

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Pinus taeda* L. A  
PARTIR DE SEMENTES SELECIONADAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Diego Pascoal Golle**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Pinus taeda* L. A PARTIR DE  
SEMENTES SELECIONADAS**

**por**

**Diego Pascoal Golle**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lia Rejane Silveira Reiniger**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

Golle, Diego Pascoal, 1981-

G626g

Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas / por Diego Pascoal Golle ; orientador Lia Rejane Silveira Reiniger . - Santa Maria, 2007.

96 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2007.

1. Engenharia florestal 2. Cultura de tecidos 3. Vigor de sementes 4. Sanidade de sementes I. Reiniger, Lia Rejane Silveira, orient. II. Título

CDU: 630.232

Ficha catalográfica elaborada por  
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

---

© 2007

Todos os direitos autorais reservados a Diego Pascoal Golle. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Silva Jardim, n. 1892, apto. 303, Centro, Santa Maria, RS, 97.010-492

Fone: (055)8119-8661; End. Eletr: diegolle@yahoo.com.br

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação  
de Mestrado

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Pinus taeda* L. A PARTIR DE  
SEMENTES SELECIONADAS**

elaborada por  
**Diego Pascoal Golle**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia Florestal**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Lia Rejane Silveira Reiniger, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. - UFSM**  
(Presidente/Orientadora)

**Fabio Luiz Fleig Saidelles, Dr. (Fepagro/Florestas)**

**Marlove Fátima Brião Muniz, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. – UFSM**

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2007.

*“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de mais nada, querer”.*

*Amyr Klink*

Aos meus pais Ruy Ernesto Golle e Inês  
Maria Pascoal Golle e a Graciela Sasso  
Fiuza, com amor.

**Dedico...**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e por cada realização de sonhos.

Aos meus pais, Ruy Ernesto Golle e Inês Maria Pascoal Golle, pelo constante incentivo, ajudas, dificuldades e alegrias compartilhadas.

A Graciela Sasso Fiuza pelo amor dedicado, compreensão e companheirismo.

A Universidade Federal de Santa Maria, em especial aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pelos ensinamentos, convivência e oportunidades.

A minha orientadora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela amizade, apoio, dedicação. Foste essencial em minha formação pessoal e profissional, serás sempre um exemplo a ser seguido em minha vida.

A Dra. Marlove Fátima Brião Muniz, pela disponibilidade, amizade e auxílio na realização dos experimentos.

A Andréa Golle Martins e Erecy Segala, pelo incentivo, apoio e participação essencial para esta conquista.

Aos meus sobrinhos André, Gabi e Rafa, por tornarem todos os momentos mais felizes.

Aos colegas de laboratório Aline Paim, Aline Curti, Geórgia, Cássia, Josiana, Joana, Felipe, Daniel, pelo companheirismo, amizade e auxílio nas atividades.

A colega Andressa Vasconcelos Flôres pela amizade, conselhos e conversas.

Ao amigo Tiago Antônio Fick pela amizade, ajudas na compreensão dos delineamentos e estatísticas experimentais.

Ao Laboratório do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, pela disponibilidade para a realização dos experimentos.

A empresa Klabin, em nome do Sr. Glêison Augusto dos Santos, pelo material cedido para pesquisa, indispensável para a realização deste trabalho.

A Capes pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento das pesquisas.

A "Tita", pela amizade e por estar sempre pronta para dar uma ajudinha.

Enfim, a todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para que este momento se concretizasse, meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Pinus taeda* L. A PARTIR DE SEMENTES SELECIONADAS

AUTOR: DIEGO PASCOAL GOLLE

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2007

*Pinus taeda* L. está entre as espécies florestais mais plantadas em todo o Brasil, devido as suas características desejáveis de produção e qualidade industrial. Atualmente, há necessidade de serem desenvolvidas técnicas que possibilitem a produção massal de genótipos melhorados e a cultura de tecidos oferece esta possibilidade. Plantas obtidas *in vitro*, a partir de sementes, possuem duas características importantes: a juvenilidade e a variabilidade existente em lotes de sementes. O objetivo deste trabalho foi avaliar métodos de escolha de lotes de sementes, a partir de suas características de sanidade e vigor; otimizar a germinação e pré-estabelecer esta espécie florestal *in vitro*. Sementes de três lotes obtidas com a empresa Klabin, oriundas de pomares clonais de sementes, denominados Celucat (1ª Geração), Igaras (1ª Geração) e Igaras (2ª Geração) foram submetidas a testes de sanidade através da técnica do papel filtro; e análises de vigor, baseadas no desempenho de plântulas, em que se avaliaram as variáveis: sementes mortas, sementes duras, plântulas anormais, plântulas normais fracas e plântulas normais fortes. Dessa última, foi efetuada a análise do comprimento (cm), peso fresco (g) e peso seco (g). Para a desinfestação foram testados seis tratamentos compostos de três combinações entre tempos de desinfestação e concentração de NaOCl, além da presença ou ausência de luz durante os primeiros dias do experimento. As sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) Testou-se também a germinação das sementes em substratos alternativos como papel filtro, amido e amido combinado com ágar em um primeiro momento e, posteriormente, a germinação em substrato de meio de sais minerais MS, contendo carvão ativado; e meio MS líquido, tendo como solidificante vermiculita. Os substratos papel filtro, algodão hidrófilo e ágar-água foram avaliados quanto ao subsídio hídrico que fornecem para as sementes. Como tratamentos pré-germinativos, foram realizados experimentos com diferentes tempos de embebição e germinação com ou sem desinfestação em algodão hidrófilo. Avaliou-se também o estabelecimento *in vitro* a partir de nós cotiledonares em meio MS, WPM (LLOYD e McCOWN, 1981) e MS reduzido à metade da concentração de sais. Os testes de sanidade foram eficientes na discriminação dos lotes, sendo os fungos mais representativos para esta finalidade pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Da mesma forma, as variáveis de vigor: plântulas anormais, plântulas normais fortes e comprimento, peso seco e peso fresco de plântulas normais fortes, permitiram a estratificação dos lotes. A desinfestação em NaOCl a 3% durante 5 minutos e a 4% durante 3 minutos demonstraram os melhores resultados, porém, NaOCl apresentou toxidez às sementes, inibindo a germinação. Os meios de cultivo com diferentes substratos não apresentaram diferenças significativas para a germinação das sementes. Através da análise da absorção de água em diferentes substratos, foi possível estabelecer as curvas de embebição e comparar substratos quanto ao fornecimento hídrico. A embebição das sementes por 72 horas e posterior inoculação em algodão hidrófilo, sem prévia desinfestação, foi eficiente na germinação. Foi possível estabelecer, *in vitro*, plantas de *Pinus taeda* L., porém, as análises estatísticas não demonstraram diferenças entre os meios testados para tal finalidade.

Palavras-chave: cultura de tecidos; vigor; sanidade de sementes

## ABSTRACT

Master Degree Dissertation  
Post-Graduation Course in Forest Engineering  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### IN VITRO GERMINATION OF *Pinus taeda* L. FROM SELECTED SEEDS

AUTHOR: DIEGO PASCOAL GOLLE

ADVISOR: DRA. LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, February, 26<sup>th</sup>, 2007

*Pinus taeda* L. is among the more planted forest species in Brazil due its desirable characteristics of production and industrial quality. Currently, it has been necessary to be developed techniques that make possible the massal production of improved genotypes and the tissue culture techniques offer this possibility. Gotten plants *in vitro* from seeds possess two important characteristics: the youthfully and the existing variability in lots of seeds. The objective of this work was to evaluate methods of choice of lots of seeds from its characteristics of health and vigor; to optimize the germination and to establish this forest species *in vitro*. Seeds of three lots supplied by the Klabin Company, deriving of clone orchards of called seeds Celucat (1<sup>st</sup> Generation), Igaras (1<sup>st</sup> Generation) and Igaras (2<sup>nd</sup> Generation) were submitted the sanitary tests through the technique "blotter-test"; and analyses of vigor based in the performance of seedling evaluated the variables: hard seeds dead seeds, abnormal seedling, weak normal seedling and heavy normal seedling. Of this last one, it was effected the analysis of the length (cm), fresh weight (g) and dry weight (g). For disinfestations, six treatments had been tested, that were composites of three combinations of disinfestations' times and concentration of NaOCl, beyond presence or absence light during first days of the experiment. The seeds were germinated in MS medium (MURASHIGE e SKOOG, 1962). The germination of the seeds in alternative substrata of paper was also tested like filter paper, starch and starch combined with agar at a first moment and, later, the germination in substratum of medium MS with activated charcoal and liquid medium MS having vermiculite as gelling agent. The substrata filter paper, hydrophilic cotton and agar-water had been evaluated how much to the water subsidy that they supply the seeds. As treatment pre-germinative, it was carried through experiments with different times of soak and germination in hydrophilic cotton. The establishment was also evaluated *in vitro* from node cotyledonar in media MS, WPM (LLOYD e McCOWN, 1981) and reduced MS to the half of the concentration of mineral salts. The health tests had been efficient in the discrimination of the lots, has been more representative the genera *Fusarium*, *Penicillium* and *Trichoderma*. In the same way, variable of the vigor: abnormal seedling, heavy normal seedling and length, dry weight and fresh weight of heavy normal seedling had allowed the stratification of the lots. The disinfestations in 3% NaOCl during 5 minutes and 4% during 3 minutes had demonstrated the best ones performances; however, NaOCl presented toxic to the seeds, inhibiting the germination. The media with different substrata had not presented significant differences for the germination of the seeds. Through the analysis of the water absorption in different substrata it was possible to establish the soak curves and to compare substrata in relation to water suply. The soak for 72 hours of the seeds and posterior inoculation in hydrophilic cotton was efficient in the germination of seeds. It was possible to *in vitro* establish plants of *Pinus taeda* L. but the analyses statistics had not demonstrate differences among the media tested for such purpose.

