 dias.

As condições de cultivo tanto para o estabelecimento e manutenção do material *in vitro* quanto para os experimentos decritos a seguir foram: sala de crescimento com temperatura (26 ± 2º C), luminosidade (40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) e fotoperíodo de 16/08 horas (luz/escuro) controlados.

4.2.3 Experimento I

No Experimento I comparamos microestacas do "Microjardim clonal I" mantido *in vitro* há três anos e meio e do "Microjardim clonal II" mantido *in vitro* há um ano. Para tanto, microestacas com aproximadamente 4,0 cm de comprimento foram transferidas para tubos de ensaio (24 x 150 mm) contendo 5,0 mL do meio de cultura ½ WV5, meio de cultura WV5 (Coke 1996) com metade da concentração de sais e vitaminas, suplementado com 20,0 $g.L^{-1}$ de sacarose, 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar, pH ajustado para 5,8 e com as concentrações dos reguladores de crescimento descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético), BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido indolbutírico) em meio de cultura ½ WV5 para a indução ao enraizamento de microestacas de *P. elliottii* x *P. caribaea* oriundas de dois microjardins clonais.

Tratamento	ANA ($mg.L^{-1}$)	BAP ($mg.L^{-1}$)	AIB ($mg.L^{-1}$)
EI.1	0,27	-	-
EI.2	0,27	0,09	-
EI.3	-	-	2,0

O experimento foi mantido por um subcultivo de oito semanas, e a análise de enraizamento foi realizada ao final do experimento. Dessa forma, o experimento foi organizado em arranjo fatorial inteiramente casualizado (2X3), a fim de analisar microestacas oriundas de dois microjardins clonais sob atuação de três tratamentos com reguladores de crescimento, totalizando 25 repetições por tratamento.

4.2.4 Experimento II

O Experimento II utilizou apenas microestcas do "Microjardim clonal II" que apresentassem aproximadamente 4,0 cm de comprimento, estas foram transferidas para tubos de ensaio (24 x 150 mm) contendo 5,0 mL do meio de cultura ½ WV5, meio de cultura WV5 (Coke 1996) com metade da concentração de sais e vitaminas, com 20,0 $g.L^{-1}$ de sacarose, 4,5 $g.L^{-1}$ de ágar, pH ajustado para 5,8, associado a um dos tratamentos descritos na Tabela 2. O experimento foi mantido por um subcultivo de oito semanas, e a análise de enraizamento foi realizada a cada sete dias até o final do experimento.

Ressaltamos que nos tratamentos de exposição contínua durante as oito semanas do experimento, as microestacas foram mantidas no mesmo meio de cultura e nos tratamentos de *pulsing,* após 10 dias do início do experimento as microestacas foram transferidas para um meio de cultura de mesma constituição porém isento de reguladores de crescimento.

Tabela 2. Concentração dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) sob exposição contínua ou *pulsing* em meio de cultura ½ WV5 para a indução ao enraizamento de microestacas de *P. elliottii* x *P. caribaea.*

Tratamento	ANA ($mg.L^{-1}$)	BAP ($mg.L^{-1}$)	Exposição
EII.1	0,27	-	Contínua
EII.2	0,27	-	*Pulsing*
EII.3	0,27	0,09	Contínua
EII.4	0,27	0,09	*Pulsing*

Com isso, o experimento foi estabelecido em arranjo fatorial inteiramente casualizado (2X2), a fim de relacionar o enraizamento das microestacas à duas combinações de reguladores de crescimento e duas formas de exposição destes, utilizando 16 repetições por tratamento.

4.2.5 Análise Histológica e Histoquímica

Microestacas dos dois experimentos (I e II) foram separadas para análise histológica e histoquímicas a fim de monitorar o desenvolvimento de raízes adventícias.

Para tanto, a base da microestaca foi coletada e fixada em solução de paraformaldeído 4% por 5 horas, passando por 15 minutos no vácuo (-600 mgHg), sendo em seguida transferida para o fixador Karnovsky (1965) e submetida a 14 séries de 30 minutos em vácuo (-600 mgHg), além de um período *over night*. Posteriormente, o material foi submetido a desidratação em série alcoólica-etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% v/v) de 15 minutos cada e inclusos em resina de hidroexietil metacrilato (Historesin, Leica®, Heidelberg, Germany) com aumento do tempo das etapas recomendadas pelo fabricante: 3 horas etanol 100%: historesina (1:1); 3 horas etanol 100%: historesina (1:2); 72 horas em historesina 100%. A etapa de emblocagem seguiu as recomendações do fabricante.