Keywords: tissue culture; physiological quality, seed sanity

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Composição dos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981)..... 52
- TABELA 2 – Porcentagem de gêneros fúngicos ocorrentes nos lotes de sementes de *Pinus taeda* L. Celucat de 1ª Geração (Celucat-1ªG), Igaradas de 1ª Geração (Igaras-1ªG) e Igaras de 2ª Geração (Igaras-2ªG). Santa Maria-RS, UFSM, 2007 ..... 57
- TABELA 3 – Análise do vigor de três lotes de sementes de *Pinus taeda* L. através do desempenho de plântulas. Variáveis em porcentagem: germinação aos 7 dias (G7). Aos 28 dias: sementes mortas (SM), sementes duras (SD), plântulas anormais (PA), plântulas normais fracas (PN fracas) e plântulas normais fortes (PN fortes). Referente a plântulas normais fortes: comprimento (cm), peso fresco (g) e peso seco (g). Santa Maria, ..... 60
- TABELA 4 – Percentual de germinação, contaminação fúngica e bacteriana de sementes de *Pinus taeda* L. nos meios alternativos para o cultivo *in vitro*: Papel Filtro, Água+Amido de Milho (AM) e Água+Ágar+Amido de Milho (AG+AM). Santa Maria, UFSM, 2007 ..... 65
- TABELA 5 – Análise da Variância para os tratamentos MS+Vermiculita e MS+Carvão ativado referentes à variável germinação onde se observa: causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F). Santa Maria, UFSM, 2007 ..... 66
- TABELA 6 – Análise da Variância para os tratamentos MS+Vermiculita e MS+Carvão ativado referentes à variável contaminação bacteriana onde se observa: causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma dos

quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F). Santa Maria, UFSM, 2006  
..... 67

TABELA 7 – Quantidade percentual do aumento na massa de sementes de  
*Pinus taeda* L. pela absorção de água nos tempos 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas,  
nos substratos: papel filtro (PF), algodão hidrófilo (AH) e meio ágar-água (AA).  
Santa Maria-RS, UFSM, 2007 ..... 69

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Percentagem de germinação das sementes nos tratamentos T1 (NaOCl 2% por 10 min), T3 (NaOCl 3% por 5 min) e T5 (NaOCl 4% por 3 min), tendo estes permanecido durante o experimento em fotoperíodo de 16 h. T2 (NaOCl 2% por 10 min), T5 (NaOCl 3% por 5 min) e T6 (NaOCl 4% por 3 min), permaneceram 7 dias em ausência de luz e, após, nas mesmas condições de luminosidade que os demais. Santa Maria-RS, UFSM, 2007 ..... 61
- FIGURA 2 – Percentual de contaminação fúngica nos três níveis do fator A, diferentes tempos de desinfestação e concentração de Hipoclorito de Sódio (NaOCl). Santa Maria, UFSM, 2007 ..... 63
- FIGURA 3 – Porcentagens de Germinação (1) e Contaminação Bacteriana (2) em Meio MS líquido tendo como suporte vermiculita (MS+V) e meio MS solidificado com ágar acrescido de carvão ativado (MS+C). Santa Maria, UFSM, 2007 ..... 68
- FIGURA 4 – Percentagens de aumento na massa das sementes de *Pinus taeda* L. devido à absorção de água nos substratos: papel filtro (PF), algodão hidrófilo (AH) e ágar-água (AA). Estes estão amostrados nos diferentes tempos de observação do experimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2007..... 71
- FIGURA 5 – Efeito dos tratamentos papel filtro (PF), algodão hidrófilo (AH) e ágar-água (AA) sobre a germinação de sementes de *Pinus taeda* L. após 21 dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 ..... 71
- FIGURA 6 – Efeito dos diferentes substratos sobre a contaminação fúngica de sementes de *Pinus taeda* L. após 21 dias de inoculação em diferentes

substratos. PF – papel filtro; AH – algodão hidrófilo, AA – ágar-água. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 .....	72
FIGURA 7 - Efeito dos diferentes tempos de embebição na contaminação fúngica de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. que haviam passado por desinfestação prévia. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 .....	73
FIGURA 8 – Efeito dos diferentes tempos na embebição das sementes de <i>Pinus taeda</i> L. sobre a germinação aos 7 dias. Sementes não desinfestadas. Santa Maria-RS, UFSM, 2007 .....	74
FIGURA 9 – Efeito dos diferentes tempos de embebição das sementes de <i>Pinus taeda</i> L. em relação à emissão de cotilédones (plântulas maiores de 3 cm) aos 7 dias. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 .....	74
FIGURA 10 – Efeito dos diferentes tempos de embebição das sementes de <i>Pinus taeda</i> L. em relação à emissão de cotilédones (plântulas maiores de 3 cm) aos 14 dias de cultivo. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 .....	75
FIGURA 11 – Efeito dos diferentes tempos de embebição sobre a emissão de cotilédones, considerando plântulas maiores que 3 centímetros, de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 .....	76
FIGURA 12 – Efeito dos diferentes tempos de embebição sobre a contaminação fúngica de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.....	76
FIGURA 13 – Efeito dos diferentes tempos de embebição quanto a ocorrência de injúrias nas plântulas de <i>P. taeda</i> L. Santa Maria-RS, UFSM, 2007 .....	77
FIGURA 14 – Absorção de água em relação à massa das sementes de <i>Pinus taeda</i> L. durante os tempos de embebição 0, 24, 48 e 72 horas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 .....	77

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Principais gêneros fúngicos nos lotes Celucat-1<sup>a</sup>G, Igaras-1<sup>a</sup>G e Igaras-2<sup>a</sup>G de sementes de *Pinus taeda* L. sendo: *Aspergillus* (a), *Cercospora* (b), *Cladosporium* (c), *Curvularia* (d), *Fusarium* (e), *Penicillium* (f), *Pestalotia* (g), *Rhizoctonia* (h) e *Trichoderma* (i). Santa Maria-RS, UFSM, 2007 ..... 92

ANEXO B – Aspecto geral dos meios de cultura onde houve substituição do ágar como agente solidificante por amido de milho e amido de milho combinado com ágar. Santa Maria-RS, UFSM, 2007 ..... 92

ANEXO C – Aspecto dos meios de cultura: a – MS líquido+Vermiculita; b- MS solidificado com ágar acrescido de carvão ativado. Santa Maria, RS, UFSM, 2007 ..... 93

ANEXO D – Aspecto dos nós cotiledonares utilizados como fonte de explantes para a cultura de tecidos de *Pinus taeda* L. Santa Maria-RS, UFSM, 2006 ... 93

ANEXO E – Aspecto geral de plantas de *Pinus taeda* L. obtido a partir de nós cotiledonares como fontes de explantes após 35 dias de inoculação em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Santa Maria, RS, UFSM, 2007 ..... 93

ANEXO F – Aspecto geral de plantas de *Pinus taeda* L. obtidas a partir de nós cotiledonares como fontes de explantes após 65 dias de inoculação em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Santa Maria, RS, UFSM, 2007 ..... 94

ANEXO G – Formação de calo na base do caule de plantas de *Pinus taeda* L. obtidas a partir de nós cotiledonares como fontes de explantes após 65 dias de inoculação em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Santa Maria, RS, UFSM, 2007 ..... 94

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	20
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	20
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
<b>3.1 O gênero <i>Pinus</i> spp. (Pinaceae)</b> .....	22
<b>3.2 Cultura de tecidos vegetais <i>in vitro</i></b> .....	25
3.2.1 Obtenção de material asséptico e micropropagação .....	29
3.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de espécies lenhosas .....	30
<b>3.3 Germinação e vigor de sementes</b> .....	33
3.3.1 Tratamentos pré-germinativos e utilização de substratos diferenciados .....	35
<b>3.4 Qualidade fitossanitária de sementes</b> .....	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
<b>4.1 Local de realização dos experimentos e obtenção de sementes</b> .	40
<b>4.2 Experimento I – análise fitossanitária para a discriminação dos     lotes de sementes de <i>Pinus taeda</i> L.</b> .....	41
<b>4.3 Experimento II – vigor de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. baseado     no desempenho de plântulas</b> .....	42
<b>4.4 Experimento III – desinfestação e germinação asséptica das     sementes</b> .....	44
<b>4.5 Substratos alternativos para a germinação de <i>Pinus taeda</i> L.</b> .....	46
4.5.1 Experimento IV – papel filtro, amido-água, ágar-amido-água .....	46
4.5.2 Experimento V – meio MS+vermiculina e meio MS+carvão ativado	47
<b>4.6 Experimento VI – subsídio hídrico fornecido por diferentes</b>	

<b>substratos para a germinação de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. ...</b>	48
<b>4.7 Experimento VII – tratamentos pré-germinativos .....</b>	49
4.7.1 Experimento VII – diferentes tempos de embebição das sementes com desinfestação superficial .....	49
4.7.2 Experimento VIII – diferentes tempos de embebição das sementes sem desinfestação superficial .....	50
<b>4.8 Experimento IX – seleção de meios para o estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Pinus taeda</i> L. a partir de nós cotiledonares .....</b>	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	54
<b>5.1 Seleção de lote de sementes através da análise de vigor e fitossanidade – Experimentos I e II .....</b>	54
<b>5.2 Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. – Experimento III .....</b>	61
<b>5.3 Utilização de meios alternativos para a germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. – Experimentos IV e V .....</b>	64
<b>5.4 Efeito de diferentes substratos no suprimento hídrico de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. – Experimento VI .....</b>	68
<b>5.5 Diferentes tempos de embebição como tratamentos pré-germinativos de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. – Experimentos VII e VIII .....</b>	72
<b>5.6 Pré-estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Pinus taeda</i> L. – Experimento IX .....</b>	78
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	80
<b>CONCLUSÕES .....</b>	82
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	84
<b>ANEXOS .....</b>	91

# 1 INTRODUÇÃO

*Pinus taeda* L. possui grande destaque entre as espécies florestais mais cultivadas no Brasil para florestamento, reflorestamento e demais atividades ligadas ao setor madeireiro, tais como, serraria, laminação, celulose de fibra longa e resina. Em algumas regiões do Sul do Brasil, os plantios de *P. taeda* permanecem como um importante recurso financeiro.

Povoamentos florestais produtivos são condição *sine qua non* no desenvolvimento de sistemas silviculturais rentáveis. Este processo necessita da utilização de mudas com qualidades superiores. A produção em viveiros de mudas florestais, com caracteres desejados, depende de sementes geneticamente melhoradas, as quais devem possuir alto poder germinativo, possibilitando a formação de florestas saudáveis, com crescimento rápido e alta qualidade.

Além disso, a base dos plantios comerciais de *Pinus*, realizada com sementes, resulta, muitas vezes, em povoamentos totalmente desuniformes, apresentando genótipos com características indesejáveis. Na atualidade, há uma crescente demanda por produtos madeireiros, porém, existe um déficit equivalente ao plantio anual de cerca de 300 mil hectares de espécies florestais de crescimento rápido, de acordo com Campanhola (2005). Este fato reafirma a necessidade de serem estabelecidas metodologias para a propagação clonal de espécies que permitam a implantação de florestas melhoradas. Para tal finalidade, faz-se necessário pesquisas em melhoramento e técnicas de propagação massal, que possibilitem a obtenção de variedades clones com caracteres de interesse industrial.

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* baseia-se em um conjunto de técnicas que permitem a propagação vegetativa de genótipos elite, mantendo as características de interesse que estes possuem. Mesmo quando obtidos a partir de sementes, as plantas serão multiplicadas, resultando em populações com um número maior de clones, conseqüentemente, os povoamentos gerados a partir destas plantas serão mais homogêneos. Além disso, clones produzidos a partir de plântulas oriundas de sementes apresentam duas características desejáveis: a variabilidade existente em um lote de sementes (o que permite melhoramento e seleção) e a juvenilidade dos tecidos que darão origem ao cultivo *in vitro*. Estas técnicas também são requisitos indispensáveis para estudos mais avançados, tais como transformação genética.