Foram realizados cortes longitudinais da região de interesse com 7,0 μm de expessura empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a um micrótomo

rotativo manual. As secções foram submetidas à coloração dupla com PAS e Naphol blue black (Fisher 1968), reativos para polissacarídeos presentes nas paredes celulares e no citoplasma; amiloplastos corados em cor-de-rosa; compostos fenólicos corados em laranja e proteínas em azul.

Posteriormente, foram montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®) e analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) sendo as imagens capturadas com câmera SAMSUNG® (SDC-313).

4.2.6 Análise dos dados

Os dados mensurados de cada experimento foram submetidos à análise descritiva, usando os dados de contagem transformados em percentuais.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Experimento I

Houve o desenvolvimento de raízes adventícias sem a formação de calos nos três tratamentos avaliados, porém, apenas no material proveniente do "Microjardim clonal II" como pode ser observado na Figura 1.

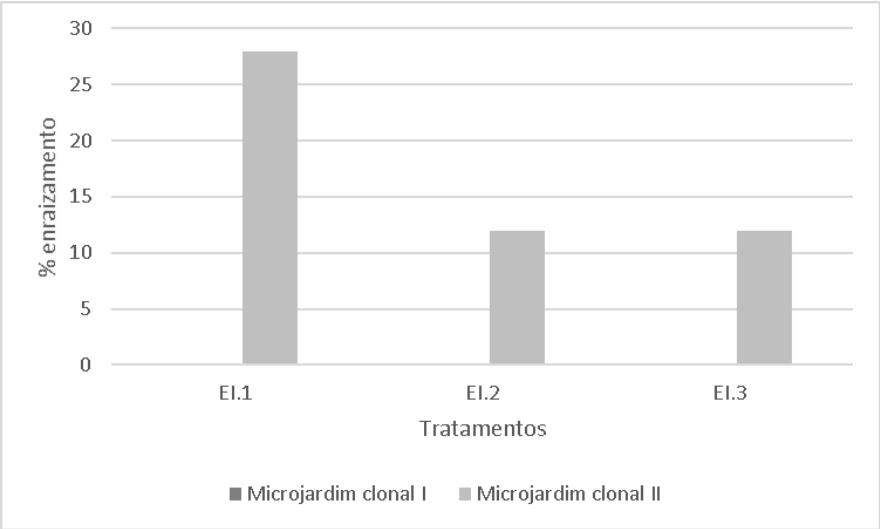

Figura 1. Porcentagem de enraizamento de microestacas de *P. elliottii x P. caribaea* oriundas de dois microjardins clonais, sob três combinações de reguladores de crescimento após oito semanas.

Wang & Yao (2019) avaliaram a influência dos subcultivos sucessivos na capacidade de enraizamento de brotações oriundas de árvores com 26 anos de *P. massoniana* submetidas ou não ao processo de rejuvenescimento via enxertia seriada. Constataram que os subcultivos sucessivos não influenciaram a capacidade de enraizamento das brotações oriundas de material maduro não rejuvenescido, porém o material maduro que foi previamente rejuvenescido via enxertia seriada apresentou aumento na taxa de enraizamento a cada subcultura (81,1% na primeira subcultura e 93,3 % na quarta subcultura).

Dessa forma, podemos inferir que não houve o desenvolvimento de raízes adventícias no material oriundo do "Microjardim clonal I" pois foi estabelecido a partir de miniestacas coletadas de minicepas maduras (oito anos em canaletão) e que o processo de micropropagação realizado para o estabelecimento do microjardim clonal, apesar dos subcultivos realizados a cada 28 dias durante 3,5 anos não foram suficientes para rejuvenescer o material.

Em relação aos resultados obtidos com o material oriundo do "Microjardim clonal II" a melhor porcentagem de enraizamento (28%) foi obtidas no tratamento EI.1 (0,27 $mg.L^{-1}$ ANA) (Figura 1). A auxina ANA tem sido relatada na literatura como sendo superior às outras auxinas no processo de enraizamento (Wang & Yao 2017). Nunes *et al.* (2018) com brotações isoladas de plântulas germinadas *in vitro* de *P. elliotti*, conseguiram 84,4% de enraizamento com 0,5 $mg.L^{-1}$ de ANA, porém com elevada formação de calos e baixa qualidade das raízes. Nesse mesmo estudo (Nunes *et al.* 2018), a concentração 2,0 $mg.L^{-1}$ de AIB atingiu 43% de enraizamento sem a formação de calos, todavia, nós utilizamos essa mesma concentração a conseguimos apenas 12% de enraizamento.

Nesse sentido, dependendo da fonte das brotações o sucesso no enraizamento pode variar, protocolos que usam explantes oriundos de plântulas germinadas *in vitro* apresentam melhores taxas de enraizamento que explantes oriundos de plantas mais maduras, como no trabalho de Zanella *et al.* (2018) que utilizou como explantes brotações apicais de *P. tecucnumanii* com um ano e meio de

idade conseguindo apenas 14% de enraizamento em meio de cultura ½ WV5 suplementado com 0,5 mg.L^{-1} de ANA e 0,09 mg.L^{-1} de BAP.

O uso de outros reguladores de crescimento (citocinina ou giberilina) juntamente com uma auxina, em vez da auxina isolada, foi proposto por Mehra-Palta *et al.* (1978) para aumentar a porcentagem de enraizamento em brotações de *P. taeda*, esse tratamento (0,5 mg.L^{-1} de ANA e 0,09 mg.L^{-1} de BAP) vem sendo utilizado por diversos trabalhos com espécies de *Pinus* (Cézar *et al.* 2015; Zanella *et al.* 2018). Todavia em nosso trabalho a presença de citocinina reduziu a eficiência da auxina, o que poderia ter auxiliado se tivesse ocorrido a formação de calos, portanto o uso conjunto de BAP e ANA não trouxe resultados satisfátorios para o enraizamento do híbrido.

4.3.2 Experimento II

Trabalhos sobre o enraizamento de espécies do gênero *Pinus* são abordados de duas formas: aqueles que usam um meio de indução e para o alongamento das raízes após um período transferem para um meio de cultura de expressão livre de reguladores de crescimento (Dumas & Monteuuis 1995; De Diego *et al.* 2008; Cézar *et al.* 2015), e aqueles que fazem uma exposição contínua aos reguladores de crescimento, geralmente uma auxina (Wang & Yao 2017; Nunes *et al.* 2018).

Nesse contexto montamos nosso experimento de modo a avaliar as duas abordagens e verificamos que para o híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea*, o uso isolado da auxina ANA (0,27 mg.L^{-1}) sob exposição contínua (tratamento EII.1) apresentou a melhor porcentagem de enraizamento (31,3%) em um menor período de tempo (40,6 dias), sendo que a primeira raiz adventícia surgiu aos 35 dias de experimento (Figura 2).