A micropropagação é o método mais indicado para produção massal de genótipos superiores em cultura de tecidos. O nome desta técnica deve-se ao tamanho dos propágulos originados. Possui as vantagens de produzir em escala aumentada uma série de clones com características bem conhecidas, dispondo de um espaço menor e otimizando a escala produtiva. Porém, espécies lenhosas apresentam certas dificuldades no estabelecimento *in vitro*, como enraizamento, oxidação fenólica, germinação e contaminação. Estes obstáculos podem ser contornados com adequações nos procedimentos utilizados.

Para iniciar um processo de cultura de tecidos com vistas à produtividade efetiva, é muito importante que se pré-estabeleça um critério de seleção de fontes de explantes e um protocolo de desinfestação dos órgãos que servirão para tal finalidade. De maneira geral, sementes são boas fontes, não apenas pelos atributos já citados, mas pelas facilidades que oferecem nos procedimentos de rotina laboratorial. No entanto, freqüentemente, o excesso de contaminações ocorrentes prejudica ou, até mesmo, inviabiliza os procedimentos de cultura de tecidos.

Conhecendo os patógenos ocorrentes é possível, caso necessário, utilizar medidas de controle. Da mesma forma, sementes com baixa germinação, costumam originar resultados pouco positivos. Junto a isto, soma-se o pouco conhecimento existente sobre o de vigor e a sanidade em sementes florestais, fato que se comprova ao observar-se as poucas espécies

florestais relatadas nas Regras para Análise de Sementes do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1992), manual que serve, geralmente, como recurso inicial de informação em estudos e trabalhos técnicos com sementes. O mesmo ocorre quanto às informações que existem referentes à patologia de sementes florestais, que ainda são muito escassas. A utilização de testes de vigor e análise sanitária de sementes podem ser uma alternativa viável e de confiabilidade como método de escolha de lotes de sementes, em especial, para cultivo *in vitro*. Contudo, até o momento, não há conhecimento de nenhum trabalho realizado nesse sentido.

Ao mesmo tempo, conhecer as características de vigor, germinação, tratamentos pré-germinativos, adequação de substratos e sanidade de sementes de espécies florestais não são apenas informações relevantes para a cultura de tecidos, mas uma forma de colaborar com os conhecimentos científicos desta área que, quando comparada aos existentes para uso em semente de cultivares agrícolas, é muito rudimentar.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um protocolo de seleção de lotes de sementes de *Pinus taeda* L., que servirão como fonte de explantes para cultura de tecidos, através de testes de sanidade e vigor; otimizando sua germinação e viabilizando o seu pré-estabelecimento *in vitro*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver métodos de seleção de fontes de explantes para o cultivo *in vitro*, a partir do conhecimento da qualidade fisiológica e sanitária de sementes.
- Avaliar a eficiência destes métodos.
- Identificar os principais gêneros de patógenos fúngicos ocorrentes em sementes armazenadas de *P. taeda* L.
- Desenvolver metodologias de desinfestação e germinação asséptica de sementes de *P. taeda* L.
- Viabilizar a germinação *in vitro* das sementes de *P. taeda* L., testando novos substratos e a relação destes com a germinação e o suprimento hídrico das sementes.

- Conhecer o efeito de tratamentos pré-germinativos de embebição sobre a germinação e a velocidade de desenvolvimento das plântulas.
- Determinar a viabilidade do estabelecimento das plantas de *Pinus taeda* L. *in vitro*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O gênero *Pinus* spp. (Pinaceae)

*Pinus* spp. é um gênero relativamente antigo, sendo este nome correspondente, em latim, ao termo pinheiro. Dentre as gimnospermas, este é um dos gêneros mais numerosos, reunindo cerca de 90 espécies. Pertencente à família Pinaceae, detentora de um grande número de gêneros que possuem qualidade madeireira, a identificação das espécies de *Pinus* está ligada, principalmente, aos caracteres de suas folhas aciculares, cones e sementes (MARCHIORI, 1996).

Há mais de um século, diversas espécies de *Pinus* vêm sendo introduzidas no Brasil, para uma infinidade de usos. Primeiramente, muitas delas foram trazidas por imigrantes europeus, apenas para fins ornamentais e para produção de madeira. As primeiras introduções que possuem registros são de *Pinus canariensis*, o qual é proveniente das Ilhas Canárias. Essa espécie foi trazida ao Rio Grande do Sul em 1880 (SHIMIZU, 2004).

Inicialmente, o gênero não apresentou boa adaptação ao clima do Brasil. Por volta de 1936, iniciaram-se os primeiros ensaios de técnicas silviculturais, sendo que, em 1948, foram introduzidas espécies americanas conhecidas como “pinheiros amarelos”, das quais se destacam *Pinus palustris*, *P. echinata*, *P. elliottii* e *P. taeda*. Essas duas últimas espécies citadas foram as que apresentaram maior destaque pelas facilidades em seus tratamentos culturais e rápido crescimento (SHIMIZU, 2004).

*Pinus taeda* L. é popularmente conhecido com pinheiro-amarelo, pinheiro-rabo-de-raposa, pinheiro-do-banhado, pinos e pinho-americano. Possui as sinônimas botânicas *Pinus lutea* (Walter) e *Pinus heterophylla*

(Small) (LORENZZI et al., 2003). Muito semelhante ao *P. elliottii*, difere por apresentar três folhas por braquiblasto de 15 a 20 centímetros de comprimento, rígidas ao toque, verde-escuras. Seus cones femininos são sésseis, acinzentados e simétricos. Já *P. elliotti* apresenta duas a três folhas por braquiblasto de 12 a 30 centímetros de comprimento, flexíveis ao toque, verde-claras; cones femininos pedunculados, castanho-avermelhados e assimétricos. Estas informações botânicas são de fundamental importância na coleta de sementes (BACKES e IRGANG, 2004). Prefere altitudes acima de 450 metros em relação ao nível do mar, pois se assemelham a seu local de origem (MIROV, 1967).

A árvore apresenta de 25-30 metros de altura, tronco com casca marrom-avermelhada, fendida, com cristas escamosas. Costuma ser propagado por sementes, devido à grande abundância de produção destas em nossas condições. Sua madeira, com alburno amarelo, é utilizada na construção de barcos, postes, dormentes, construção civil, serraria, laminação, entre outras utilidades. No Sul do Brasil é cultivada nas regiões mais altas do Planalto Catarinense e Serra Gaúcha, apresentando ótimo potencial ornamental e industrial (LORENZI et al., 2003). Suas fibras são longas, assim, esta espécie também é adequada para a fabricação de papel. Outro atributo é a produção de resina, utilizada em diversos ramos produtivos (MARCHIORI, 1996). Seu plantio requer uma série de cuidados do ponto de vista ecológico, pois a espécie é agressiva aos ecossistemas, considerando que suas sementes são levadas pelo vento e germinam livremente sobre campos, lavouras e beira de estradas. Um benefício ambiental observado em relação a *P. taeda* é o fato de permitir a regeneração de *Araucaria angustifolia* em seu meio. Nas regiões altas do planalto, no Sul do Brasil, os plantios de *P. taeda* permanecem como um dos poucos recursos financeiros viáveis à população (BACKES e IRGANG, 2004).

A maior expansão no plantio do gênero *Pinus* no Brasil ocorreu na década de 60, em função dos incentivos fiscais para reflorestamento, florestamento e das normas de reposição florestal obrigatória. Durante o período de 1967 e 1982, aproximadamente um milhão de hectares foi florestado com o gênero em questão (AHRENS, 1985).

No Sul do Brasil, *Pinus taeda* é considerado uma das espécies mais plantadas, totalizando 1,5 milhões de hectares. Já em todo o Brasil, atinge a marca de dois milhões de hectares. As condições que levam a sua escolha estão relacionadas ao seu rápido crescimento, o que permite à espécie alcançar grandes incrementos anuais em altura (SELLE et al., 1994).

Nos primeiros plantios de *Pinus*, o fuste da espécie apresentava-se tortuoso, com baixa qualidade, grande números de bifurcações e ramos grosseiros. Atualmente, o uso de sementes geneticamente melhoradas aumentou a produtividade da madeira através da qualidade do fuste e de outras características físicas (SHIMIZU, 2004).

Hoje, as sementes coletadas passam por um rigoroso controle de qualidade, que se inicia na escolha das árvores matrizes. Tanto para uso próprio quanto para comercialização, é importante que este seja mantido, com cuidados muito especiais durante o armazenamento. Testes de germinação são utilizados para determinar o nível das sementes coletadas, assim como o número destas por quilograma, segundo relata Ferrari (2004). O mesmo autor afirma sobre a necessidade de periodicamente serem realizados testes de fitossanidade, para conferir a presença ou ausência de ataque de insetos e fungos.

Tuoto (2003) relata a crise existente na demanda de madeira no Brasil, a qual tende a agravar-se. Watai (1990) relatou sobre a importância de serem desenvolvidas pesquisas tecnológicas visando à utilização das madeiras de reflorestamento com mais intensidade em relação às nativas. Nesse sentido, *Pinus* é bem consagrado no mercado, principalmente no setor de manufaturados. As maiores unidades produtoras de madeira serrada do país, cerca de 40%, encontram-se no Sul e Sudeste. Estas utilizam madeira oriunda do gênero em questão, porém, o baixo grau tecnológico e mão-de-obra pouco qualificada tornam a atividade pouco competitiva (ABIMCI, 2001). Esta afirmação remete-se também a necessidade de desenvolvimento de tecnologias ligadas ao setor florestal e produção de clones melhorados para disponibilização no mercado (IPEF, 2002).

### 3.2 Cultura de tecidos vegetais *in vitro*

Usar a biotecnologia vegetal para o ganho de produtividade e sustentabilidade é uma das grandes prioridades mundiais. O aumento populacional e a excessiva demanda por produtos oriundos das espécies vegetais corroboram com esta afirmativa. Além disso, o subsídio da sustentabilidade e proteção ambiental também necessita de tecnologias para sua manutenção (WATANABE e RAMAN, 1997).

A cultura de tecidos vegetais é um processo biotecnológico, através do qual, fragmentos de tecidos vegetais vivos, denominados de “explantes”, são retirados das plantas de interesse e cultivados em um meio nutritivo definido. Este procedimento se dá sob condições assépticas. Os fragmentos podem ser reduzidos ao tamanho de células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI et al., 2001).