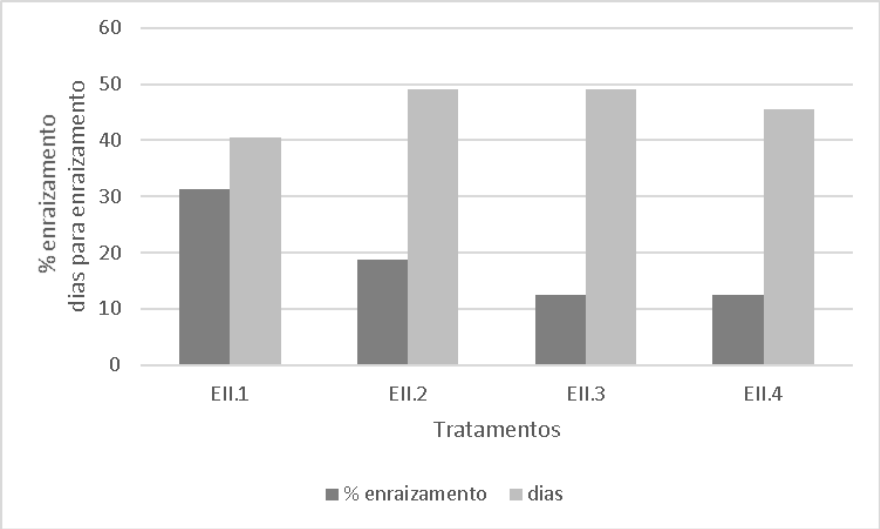

Figura 2. Porcentagem de enraizamento e dias para o enraizamento de microestacas de *P. elliottii x P. caribaea* sob duas combinações de reguladores de crescimento e dois tipos de exposição.

Nossos resultados assemelham-se aos de Oliveira *et al.* (2012) em microestacas de *P. taeda,* que também obtiveram as primeiras raizes adventícias após 35 dias de cultivo *in vitro*, porém os melhores resultados foram obtidos em meio de indução (água e ágar suplementado com 0,5 mg.L^{-1} de ANA e 0,09 de BAP) por 12 dias, seguido de transferência para o meio de cultura ½ GDm isento de reguladores, onde obtiveram 47,5% de enraizamento ao final de 70 dias, nesse aspecto, a redução do tempo de permanência do material *in vitro* é desejável, visto que diminui os custos labotaroriais tornando-se economicamente favorável para a utilização em larga escala.

Assim como nos resultados discutidos no Experimento I, o uso de BAP juntamente com ANA (tratamentos EII.3 e EII.4) não foi melhor que o uso de ANA isolado (tratamentos EII.1 e EII.2). Dessa forma, nossos resultados favoráveis tanto com o uso isolado de ANA quanto com a exposição contínua aos reguladores de crescimento não corrobora diversos artigos da literatura (Dumas & Monteuuis 1995; De Diego *et al.* 2008; Cézar *et al.* 2015).

Nesse contexto, a revisão sobre o controle do enraizamento adventício em estacas publicada recentemente por Druege *et al.* (2019) destaca a interação de diversos fatores para que ocorra a diferenciação das células da base da estaca, em

relação ao controle exercido pela auxina, este envolve fatores de transcrição e microtúbulos além de estar relacionado à outros hormônios como: etileno, jasmonatos, citocininas e estrigolactonas, que estão sujeitos a fatores epigenéticos, que apresentam relações com sinais metabólicos relacionados ao *status* nutritivo da planta, e ainda fatores ambientais como a luz que podem modificar a resposta ao enraizamento adventício geneticamente controlado.

Em relação ao controle genético, Trueman (2006) relata que a porcentagem de enraizamento do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* é altamente dependente do genótipo, dessa forma, além do enraizamento adventício ser influenciado por diversos fatores o que dificulta isolar essas variáveis para testá-las em experimentos, nosso material possui elevada genótipo dependência para essa característica, tornando o desenvolvimento de protocolo geral para o híbrido um grande desafio.

4.3.3 Análise Histológica e Histoquímica

O estudo anatômico é importante para monitorar o desenvolvimento e principalmente a conexão vascular entre a raiz adventícia e o caule, visto que essa conexão é essencial para o funcionamento do sistema vascular e sobrevivência da planta após o transplante e também, para que não ocorra tombamento da árvore após o crescimento em campo (Wagley *et al.* 1987; George *et al.* 2008).

Nesse contexto, a análise anatômica confirmou que o desenvolvimento das raízes adventícias ocorreu de modo direto sem a formação de calo, apesar das microestacas terem apresentado um entumecimento (engrossamento) na região basal (Figura 3A) o que não ocorreu nas microestacas sem o desenvolvimento de raízes adventícias (Figura 3B).

O protocolo utilizado possibilitou a identificação de regiões com elevada atividade meristemática e a confirmação de conexão vascular (Figuras 3C e D) entre a microestaca e as raízes adventícias em todas as amostras avaliadas, além disso, a origem das raízes adventícias ocorreu por atividade do procâmbio ou câmbio

vascular, na dependência do estádio de desenvolvimento da mcroestaca, que apresentou divisões periclinais (Figuras 3E e F) onde pudemos detectar elevada avitidade metabólica para síntese de proteínas e elevada relação núcleo/citoplasma.

Também realizamos cortes transversais das raízes adventícias e estas apresentaram distribuição histológica semelhante às observadas em raízes típicas da espécie, destacando que algumas desenvolveram raízes laterais (Figura 3G e H), nos permitindo inferir se tratarem de raízes anatômica e fisiologicamente funcionais.

Nossos resultados diferem do observado na literatura por alguns autores, que conseguiram o desenvolvimento de raízes adventícias em espécies do gênero *Pinus* apenas indiretamente, ou seja, a partir de calos (Mott & Amerson 1981; Cuesta *et al.* 2008; Álvarez *et al.* 2009), o que favorece sobremaneira as variações somaclonais.

Todavia, Oliveira *et al.* (2012) para brotações de *P. taeda,* verificaram que as conexões vasculares entre a microestaca e a raiz adventícia não se formaram em um estágio inicial de desenvolvimento (raízes com 0,2 cm de comprimento), mas após o crescimento das raízes a conexão vascular foi estabelecida (raízes com mais de 0,6 cm), de modo que os autores explicam que essa conexão vascular mais tardia ocorreu pela diferenciação de células parênquimáticas do calo em traqueídes, indicando origem indireta das raízes adventícias. Esse tipo de diferenciação não foi observada em nosso trabalho, visto que identificamos atividade meristemática cambial para a rizogênese logo nos estágios iniciais de desenvolvimento confirmando que nosso estudo obteve origem direta das raízes adventícias.