Estas técnicas baseiam-se na teoria da totipotência celular, a qual se caracteriza como a capacidade que a célula vegetal viva, com sistema laminar intacto, nucleada e já diferenciada, possui de ser induzida a voltar ao seu estado meristemático, podendo redefinir seu padrão de diferenciação celular, desenvolvendo novos tecidos, órgãos e, até mesmo, organismos inteiros (TERMIGNONI, 2005).

Segundo Taiz e Zeiger (2004), as plantas são organismos autotróficos que, para poderem crescer e se desenvolver, necessitam de energia proveniente da luz solar, para assim sintetizar seus componentes orgânicos, água e elementos minerais presentes na solução do solo. Torres et al. (2001) afirmam que estas mesmas exigências são requeridas pelas plantas para o cultivo *in vitro*, as quais, de acordo com Caldas et al. (1998), funcionam através de suas mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas, sendo que alguns processos, como a fotossíntese, podem ser inativados pelas condições em que o cultivo é submetido ou pelo estado de diferenciação das células.

O cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais em laboratório, sob condições assépticas, é um importante ganho para a pesquisa básica e

aplicada. Vários estudos ligados à citologia, nutrição, metabolismos primário e secundário, morfogênese, fitopatologia, cultura de embriões, citogenética e biologia molecular, tendo como base de desenvolvimento o cultivo *in vitro*, vêm sendo relatados ao longo do tempo (THORPE, 1990).

Os meios de cultura utilizados para as plantas são determinados de acordo com as necessidades exigidas por estas, assim como pelos órgãos e resultados morfogenéticos que se deseja obter. Basicamente, estes apresentam em sua composição macronutrientes, micronutrientes, suplementos de ferro, vitaminas, água, recursos para obtenção de carboidratos pelas plantas, myo-inositol e, quando necessário, reguladores de crescimento (DODDS e ROBERTS, 1995).

A água é o principal componente do meio de cultura. Porém, pode ser uma fonte potencial impurezas, afetando o crescimento dos tecidos. Assim, o ideal é utilizar água destilada e, se possível, deionizada. Muitas vezes, substitui-se esses dois processos pela bi-destilação (CALDAS et al., 1998). O movimento de moléculas entre e dentro das células, além do próprio fornecimento de elementos para as plantas a partir do meio, necessita da água como veículo (TORRES et al., 2001).

Os macronutrientes são os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o crescimento das plantas. Nos meios de cultura, estes são incluídos na forma de sais inorgânicos, podendo o nitrogênio e o enxofre, serem adicionados como componentes orgânicos (CALDAS et al., 1998). São considerados macronutrientes o nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre (DODDS e ROBERTS, 1995).

Micronutrientes recebem esta denominação por serem exigidos em menores quantidades quando comparados aos demais compostos que os vegetais utilizam. São essenciais para todas as plantas. Estes são manganês, zinco, boro, cobre, cloro e molibdênio (DODDS e ROBERTS, 1995). Alguns outros elementos como o sódio, podem participar da composição de meios nutritivos, em concentrações muito variáveis, ou como íon acompanhante de algum elemento essencial (CALDAS et al., 1998).

O ferro é considerado um intermediário entre macroelementos e microelementos, pois ocorre em menor quantidade em relação aos primeiros citados e, em quantidades superiores aos segundos. Atualmente, é utilizado na forma de quelato de ferro com EDTA, o que facilita a absorção pelas células deste elemento (CALDAS et al., 1998).

Já os carboidratos, são essenciais para o desenvolvimento de todos os seres vivos, em especial nas plantas *in vitro*, onde muitas vezes o processo de fotossíntese pode não ocorrer de maneira eficiente. Assim, costuma-se empregar a sacarose como fonte energética para as plantas cultivadas neste sistema (CALDAS et al., 1998).

As vitaminas possuem importantes funções catalisadoras em sistemas enzimáticos (DODDS e ROBERTS, 1995). As substâncias mais utilizadas são tiamina, ácido nicotínico e piridoxina (CALDAS et al., 1998).

O inositol possui efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (TORRES et al., 2001); podendo ser acrescido ou não aos meios de cultura (CALDAS et al., 1998). Por fim, ágar e outros componentes também são citados por Caldas et al. (1998) como necessários para demais requerimentos das plantas e sustentação das mesmas no meio. Carvão ativado, em alguns casos, pode ser utilizado. Sua função é eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo explante *in vitro*. Reduz também a oxidação fenólica (TORRES, 2001).

Outro grupo de componentes de suma importância, utilizados no cultivo *in vitro*, são os reguladores de crescimento. Auxinas e citocininas são as classes de reguladores mais utilizadas. A formação de raiz, parte aérea e calo são regulados pela disponibilidade e interação destas duas classes de fitoreguladores (CALDAS et al., 1998). A diferença entre fitoreguladores e hormônios é relatada por Termignoni (2005), que define como fitohormônios os compostos sintetizados em pequeníssimas quantidades, na ordem de nanogramas, em um determinado tecido na planta, indo atuar nas células-alvo, onde será exercida sua atividade biológica, causando uma resposta fisiológica que vai alterar os padrões de desenvolvimento da planta. Exemplos destes fitohormônios são o ácido indolil-3-acético (AIA), ácido giberélico (GA3) e zeatina. Já os reguladores de crescimento são análogos sintéticos dos

fitohormônios, sintetizados em laboratório, tais como o ácido naftalenoacético (ANA), benziladenina (BA) e 6-benzilaminopurina (BAP). Estes se dividem em grupos denominados auxinas, citocininas e giberelinas, além do ácido abscísico e etileno (RAVEN et al., 2001). As auxinas possuem envolvimento na regulação de vários processos fisiológicos como dominância apical, formação de raízes laterais e adventícias, entre outros. Citocininas têm papel essencial *in vitro*, formando brotações, quebra da dominância apical, expansão foliar, proliferação, morfogênese entre outros. Giberelinas regulam a transição do estágio juvenil para o adulto, influenciando a iniciação floral e germinação das sementes. Já o ácido abscísico e o etileno não possuem funções bem definidas *in vitro*, sendo pouco utilizados (TORRES et al., 2001; RAVEN et al., 2001; DODDS e ROBERTS, 1995).

As células tornam-se responsivas ou receptivas à atividade fitohormonal, pela presença de proteínas específicas, capazes de se ligarem aos fitorreguladores no momento em que existir a demanda fisiológica criada pela planta, em função dos estímulos. Esse processo recebe o nome de sensibilidade diferencial (TERMIGNONI, 2005). Da mesma forma, para que os resultados sejam eficazes, as células devem possuir competência e determinação celular. Determinação é a terminologia que tem sido empregada para designar a canalização progressiva que é observada durante a ontogênese das células em direção às vias particulares de desenvolvimento. Já o termo competência, é utilizado para designar a capacidade bem definida que determinados órgãos vegetais possuem para originar determinadas respostas morfogênicas (KERBAUY, 1998).

Outro fator importante a salientar é a genótipo-especificidade, característica que fica muito marcante nos vegetais quando cultivados *in vitro*. Em geral, está ligada ao genoma de cada planta e aos polimorfismos de DNA. Assim, os diferentes genótipos de uma mesma espécie podem apresentar respostas diferentes durante o cultivo e, por isso, muitas vezes é necessário adequar os procedimentos aos genótipos que estão sendo utilizados (HANDLEY et al., 1995). Do mesmo modo, o controle da morfogênese está ligado a fatores genotípicos para que ocorra de forma efetiva. Também é dependente da competência, determinação celular, ambiente físico

(luminosidade, temperatura, condições físicas do meio) e químico (nutrientes, fitorreguladores, aditivos orgânicos e inorgânicos dos meios de cultura) a que os vegetais estão submetidos (AMMIRATO, 1986).

### 3.2.1 Obtenção de material asséptico e micropropagação

Para o sucesso da cultura de tecidos, é indispensável a desinfestação do material que irá servir como fonte de explantes para cultura de tecidos. Dentre estas fontes, sementes costumam ser utilizadas para germinação asséptica e, posteriormente, suas plântulas servirão para obtenção de explantes. Os procedimentos de desinfestação normalmente utilizam-se de álcool a 70%, água destilada, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e bicloreto de mercúrio. Após, as sementes costumam ser germinadas em papel filtro, meio de cultura ou algodão (GAMBORG e PHILLIPS, 1995).

Para Grattapaglia e Machado (1998), o segredo da micropropagação não está diretamente ligado aos meios de cultura utilizados, mas sim, a todo o processo, que se inicia na escolha da planta que servirá como matriz. Nesse caso, tanto na utilização de sementes, gemas, ápices, ou quaisquer outras fontes de explantes, são necessários cuidados que antecedem os procedimentos, tanto no tocante à contaminação como na escolha de materiais que possam originar melhores respostas morfogênicas. Nessa etapa, um dos principais cuidados reside em obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte, quando isolado.

A micropropagação recebe este nome devido ao tamanho dos propágulos utilizados. É considerada a técnica de aplicação mais prática e de maior impacto dentre os procedimentos usuais de cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Em 1991, a produção mundial de vegetais micropropagados foi estimada em 600 milhões de plantas. Dentre as mais cultivadas destacam-se flores de corte, árvores frutíferas, *Solanum tuberosum*, *Fragaria* spp., *Fícus*, *Stathiphyllum*, *Syngonium* e Gérbera (WERBROUCK e DEBERGH, 1994).

De maneira geral, a micropropagação faz uso das citocininas que induzirão a multiplicação dos explantes, formando agrupamentos (“clusters”), dos quais os brotos poderão ser excisados para posterior crescimento e desenvolvimento ou, até mesmo, otimização do processo de propagação. Grattapaglia e Machado (1998) dividem o sistema de micropropagação em diferentes estágios sendo:

- Estágio I – seleção das fontes de explantes e explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo sob condições assépticas;
- Estágio II – multiplicação durante sucessivas subculturas dos propágulos em meio próprio para multiplicação;
- Estágio III – transferência para meio de enraizamento das partes aéreas produzidas e subsequente aclimatização para substrato ou solo.

Segundo os mesmos autores, estes estágios não necessitam ser seguidos nesta ordem. Além disso, cita-se em alguns casos o estágio 0, onde são dados tratamentos especiais à planta que servirá para o fornecimento dos explantes. Werbrouck e Debergh (1994) definem o estágio III como alongamento dos brotos, indução ao enraizamento e enraizamento para, posteriormente, aclimatização, a qual fica definida como estágio IV.