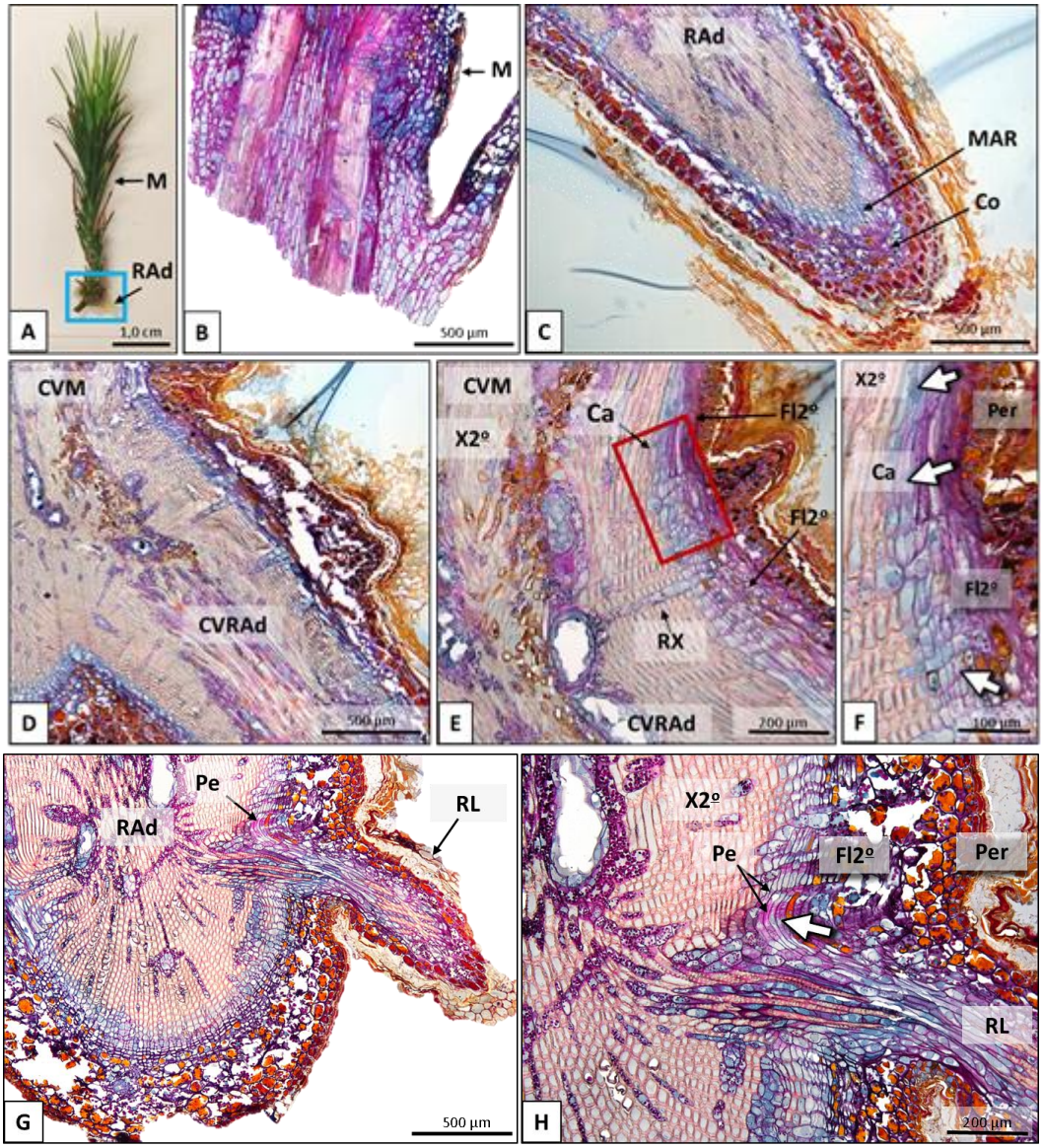

Figura 3. Microestaca e cortes histológicos da rizogênese *in vitro* de *P. elliottii* x *P. caribaea.* **A.** Microestaca com a presença de raiz adventícia, quadrado azul indica a região dos cortes histológicos; **B.** Corte longitudinal (CL) da região proximal da base de microestaca sem o desenvolvimento de raiz adventícia e sem atividade meristemática; **C.** CL da raiz adventícia originada diretamente da microestaca; **D.** CL da conexão vascular entre a microestaca e a raiz adventícia, com destaque à origem direta a partir da atividade do câmbio vascular da microestaca; **E.** CL evidenciando a atividade meristemática cambial (retângulo vermelho); **F.** Detalhe da região delimitada pelo retângulo vermelho com predomínio de divisões periclinais do câmbio; **G.** Corte transversal (CT) da raiz adventícia mostrando o desenvolvimento da raiz lateral; **H.** Detalhe da origem da raiz lateral a partir da atividade meristemática do procâmbio com o predomínio de divisões periclinais. *Ca*: câmbio; *Co*: coifa; *CVM*: cilindro vascular da microestaca; *CVRAd*: cilindro vascular da raiz adventícia; *Fl2º*: floema secundário; *M:* microestaca; *MAR*: meristema apical radicular; *Pe*: periciclo; *Per*: periderme; *RAd:* raiz adventícia; *RL*: raiz lateral; *RX*: raio do xilemático; *X2º*: xilema secundário; *setas brancas*: divisões periclinais.

4.4 Considerações Finais

O enraizamento adventício de microestacas foi possível, embora as porcentagens tenham variado em relação a origem do material, reguladores de crescimento utilizados e o tipo de exposição a estes. O melhor resultado foi alcançado com meio de cultura ½ WV5, suplementado com 20,0 $g.L^{-1}$ de sacarose e 0,27 $mg.L^{-1}$ de ANA sob exposição contínua.

Apesar de muito utilizado em protocolos de enraizamento o AIB (2,0 $mg.L^{-1}$) não apresentou resultado satisfatório, em relação ao uso associado de BAP (0,09 $mg.L^{-1}$) e ANA (0,27 $mg.L^{-1}$) além de não apresentar resultados relevantes, reduziu o enraizamento comparado ao uso de ANA isoladamente, dessa forma, esses tratamentos não são recomendados para o enraizamento *in vitro* de *P. elliotti* x *P. caribaea*.

Brotações de um microjardim clonal estabelecido a partir de um minijardim clonal de oito anos não apresentaram desenvolviemento de raízes adventícias, o que nos leva a questionamentos sobre o processo de rejuvenescimento não ter acontecido durante a etapa de micropropagação e formação do microjardim clonal.

Por fim, apesar das porcentagens de enraizamento não terem sido elevadas, a análise anatômica mostrou conexão vascular entre a microestaca e a raiz adventícia, o que confere elevada funcionalidade ao sistema radicular adventício e consequentemente à microplanta formada, com isso, acreditamos que este protocolo servirá de base para o aperfeiçoamento da etapa de enraizamento do híbrido *P. elliotti x P. caribaea.*

Referências

Álvarez JM, MajadaJ, Ordás RJ (2009) An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) isolated cotyledons Forestry, 176-184. 10.1093/forestry/cpn052

Bonga JM, von Aderkas P (1993) Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation in vitro. In: Ahuja MR, Libby WJ (Eds) Clonal forestry I, genetics and biotechnology. Springer, Berlin, pp 182-199

De Diego N, Montalbán IA, Fernández E, Moncaleán P (2008) In vitro regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. Canadian Journal of Forest Research 38:2607–2615

Druege U, Hilo A, Pérez-Pérez JM, Klopotek Y, Acosta M, Shahinnia F, Zerche S, Franken P, Hajirezaei MR (2019) Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. Annals of Botany 123(6):929-949. 10.1093/aob/mcy234

Dumas E, Monteuuis O (1995) In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40:231–235

Cézar TM, HigaAR, Koehler HS, Ribas LLF (2015) Influence of culture medium, explant length and genotype on micropropagation of *Pinus taeda*. Ciência Florestal, 25(1):13-22

Coke JE (1996) Basal nutrient medium for in vitro cultures of Loblolly pines. US Patent 5534433

Cuesta C, Ordás RJ, Fernández B, Rodríguez A (2008) Clonal micropropagation of six selected half-sibling families of *Pinus pinea* and somaclonal variation analysis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 95:125-130

Fisher DB (1968) Protein staing of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96

Gaspar T, Kevers C, Hausman JF, Ripetti V (1994) Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: Lumdsen PJ, Nicholas JR, Davies WJ (Eds) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer Acad. Pub, Dordrecht, pp 289– 298

George EF (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd, Edington. England.

George EF, Hall MH, De Klerk GJ (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Berlin, 3ed, v1, 501p

Greenwood MS, Hutchinson KW (1993) Maturation as a developmental process. In: Ahuja MR, Libby WJ (Eds) Clonal Forestry: Genetics, Biotechnology and Application. Springer-Verlag. pp 14-33

Karnovsky, MJA (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use inelectron microscopy. Journal of Cell Biology 27(2):137-138

Lloyd G, Mccown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifólia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society 30:421-427

Mehra-Palta A, Smeltzer RH, Mott RL (1978) Hormonal control of induced organogenesis – Experiments with excised plant parts of loblolly pine. Tappi Journal 61(1):37-40

Monteuuis O (2016) Micropropagation and production of forest trees. In: Park YS, Bonga JM, Moon HK (Eds) Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea pp 32-55

Mott RL & Amerson VH (1981) A tissue culture process for the clonal propagation of loblolly pine plantlets. Technical Bulletin North Carolina Agricultural Research Service 271:3-14

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497

Nunes S, Sousa D, Pereira VT, Correia S, Marum L, Santos C, Dias MC (2018) Efficient protocol for in vitro mass micropropagation of slash pine. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 54(2):175-183. 10.1007/s11627-018-9891-4

Oliveira LF, Ribas LLF, Quoirin M, Koehler HS, Amano E, Higa AR (2012) Micropropagation of *Pinus taeda* L. from juvenile material. Tree and Forestry Science and Biotechnology 6:96-101

Pizarro A, Díaz-Sala C (2019) Cellular dynamics during maturation-related decline of adventitious root formation in forest tree species. Physiologia Plantarum 165: 73-80. doi:10.1111/ppl.12768

Ragonezi C, Klimaszewska K, Castro MR, Lima M, Oliveira P, Zavattieri MA (2010) Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. Trees 24:975-992. 10.1007/s00468-010-0488-8

Rasmussen A, Hosseini SA, Hajirezaei M, Druege U, Geelen D (2015) Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. Journal of Experimental Botany 66(5):1437–1452

Rasmussen A, Smithe TE, Hunt MA (2009) Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in diferente temperature environments. New Forest 38:285-294

Trueman SJ (2006) Clonal propagation and storage of subtropical pines in Queensland, Australia. Southern African Forestry Journal 208:1-4

Wagley LM, Gladfelter HJ, Phillips GC (1987) De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. in vitro II. Macro- and micro-photographic evidence of de novo regeneration. Plant Cell Reports 6:167-171