### 3.2.2 Cultivo *in vitro* de espécies lenhosas

A propagação vegetativa é um método importante na multiplicação de plantas lenhosas. Este oferece vantagens quando comparado à reprodução sexuada, de tal modo que, para árvores selecionadas, é costumeiramente, o mais indicado. Na reprodução sexuada, consegue-se capturar apenas o componente genético aditivo de superioridade. Já na propagação vegetativa, captura-se o componente genético total, e conseqüentemente, existem maiores ganhos dentro de uma mesma geração. Além do mais, a segregação e recombinação gênica, ocorrentes na reprodução sexuada, resultam em um alto grau de variabilidade. Por via vegetativa, redundam em uniformidades de

crescimentos e demais características de interesse (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

A cultura de tecidos oferece potencial para rápida multiplicação de linhagens elite em larga escala. Para espécies lenhosas, esta tecnologia é essencial devido aos longos períodos necessários para maturação e multiplicação por meios convencionais. Na Índia, existem vários estudos com os gêneros *Butea*, *Pinus*, *Accacia*, *Betula* e com as espécies *Shorea robusta* e *Tectona grandis* (JAIN, 1997).

Paranhothy (1990) relata que as gimnospermas estão entre as primeiras espécies que foram cultivadas *in vitro*. Este mesmo autor cita que Gautheret (1934) cultivou tecidos cambiais de *Pinus pinaster* e *Abies alba* e que La Rue (1936) cultivou embriões de várias espécies de Gimnospermas, resultando em mudas de aparência normal. As gimnospermas possuem grande valor no setor madeireiro, mas seu longo espaçamento para plantio e polinização aberta faz com que reflorestamentos, baseados em programas de produção clonal, sejam desejáveis.

Geralmente, em uma determinada etapa do melhoramento na produção de plantas superiores, costuma-se utilizar as técnicas de cultura de tecidos. Estas, muitas vezes são indispensáveis, oferecendo soluções únicas. Suas principais aplicações estão relacionadas à conservação de germoplasma asséptico, multiplicação de genótipos superiores, cultura de embriões, intercâmbio de germoplasma, germinação de sementes, aceleração de programas de melhoramento, estabilidade genética ou aumento da variabilidade (FERREIRA et al., 1998). Embora estudos desse tipo em espécies lenhosas, em especial gimnospermas, tenham sido precoces, acabaram sendo atrasados pelo avanço nas pesquisas com angiospermas (PARANJOTHY, 1990).

Teixeira (2004) refere-se às espécies lenhosas de interesse agrícola como sendo, basicamente, as frutícolas, mas florestais como *Eucalyptus* e *Pinus* também recebem destaque. Quanto ao gênero *Pinus*, diversos trabalhos têm utilizado a cultura de tecidos no intuito de multiplicar suas espécies como: *P. patula* (Mckellar et al., 1994); *P. elliottii* (BURNS et al., 1991); *P. heldreichii*

(STOJIEIĆ et al., 1999) e *P. taeda* (PULLMAN et al., 2003; LI e HUANG, 1996), sendo estes, em sua maioria, ligados à embriogênese.

Em espécies florestais, são comuns relatos de dificuldades encontradas na cultura de tecidos, como oxidações fenólicas, as quais podem variar conforme o explante, intensidade luminosa e outros fatores (TEIXEIRA, 2004). Estas oxidações ocorrem em função da liberação de compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina, pelos tecidos injuriados ou senescentes de essências florestais (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). Para solucionar estes problemas, além de facilitar o desenvolvimento destas espécies são utilizados vários cuidados. Entre eles, a seleção de meios de cultivo. Além do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), o qual é amplamente usado em cultura de tecidos, mesmo tendo sido desenvolvido inicialmente para tabaco, faz-se escolha por diversos outros mais adaptados para plantas lenhosas, dentre os quais se destaca o *Woody Plant Medium* (WPM), elaborado por Lloyd e McCown (1981), ou modificações do próprio MS (CALDAS et al., 1998). A principal diferença do meio MS para os demais é sua alta concentração de sais, sendo muitas vezes utilizado em diluições (MANTOVANI e FRANCO, 1998).

De acordo com Doods e Roberts (1995), a utilização de compostos auxiliares no cultivo de espécies que apresentem oxidações fenólicas e problemas de desenvolvimento pode gerar bons resultados. Estes compostos são antioxidantes, como o ácido cítrico. Além disso, cuidados com a luminosidade e menores intervalos entre os subcultivos em muitos casos solucionam problemas de oxidações. Sharma e Ramamurty (2000), em pesquisas com *Eucalyptus tereticornis*, realizaram o controle de problemas de enraizamento e oxidação, utilizando apenas alterações em alguns componentes inorgânicos do meio.

Outro importante cuidado refere-se à condição fisiológica e fitossanitária da planta doadora. Estes fatores são fundamentais para o estabelecimento das culturas. Contaminações podem impossibilitar o desenvolvimento dos cultivos (DEBERGH e READ, 1991; MANTOVANI e FRANCO, 1998). Dessa forma, quando sementes são utilizadas como fonte inicial, conhecer o vigor e

sanidade são condições que podem otimizar os experimentos posteriores em cultura de tecidos de essências florestais (GOLLE et al., 2006).

### **3.3 Germinação e vigor de sementes**

Para que seja desenvolvido um processo silvicultural sustentável e rentável é fundamental o plantio de florestas com alta produtividade. Tal finalidade requer mudas de boa procedência e, conseqüentemente, sementes com alta qualidade fisiológica (FERRARI, 2003). Essa afirmativa corrobora com os relatos de Bianchetti (1981), onde este autor sugere que as tecnologias empregadas para sementes objetivam adaptar ou criar métodos adequados para determinadas espécies. Assim, tem-se como resultado final a melhoria do padrão dessas sementes e a colaboração com os avanços científicos nessa área.

A análise de sementes é uma ferramenta de grande relevância, pois fornece dados que expressam as qualidades físicas e fisiológicas dos lotes de sementes, para fins de semeadura e/ou armazenamento. Possibilita ainda o estabelecimento de parâmetros de comparação entre lotes (FIGLIOLIA et al., 1993). Para tais finalidades, pode-se obter informações através de diversos métodos. Dentre estes, a análise em laboratório sob condições controladas tem sido desenvolvida de maneira a permitir o conhecimento dos atributos fisiológicos de um lote de sementes. Estes testes recebem o nome de Análise do Vigor de Sementes e são, geralmente, realizados em laboratório, considerando que em campo, devido a diversos fatores ambientais, podem não demonstrar os resultados necessários e reais (BRASIL, 1992).

A noção de vigor, provavelmente, tenha surgido nos primórdios da humanidade, a partir do ponto em que o homem começou a ter um contato mais consciente com animais e vegetais. Trata-se de um fato biológico que se evidencia com facilidade quando se observa que, indivíduos de mesma espécie, apresentam taxas diferentes de desenvolvimento, o que os leva,

naturalmente, a uma classificação em fortes, fracos entre outros (CARVALHO, 1994).

Marcos Filho (1999) atribui ao termo vigor o conceito de “força motriz” ou “energia de crescimento”, a qualidade potencial de viabilidade das sementes, relacionada ao somatório de todos os seus atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, os quais podem afetar sua capacidade de originar plantas de alta produtividade. A qualidade fisiológica significa sua capacidade para o desenvolvimento de funções vitais, abrangendo germinação, vigor e longevidade (POPINIGIS, 1977).

Existem vários testes utilizados para o conhecimento da qualidade fisiológica das plantas, tanto para armazenamento, germinação e outros critérios. Estes são: teste de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, frio, tetrazólio, deterioração controlada, germinação a baixa temperatura. Porém, para vigor, testes baseados no desempenho de plântulas são os mais usuais, devido à facilidade de condução dos experimentos e bons resultados oferecidos (NAKAGAWA et al., 1999).

O processo germinativo é um fenômeno biológico, o qual pode ser considerado botanicamente como a retomada do crescimento do embrião, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula. Entretanto, para os tecnólogos de sementes, germinação é reconhecida desde que as plântulas apresentem tamanho suficiente para que se possam avaliar a normalidade de suas partes e a sua possibilidade de sobrevivência. Tendo-se uma semente viável, em repouso, por quiescência ou dormência, quando uma série de condições externas e internas é satisfeita, ocorrerá o crescimento do embrião, que conduzirá ao processo germinativo. Face ao exposto, do ponto de vista fisiológico, germinar é sair do repouso e entrar em atividade metabólica (BORGES e RENA, 1993).

A germinação e a emergência de plântulas refletem a qualidade fisiológica das sementes e as suas possíveis falhas na emergência ou redução da velocidade de emergência podem ser atribuídas ao baixo vigor do lote (ROSSETO, 1995).

De forma geral, os testes de vigor são instalados nas mesmas metodologias descritas nas Regras para Análise de Sementes - RAS - (BRASIL, 1992). A *International Seed Testing Association* - ISTA (ISTA, 1995) e a *Association of Official Seed Analysts* - AOSA (AOSA, 1983) propuseram testes de vigor que seriam os mais indicados. Dentre esses, ambas relacionaram os testes de crescimento de plântulas para a classificação do vigor.

Nakagawa (1999) refere-se aos testes de vigor, baseados no desempenho de plântulas como metodologia eficaz para avaliar:

- velocidade de germinação: muitas vezes lotes de sementes possuem diferentes percentagens de germinação em determinados tempos, mostrando diferenças no vigor destas sementes. Estes métodos baseiam-se na premissa de que, quanto maior a velocidade de germinação, maior será o vigor da semente;
- primeira contagem de germinação: baseia-se no princípio de que as amostras que apresentam percentagem maior de plântulas normais, quando realizada a primeira contagem, estabelecida pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), serão mais vigorosas. De uma maneira indireta, também estará sendo avaliada neste método a velocidade de germinação;
- crescimento das plântulas: correlaciona o crescimento da planta com seu vigor, podendo-se avaliar o crescimento das plântulas determinando-se o comprimento da plântula ou de parte desta, ou medindo o peso de matéria seca do eixo embrionário da plântula;
- classificação do vigor da plântula: tem por objetivo avaliar o vigor relativo do lote pelo percentual de plântulas normais vigorosas (normais fortes), obtido pela classificação das plântulas normais do teste de germinação.

Em muitos casos, para a realização de um teste é necessário superar a dormência, dureza, ou estimular a germinação das sementes, através de várias técnicas, tais como embebição, escarificação, tratamentos com ácidos, entre outras (BRASIL, 1992).

### 3.3.1 Tratamentos pré-germinativos e utilização de substratos diferenciados

Determinadas espécies devem passar por processos específicos para sua germinação, os quais visam à quebra da dormência das sementes, amolecimento do tegumento ou fornecimento de água (BORGES e RENA, 1993). Tratamentos como embebição em água, ácidos fortes, escarificação, entre outros, além da utilização de substratos diferenciados, são, em muitos casos, a condição necessária para o sucesso da emergência das plântulas. De forma geral, possuem relação direta com a facilitação da absorção de água pelas sementes (BORGES et al., 1994).