Wang Y, Yao RL (2017) Plantlet regeneration of adult *Pinus massoniana* Lamb. trees using explants collected in March and thidiazuron in culture medium. Journal of Forestry Research. 10.1007/s11676-017-0412-9

Wang Y, Yao RL (2019) Increased endogenous indole-3-acetic acid : abscisic acid ratio is a reliable marker of *Pinus massoniana* rejuvenation. Biotechnic & Histochemistry 10.1080/10520295.2019.1608468

Wendling I, Trueman SJ, Xavier A (2014) Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. New Forests 45:473–486. 10.1007/s11056-014-9415-y

Zanella LB, Franciscon L, Grunennvaldt RL, Tomasi JC, Degenhardt-Goldbach J (2018) Micropropagation of *Pinus tecunumanii.* Ciência Florestal 28(2):651-660. 10.5902/1980509832058

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nosso estudo mostrou que o uso do Índice Multiplicativo foi eficiente em selecionar matrizes com enraizamento precoce e maior crescimento em altura otimizando a propagação clonal do híbrido por miniestaquia.

O balanço auxina/citocinina e o tipo de explante (segmento apical ou nodal) utilizado no cultivo *in vitro* influencia a formação de brotações axilares e o desenvolvimento de raízes adventícias.

O meio de cultura WV5 suplementado com 0,05 $mg.L^{-1}$ de ANA e 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP promoveu maior formação de brotações axilares tanto em segmentos apicais quanto nodais para a maior parte das matrizes avaliadas. O uso do carvão ativado durante a fase de alongamento foi eficiente para o desenvolvimento de brotações alongadas para algumas matrizes, porém os resultados não foram homogêneos.

O enraizamento adventício ainda representa um dos gargalos para a produção massal de mudas oriundas do cultivo *in vitro*, todavia nossos resultados apontam algumas estratégias para o aumento das taxas de enraizamento e levanta questionamentos sobre o rejuvenescimento *in vitro*.

Dessa forma, conseguimos produzir microestacas com potencial para a produção de mudas, porém, mais estudos devem ser realizados a fim de otimizar os protocolos e adequá-los para cada matriz, visto a elevada genótipo dependência do híbrido às respostas *in vitro*.

Por fim, este é o primeiro trabalho que utiliza miniestacas do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, de modo que obtivemos resultados excelentes para alguns genótipos possibilitando a conservação *in vitro* de germoplasmas de interese.

ANEXO

Anexo A. Composição básica dos meios de cultura MS, WPM e WV5 utilizados para os experimentos de micropropagação de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*.

Reagente	MS[1]	WPM[2]	WV5[3]
Macronutrientes	**mg.L^{-1}**	**mg.L^{-1}**	**mg.L^{-1}**
NH_4NO_3	1650	400	700
KNO_3	1900	-	1084,1
$CaCl_2$	440	72,5	452,9
$Ca(NO_3)_2$	-	386,8	-
$MgSO_4$	370	180,5	903,8
KH_2PO_4	170	170	270
K_2SO_4	-	990	-
KCl	-	-	718,7
Micronutrientes	**mg.L^{-1}**	**mg.L^{-1}**	**mg.L^{-1}**
FeNaEDTA	36,7	36,7	36,7
H_3BO_3	6,2	6,2	31
$MnSO_4.H_2O$	16,9	16,9	15,16
KI	0,83	-	0,83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25	0,25	0,25
$CuSO_4.5H_2O$	0,025	0,25	0,25
$CoCl_2.6H_2O$	0,025	-	0,025
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6	8,6	8,6
Vitaminas	**mg.L^{-1}**	**mg.L^{-1}**	**mg.L^{-1}**
Meso Inositol	100	100	1000
Tiamina	0,1	1,0	0,4
Piridoxina	0,5	1,0	-
Ácido Nicotínico	0,5	1,0	-
Glicina	2,0	1,0	-
Pantotenado de Cálcio	-	1,0	-
Biotina	-	0,01	-

[1] Adaptado segundo Murashige & Skoog (1962). [2] Adaptado segundo Lloyd & Mccown (1980). [3] Coke (1996).