Smiderle et al. (2005) testaram tratamentos pré-germinativos em sementes de Acácia, da mesma forma, para sementes de *Trema micantha* (DAVID et al., 1993) e de *Didymopanax morototoni* (FRANCO e FERREIRA, 2002). Os autores citados obtiveram resultados satisfatórios, acelerando a velocidade de germinação ou, simplesmente, possibilitando a germinação.

Da mesma maneira, diferentes substratos são testados para a germinação das plantas (BRASIL, 1992). O substrato tem função de suprir a semente e prover o ambiente no qual esta possa germinar e se desenvolver. A escolha do material deve considerar o tamanho da semente, sua exigência com relação à umidade, sensibilidade ou não à luz entre outras (FIGLIOLIA et al., 1993). Nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), os substratos mais indicados são pano, papel-toalha, papel mata-borrão, terra e areia. Alguns outros substratos como carvão, sfagno e vermiculita também têm sido testados, gerando respostas satisfatórias (FIGLIOLIA et al., 1993).

## 3.4 Qualidade sanitária de sementes

Sementes são componentes essenciais da sustentação da vida. Além disso, possuem salutar importância na economia e comércio mundiais. Produzidas e transportadas globalmente para consumo e plantio, necessitam

de qualidade para garantir que não ocorram de prejuízos ambientais ou econômicos (DHINGRA, 2005). A expressão das doenças também é preocupante devido às disseminações, podendo inserir novos patógenos em áreas não contaminadas até então (MACHADO, 1988).

Muitos fatores são responsáveis por afetar a qualidade das sementes. Pode-se agrupá-los em quatro classes: fatores genéticos, fatores fisiológicos, fatores físicos e fatores sanitários (ABEAS, 1998).

No que se refere às espécies florestais, ainda são restritos os conhecimentos existentes sobre patologia de sementes, o que já havia sido relatado por Lasca (1985) e não mudou muito até os dias de hoje. O estudo de associações ocorrentes entre fungos e espécies florestais é de grande importância, pois permite subsídios para que se conheçam modelos de controle, epidemiologia e possível erradicação. Sabe-se que muitos fungos ocorrentes na área florestal são os mesmos conhecidos por causarem danos em espécies agrícolas (SANTOS et al., 2000).

A ocorrência de patógenos nas plantas pode acarretar redução nas populações, debilitação das plantas e ocorrência de sérias epidemias (MENTEN, 1991). Os patógenos são transmitidos ainda em campo ou durante os processos de beneficiamento, ocasionam muitas vezes uma severa redução na capacidade germinativa das sementes, além do possível tombamento das mudas após a emergência (CARNEIRO, 1987).

O modo de atuação dos organismos patogênicos em sementes está associado:

- ao consumo de conteúdo celular do hospedeiro, causando o seu enfraquecimento;
- morte ou distúrbio do metabolismo celular, utilizando-se da secreção de toxinas, reguladores de crescimento ou enzimas;
- bloqueio no transporte de alimentos, nutrientes e minerais, através dos tecidos condutores (MACHADO, 1988).

Carneiro (1987) refere em seus relatos, a escassez de conhecimentos sobre as perdas econômicas ocasionadas por patógenos em espécies florestais.

Tendo em vista o potencial existente, por parte das sementes, de transportarem uma série de microorganismos, patogênicos ou não, para o controle e conhecimento destes são necessárias realizações de testes, conhecidos como testes de sanidade de sementes (MARCOS FILHO, 1987). O principal objetivo destes testes é determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes e, conseqüentemente, do lote que representa. Dessa maneira, obtêm-se informações que podem ser utilizadas para comparar a qualidade de diferentes lotes ou determinar sua utilização comercial (BRASIL, 1992).

Segundo as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 1992), os testes de sanidade são importantes considerando três principais razões:

- os patógenos transmitidos através de sementes podem servir como inóculo inicial para o desenvolvimento progressivo de doenças no campo, reduzindo o valor comercial das sementes;
- lotes importados possuem o risco eminente de introduzir patógenos ou patótipos em áreas isentas e assim, testes de quarentena e certificação podem ser necessários;
- elucidam a avaliação das plântulas e causas de uma baixa germinação e vigor no laboratório ou campo, complementando os testes de germinação.

Dentre os métodos de incubação para a análise sanitária de sementes, o método do papel filtro, conhecido também como "blotter-test", costuma ser o mais utilizado (CARNEIRO, 1987). As sementes são distribuídas em repetições de número variável em função do tamanho dos recipientes e das sementes. O substrato utilizado costuma ser papel-filtro ou papel mata-borrão, em número de três folhas, umedecidos com água destilada e esterilizada. As sementes são incubadas por um período de sete a oito dias sob condições controladas de fotoperíodo e temperatura. Através da montagem de lâminas e com auxílio

de lupas e microscópios é feita a análise do material e identificação dos patógenos (ABEAS, 1998).

Carneiro (1987) observou em diversas pesquisas, realizadas com diferentes metodologias, que o método do papel filtro foi o mais eficaz, proporcionando o aparecimento de uma maior diversidade de organismos patogênicos ou saprófitas. Também concluiu sobre a importância desses testes no conhecimento de patógenos e posteriores medidas de controle, necessárias para a proteção de essências florestais, a fim de aumentar o volume de produção do mercado em termos de qualidade.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização dos experimentos e obtenção de sementes

Os experimentos referentes à análise sanitária e vigor de sementes foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais, prédio 42, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul. Os demais experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pertencente ao Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, localizado no Departamento de Fitotecnia, prédio 77, Centro de Ciências Rurais, da mesma Universidade.

As sementes de *Pinus taeda* L. foram cedidas pela empresa Klabin. Essas são originadas de pomares de sementes clonais (PSC) e pertenciam a três lotes:

- a) **PCS 1ª Geração Base Celucat 8203 (Celucat-1ªG)** – lote procedente de Ponta Alto do Norte, município localizado no Estado de Santa Catarina. As sementes que foram utilizadas para formar esta população vieram da África do Sul, mas sua origem é a planície costeira leste dos Estados Unidos da América;
- b) **PCS 1ª Geração Base Igaras: 8003 (Igaras-1ªG)** – este lote é procedente de Otacílio Costa, Santa Catarina. Sua origem é a Carolina do Sul (EUA);
- c) **PSC 2ª Geração Base Igaras: 8103 (Igaras-2ªG)** – lote procedente de Angatuba, São Paulo. Também tem sua origem na Carolina do Sul (EUA).

A colheita de todos os lotes foi realizada no ano de 2003. Os mesmos são utilizados pela empresa para plantio próprio, fomento e venda a viveiristas. (informações obtidas através de comunicação pessoal com o Sr. Glêison Augusto dos Santos, da empresa Klabin).

Foi verificado o teor de umidade das sementes. Para esta finalidade, aproximadamente 1g de sementes de cada lote foi pesado e condicionado em cápsulas de alumínio. Estas foram mantidas por 24h em estufa sob temperatura de 105°C. O teste teve uma repetição. Após serem retiradas da estufa, as sementes permaneceram em sílica gel enquanto processava-se a pesagem final.

Para o cálculo do percentual de umidade das sementes utilizou-se a fórmula  $\frac{PU - PS}{PU} \cdot 100$ , onde "PU" é o peso úmido, ou peso inicial das sementes e "PS" é o peso seco, após permanência em estufa. O lote Celucat-1°G apresentou 11,86% de umidade, enquanto Igaras-1°G e Igaras-2°G apresentaram 13,27% e 12,60%, respectivamente.

Posteriormente, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em câmara seca com temperatura controlada de 10°C e umidade relativa do ar de 45%, permanecendo durante todo o experimento nestas condições. A câmara utilizada pertence ao Laboratório Credenciado de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFSM.

#### **4.2 Experimento I – análise sanitária para a discriminação dos lotes de sementes de *Pinus taeda* L.**

Para analisar a sanidade das sementes, foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 25 unidades amostrais (sementes). Foram considerados como tratamentos os diferentes lotes de sementes.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas com auxílio de pinças em caixas do tipo Gerbox, contendo três folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada até atingir a proporção de três vezes o peso do papel.

Antes da inoculação, todo o material, com exceção das sementes, foi desinfestado com álcool a 70% e hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) com concentração de 2,5%. O mesmo material permaneceu durante 30 minutos exposto à luz ultravioleta, visando à redução de contaminações que não fossem originárias das sementes.

As caixas Gerbox foram fechadas e envoltas em sacos plásticos para melhor conservar a umidade. Estas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$  e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas.

Aos sete dias, foi realizada a identificação dos gêneros fúngicos através das observações das sementes em microscópios estereoscópicos e microscópios ópticos. Para microscopia óptica foram confeccionadas lâminas provisórias, retirando-se, com auxílio de agulhas histológicas, fita adesiva e pinças, uma amostra do micélio fúngico, contendo estruturas de reprodução. Este foi condicionado entre lâmina e lamínula com auxílio de corante à base de azul de metileno, objetivando melhorar a visualização.

Os dados percentuais coletados para cada gênero fúngico nas diferentes unidades experimentais (UEs) foram analisados estatisticamente através do programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os mesmos foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à Análise de Variância. Para comparação múltipla de médias utilizou-se o teste de Tukey com probabilidade de erro de 5%.

#### **4.3 Experimento II - vigor de sementes de *Pinus taeda* L. baseado no desempenho de plântulas**

Este experimento foi realizado tendo como base os protocolos de análises do vigor de sementes descritos para a espécie *Pinus taeda* L. nas

Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com oito repetições de vinte e cinco unidades amostrais para cada um dos três tratamentos.

As sementes foram colocadas, com auxílio de pinças, em caixas do tipo Gerbox, contendo três folhas de papel filtro esterilizado previamente umedecido com água destilada autoclavada até atingir três vezes o peso do papel. Todo este procedimento ocorreu em câmara de fluxo laminar. Todo o material, exceto as sementes, foi desinfestado com álcool a 70% e hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) concentrado a 2,5%, antes da montagem do experimento. Além disso, permaneceram por 30 minutos sob ação de lâmpada germicida, visando à redução de contaminações externas.

As caixas Gerbox foram fechadas e acondicionadas em sacos plásticos objetivando a permanência da umidade do papel. As UEs permaneceram em câmara de crescimento com temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$  e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas.

A primeira contagem de germinação foi efetuada aos sete dias, sendo consideradas como sementes germinadas, todas aquelas que romperam o tegumento e emitiram radícula.

Aos 28 dias, realizaram-se as análises de germinação e desempenho de plântulas, levando-se em consideração as variáveis:

- a) sementes mortas – sendo consideradas aquelas sementes que apresentavam secreção purulenta ou estavam ocas;
- b) sementes duras – caracterizadas por não apresentarem germinação, mas com aparência normal;
- c) plântulas anormais – consideradas aquelas que apresentavam deformidades em sua morfologia, emissão apenas de radícula ou de parte aérea;
- d) plântulas normais fracas – plantas que germinaram mas apresentavam pouco desenvolvimento, em especial no que se refere a comprimento;

- e) plântulas normais fortes – sendo aquelas que apresentavam características mais vigorosas, maiores índices de desenvolvimento e aspecto sadio.

Além dos dados percentuais obtidos na primeira contagem (sete dias) e variáveis analisadas na segunda contagem (28 dias), as plantas pertencentes à classe de normais fortes tiveram seu comprimento (cm), peso fresco (g) e peso seco (g) analisados. Para efetuar a análise do peso seco, as plantas permaneceram em estufa durante 24 horas sob temperatura constante de 50°C.

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os dados foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à Análise de Variância. Quando significativas, efetuou-se à comparação múltipla de médias, através do teste de Tukey com probabilidade de erro de 5%.

#### **4.4 Experimento III – desinfestação e germinação asséptica das sementes**

Utilizou-se para este experimento, as sementes pertencentes ao lote Celucat-1<sup>a</sup>G, selecionado a partir das observações dos experimentos I e II.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 21 repetições, em esquema bifatorial 3x2. Os níveis do fator “A” consistiram de combinações de hipoclorito de sódio (NaOCl) em diferentes tempos de exposição as sementes, sendo estes:

- a) NaOCl a 2% durante 10 minutos;
- b) NaOCl a 3% durante 5 minutos;
- c) NaOCl a 4% durante 3 minutos.

Estas concentrações foram obtidas a partir da diluição de NaOCl a 10%. É válido salientar que os tratamentos (diferentes tempos e

concentrações), foram formulados com base nos conhecimentos de desinfestação usuais de rotina laboratorial em cultura de tecidos.

Os níveis do fator “B” caracterizaram-se pelas diferenças de fotoperíodo em que as sementes ficaram expostas sendo:

- a) 16 horas de luz durante todo o experimento;
- b) 7 dias em ausência de luz e, posteriormente, 16 horas de luz durante o restante do período.

Precedendo os tratamentos, todas as sementes foram expostas durante 30 segundos à solução de álcool a 70%. Após as desinfestações referentes aos níveis do fator “A” as sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar e submetidas a três enxágües sucessivos com água destilada estéril. A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio ágar-água, composto por 0,07% de ágar, contendo três sementes (unidades amostrais).

Os frascos contendo o meio utilizado foram previamente autoclavados durante 45 minutos a 121°C e 1 atm de pressão.

As UEs permaneceram em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C ± 3 e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os tratamentos em que o nível do fator “B” era referente à ausência de fotoperíodo durante os primeiros sete dias, permaneceram inicialmente na mesma sala de crescimento em restrição de luz e, posteriormente, foram submetidos às mesmas condições que os demais.

As análises foram efetuadas semanalmente, durante o período de quatro semanas, sendo que os dados analisados foram obtidos através do somatório das observações ao final do experimento. As variáveis consideradas foram: germinação, oxidação fenólica, contaminação fúngica e contaminação bacteriana, todas expressas em percentagem.

No programa ESTAT (Unesp/Jaboticabal), os dados foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à análise de variância. Quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com probabilidade de erro de 5%.

#### 4.5 Substratos alternativos para a germinação de *Pinus taeda* L.

##### 4.5.1 Experimento IV – papel filtro, amido-água, ágar-amido-água

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e 23 repetições. Cada repetição foi composta por um frasco com capacidade para 150 ml, contendo o substrato referente ao tratamento e três sementes do lote Celucat-1°G. Foram testados substratos que não são comumente utilizados no cultivo *in vitro*. O primeiro tratamento constou de três folhas de papel filtro umedecidas com água estéril até atingir três vezes o peso do papel. O tratamento 2 consistiu de meio de cultura composto por água e amido de milho a  $100 \text{ g L}^{-1}$ ; e o terceiro tratamento consistiu em um meio de cultura composto por água,  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e  $75 \text{ g L}^{-1}$  de amido de milho. Os frascos contendo os substratos foram autoclavados durante 20 minutos à temperatura de  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm de pressão.

As sementes foram desinfestadas pelo seguinte protocolo:

- 1) permanência por 30 segundos em álcool a 70%;
- 2) lavagem em água destilada;
- 3) agitação branda em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, acrescido de três gotas de detergente comercial durante 5 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, estas passaram por três enxágües sucessivos com água destilada estéril e, posteriormente, foram inoculadas. Os frascos foram vedados com papel alumínio. Após, as UEs permaneceram em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25^\circ\text{C} \pm 3$  e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Foram feitas observações semanais referentes às variáveis: germinação, oxidação fenólica, contaminação fúngica e contaminação bacteriana. Os dados percentuais analisados são oriundos da computação de todas as observações. Com auxílio do programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal), os mesmos passaram por transformação  $\sqrt{x+0,5}$  e foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas através do teste de Tukey com probabilidade de erro de 5%.

Os meios de cultura contendo agentes solidificantes foram submetidos, além das análises estatísticas, a observações descritivas referentes ao seu comportamento no decorrer dos experimentos, como estado físico do meio, aparência e potencial de uso.

#### 4.5.2 Experimento V - meio MS+vermiculita e meio MS+carvão ativado

Conduziu-se este experimento em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 20 repetições. Os tratamentos foram meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com vermiculita e meio MS solidificado acrescido de carvão ativado.

Para o tratamento com vermiculita utilizou-se meio MS, o qual foi adicionado em cada frasco em sua forma líquida, no volume de 30 mL sob 3 g de vermiculita (rocha expandida) granulometria 2. O outro tratamento utilizou 30 mL por frasco meio MS acrescido de 7 g L<sup>-1</sup> ágar e 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Antes do meio ser vertido sobre a vermiculita ou, antes de adicionar ágar naqueles que o continham, com o auxílio de KOH (hidróxido de potássio) e HCl (ácido clorídrico), o pH do meio foi ajustado para 5,8. O material foi autoclavado a uma temperatura de 121°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos, visando evitar a caramelização do meio, fenômeno que pode ocorrer devido à presença de sacarose nos mesmos.

Sementes de *Pinus taeda* L., pertencentes ao lote Celucat de 1ª Geração, foram desinfestadas seguindo o mesmo protocolo estabelecido no experimento IV. Em câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por três enxágües sucessivos e foram inoculadas nos frascos contendo meio, os quais foram fechados com papel alumínio. As UEs permaneceram em sala de crescimento, a qual possui fotoperíodo controlado de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtida por lâmpadas fluorescentes brancas e temperatura de 25°C  $\pm$  3.

Foram realizadas avaliações semanais no período de 30 dias. Os dados utilizados para análises foram obtidos em porcentagem ao final das observações. As variáveis observadas foram: contaminação fúngica, contaminação bacteriana, germinação e oxidação fenólica.

As análises estatísticas foram realizadas no programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os dados foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à análise de variância com teste F ( $\alpha 0,05$ ).

#### **4.6 Experimento VI – subsídio hídrico fornecido por diferentes substratos para a germinação de sementes de *Pinus taeda* L.**

Testaram-se três diferentes substratos quanto ao suprimento hídrico fornecido por estes às sementes de *Pinus taeda* L., em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições. Os substratos foram:

- a) papel filtro: em número de três folhas, adicionadas ao fundo de frascos de vidro com capacidade para 150 ml e umedecidas até atingirem 3 vezes o peso do papel;
- b) algodão hidrófilo: 0,600 g de algodão em frascos com capacidade para 150 ml, umedecido até ficar completamente encharcado;
- c) ágar-agua: composto de água e 0,07% de ágar, previamente autoclavado durante 40 minutos.

A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo o substrato referente a seu tratamento e 10 sementes (unidades amostrais). As sementes não foram submetidas à desinfestação, possibilitando observar a influência dos substratos na contaminação por microrganismos.

Analisou-se a absorção de água pelas sementes durante os períodos de 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas. Para estas análises, as sementes de cada UE foram previamente pesadas e, posteriormente, efetuou-se também a pesagem

durante os tempos citados. Os dados analisados são referentes ao ganho de peso em porcentagem das sementes, os quais possuem relação direta com a quantidade de água absorvida pelas mesmas.

As UEs permaneceram, durante o decorrer do tempo, em sala de cultivo com temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$  e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas.

Após as pesagens, 21 dias, realizou-se análise das contaminações fúngicas, bacterianas e da germinação, com todos os valores expressos em porcentagem

Foi efetuada a transformação dos dados para  $\sqrt{x+0,5}$  e os mesmos foram submetidos à análise de variância e comparação múltipla de médias através do teste de Tukey com probabilidade de erro de 5%. Foi utilizado para esta finalidade o programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal).

#### **4.7 Experimento VII – tratamentos pré-germinativos**

##### **4.7.1 Experimento VII – diferentes tempos de embebição das sementes com desinfestação superficial**

Testou-se, nesse experimento, três diferentes tempos de embebição das sementes, sendo 24, 48 e 72 horas. Estes foram obtidos deixando-se as sementes imersas em frascos com capacidade para 150 ml, contendo 50 ml de água destilada.

Precedendo a inoculação, as sementes passaram por desinfestação superficial, sendo esta: 30 segundos em álcool a 70%, lavagem em água destilada, 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, acrescido de 3 gotas de detergente comercial. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em número de três em frascos contendo 600 mg de algodão hidrófilo, embebido em água destilada estéril. Os

frascos com o substrato foram autoclavados previamente durante 20 minutos a 121°C e 1 atm de pressão.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 23 repetições. As UEs foram compostas por frascos contendo o meio composto por algodão hidrófilo e três sementes do lote Celucat-1°G. Estes permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , obtida por lâmpadas fluorescentes brancas e temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 3$ .

Realizaram-se análises semanais, sendo os dados utilizados compostos pela percentagem observada ao final de 30 dias de observações para as variáveis: germinação, oxidação fenólica, contaminação fúngica e contaminação bacteriana.

As estatísticas foram realizadas com o *software* ESTAT (Unesp-Jaboticabal), onde os dados foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à análise de variância. Quando significativos, foi realizada análise de regressão polinomial.

#### 4.7.2 Experimento VIII – diferentes tempos de embebição das sementes sem desinfestação superficial

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos e 20 repetições. Os tratamentos foram referentes à embebição das sementes em 50 ml de água destilada antes da inoculação nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar asséptico, três sementes foram inoculadas em frascos contendo 600 mg de algodão hidrófilo embebido com água destilada e previamente autoclavado durante 20 minutos, à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão. Foi considerado como unidade experimental um frasco com capacidade de 150 ml com 0,600 g de algodão hidrófilo umedecido e três sementes do lote Celucat-1°G. Estas UEs

permaneceram em câmara de crescimento com temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$  e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , emitida por lâmpadas fluorescentes brancas.

As análises foram feitas aos 7, 14 e 21 dias, levando em consideração as variáveis: germinação (sementes em qualquer estágio de desenvolvimento desde que houvessem emitido radícula), emissão de cotilédones (considerando apenas sementes germinadas que haviam exposto os cotilédones e possuíam tamanho igual ou superior a 3 cm), contaminação fúngica e bacteriana. Também se determinou o nível de injúria das plantas ao final do experimento.

Com auxílio do programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal) os dados percentuais foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à análise de variância e regressão polinomial.

#### **4.8 Experimento IX - seleção de meios para o estabelecimento *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de nós cotiledonares**

Para o estabelecimento *in vitro* de *Pinus taeda* L. foram testados três diferentes meios de cultura, sendo estes o meio MS, WPM (Tabela 1) e  $\frac{1}{2}$ MS. Esse último é constituído dos mesmos sais do meio MS, reduzidos à metade de sua concentração. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições.

TABELA 1 – Composição dos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981)\*

<b>Componentes</b>	<b>WPM (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>MS (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	556,00	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,00	1.650,000
KNO <sub>3</sub>	-	1.900,000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	96,00	440,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00	370,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	170,000
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990,00	-
<b>Micronutrientes</b>		
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30	22,300
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	8,600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	6,200
KI	-	0,830
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,250
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,025
<b>Ferro-EDTA</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25	37,250
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85	27,850
<b>Vitaminas</b>		
Tiamina-HCl	1,00	0,100
Piridoxina- HCl	0,50	0,500
Ác. Nicotínico	0,50	0,500
Glicina	2,00	2,000
<b>Mio-inositol</b>	100,00	100,000

\* Dados adaptados de Mantovani e Franco (1998).

Sementes de *P. taeda* pertencentes ao lote Celucat-1°G, após embebição em água destilada por 48 horas, foram germinadas em algodão hidrófilo embebido. Aos 14 dias, plântulas que já estavam emitindo os cotilédones foram coletadas e postas em um copo de Becker contendo água destilada para evitar dessecação. Após, passaram por desinfestação, utilizando-se o mesmo protocolo das desinfestações das sementes, sendo este: imersão em álcool 70% durante 30 segundos; lavagem em água destilada; imersão e agitação em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% durante 5 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, as mesmas foram lavadas com três enxágües sucessivos com água destilada autoclavada. Com auxílio de pinças e bisturis, foram excisados nós cotiledonares com 1 cm de comprimento,

sendo 0,5 mm de caule e 0,5 mm de cotilédones. Os mesmos foram inoculados nos respectivos meios de cultura referentes aos tratamentos citados. Esses haviam sido autoclavados previamente durante 20 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão.

Posteriormente, foram levados à sala de cultivo, onde permaneceram, no decorrer das avaliações, sob temperatura de 25°C ± 3 e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, com intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas.

As avaliações foram realizadas aos 40 dias, levando-se em consideração o comprimento dos brotos (cm). Demais variáveis não foram analisadas devido a problemas referentes à contaminação e alta elevação de temperatura da sala de cultivo, ocorridos no decorrer do experimento.

Foram considerados como unidade experimental três frascos contendo 30 mL de meio e um explante cada. As análises estatísticas foram efetuadas no programa ESTAT (Unesp-Jaboticabal). Os dados foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à análise de variância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção de lote de sementes através da análise de vigor e fitossanidade – Experimentos I e II

Foram identificados nove gêneros fúngicos, ocorrentes nas sementes dos três lotes de *P. taeda*, sendo que, através da porcentagem de contaminação de cada um, da análise de variância e dos testes de comparação múltipla de médias, foi possível diferenciar os lotes quanto a sua qualidade sanitária (Tabela 2).

A porcentagem de contaminação pelo gênero *Aspergillus* não diferiu estatisticamente entre os três lotes analisados. O lote Celucat-1<sup>a</sup>G não apresentou contaminação por este fungo, enquanto os lotes pertencentes aos genótipos Igaras, de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> Gerações, apresentaram 0,5% e 1% de contaminação, respectivamente. *Aspergillus* é um patógeno de armazenamento conhecido, muito relatado na literatura mundial como um fungo que ocorre comumente em sementes de essências florestais, especialmente no gênero *Pinus*. Sua contaminação costuma ocorrer ainda durante a colheita, embora apresente grande disseminação no período de armazenamento das sementes (SANTOS et al., 2000).

Bitencourt e Homechin (1998) avaliaram a qualidade sanitária de sementes de *Casearia sylvestris* Swartz, através de diferentes métodos de incubação e encontraram 2% de contaminação com *Aspergillus*, relatando este fungo como patógeno de sementes. Da mesma forma, Nascimento et al. (2006) detectaram a ocorrência desse mesmo gênero em dois lotes de sementes da espécie florestal *Pterogyne nitens*.

A ocorrência de *Cercospora* não apresentou diferenças estatísticas nas sementes testadas, foi encontrado apenas nos lotes Celucat (0,5%) e Igaras-1<sup>a</sup>G (1%). Esse fungo também é patógeno de outras espécies florestais. Manchas foliares em plantas de erva-mate (*Illex paraguariensis*), observadas em viveiros de produção de mudas, são freqüentemente atribuídas ao *Cercospora*. A cercosporiose é uma doença secundária, pois possui baixa incidência e disseminação. Caracteriza-se pelo aparecimento de manchas arredondadas, com halo escuro e pequenas pontuações, podendo prejudicar seriamente o desenvolvimento das plantas (GRIGOLETTI JUNIOR e AUER, 1996).

O gênero *Cladosporium* foi identificado nos lotes de sementes Celucat-1<sup>a</sup>G e Igaras-2<sup>a</sup>G, na porcentagem de 5% em ambos, não ocorrendo nas sementes do lote Igaras-1<sup>a</sup>G. Estatisticamente, essas diferenças não foram consideradas significativas. Santos et al. (2001) também observaram a ocorrência de *Cladosporium* em sementes de *Acácia mearnsii*. Da mesma forma, Bitencourt e Homechin (1998) identificaram sua ocorrência em sementes de *Casearia sylvestris*.

A presença de *Curvularia* foi identificada apenas nas sementes do lote Igaras-1<sup>a</sup>G, mesmo assim, não ocorreram diferenças estatísticas entre os lotes quanto a este gênero. Esse fungo, juntamente a outros, é um dos responsáveis pela disseminação em viveiros de uma importante patologia florestal, denominada "damping-off". Essa doença, comum em coníferas, afeta a germinação das sementes bem como plântulas recém nascidas, causando lesões no colo das mudas, destruindo tecidos e provocando tombamento (CARNEIRO, 1987). Outro gênero fúngico capaz de ocasionar o tombamento de mudas, segundo (CARNEIRO, 1987) é *Rhizoctonia*, o qual foi identificado em 1% das sementes do mesmo lote onde ocorreu *Curvulária* (Igaras-1<sup>a</sup>G), não sendo encontrado nos demais. Não se observou diferença estatística entre as três procedências de sementes avaliadas. O gênero *Rhizoctonia* é conhecido por ocasionar a mancha-de-*Rhizoctonia*, caracterizada sintomatologicamente por grandes manchas irregulares em folhas de *Eucalyptus* de diferentes idades e outras espécies florestais. Esse patógeno

sobrevive no solo atingindo folhas rasteiras e contaminando sementes recém plantadas (ALFENAS et al., 2004).

Não houve diferenças estatísticas entre os lotes quanto à presença de *Pestalotia*. Esse patógeno foi identificado em todos os lotes nas proporções de 1,5% (Celucat-1<sup>a</sup>G); 3,5% (Igaras-1<sup>a</sup>G) e 0,5% (Igaras-2<sup>a</sup>G). A existência deste gênero nas sementes está de acordo com o que cita Carneiro (1987), que o considera como um dos principais fungos encontrados em sementes de espécies florestais, especialmente em *Pinus taeda*. Este mesmo autor correlaciona *Pestalotia* com “needle cast”, uma das doenças conhecidas das pináceas. Em viveiros de *Eucalyptus*, a mancha foliar e anelamento da haste, ambas doenças causadas pelo gênero em questão, formam manchas necróticas em folhas e hastes. Este fungo é endofítico, sendo considerado um patógeno secundário ou patógeno fraco (ALFENAS et al., 2004).

Também foi identificado o gênero *Fusarium* nos lotes. Este, por sua vez, mostrou diferenças estatísticas em sua percentagem de contaminação. Os lotes Celucat-1<sup>a</sup>G e Igaras-2<sup>a</sup>G foram iguais estatisticamente, apresentando as médias de ocorrência deste patógeno 0,5% e 0%, respectivamente, e ambos foram sanitariamente superiores ao lote Igaras-1<sup>a</sup>G, o qual apresentou média de contaminação de 17,5%. A presença deste fitopatógeno em sementes de *P. taeda* L. já havia sido relatada por Carneiro (1987), o qual atribui também a este gênero fúngico o “damping-off”, doença ocorrente em espécies florestais, promotora de danos significativos à produção de mudas em viveiros (CARNEIRO, 1987). Embora seja considerado um patógeno de solo, contaminações por este gênero ocorrem das mais diversas formas. Seus esporos podem sobreviver nas sementes e serem introduzidos em novas áreas, constituindo fontes potenciais de inóculo (PIZZINATTO, 1991). A presença deste fungo também corrobora com os resultados de Bittencourt e Homechin (1998), que o encontraram em sementes de *Casearia sylvestris*. Em *Acacia mearnsii* sua ocorrência em sementes foi evidenciada por Santos et al. (2001). Esse gênero também é muito freqüente em erva-mate, causando podridão de raízes, estacas e morte dos ponteiros (GRIGOLETTI JÚNIOR e AUER, 1996).

Quanto à contaminação por *Penicillium*, o melhor lote foi Igaras-2<sup>a</sup>G (1%), sendo este superior estatisticamente aos lotes Celucat-1<sup>a</sup>G (12,5%) e Igaras-1<sup>a</sup>G (14,5%). Este é um patógeno típico de armazenamento, relatado em várias espécies florestais como *Pinus*, Timbaúva, Canafístula, Acácia, *Eucaliptus*, Cedro entre outros, podendo ser isolado de qualquer espécie florestal ou agrônômica, ervas-daninhas entre outras (SANTOS et al., 2000).

*Trichoderma* também se mostrou em porcentagens que permitiram discriminar os lotes de forma estatística. Os lotes Celucat-1<sup>a</sup>G (3,5%) e Igaras-1<sup>a</sup>G (11%) não diferiram estatisticamente e superiores ao lote Igaras-2<sup>a</sup>G (36%). Geralmente encontrado em sementes de espécies florestais (SANTOS et al., 2000), este fungo pode auxiliar no controle de demais contaminantes, sendo muitas vezes utilizado como controle biológico (BETTIOL e GHINI, 1995).

Os gêneros identificados nestas sementes ratificam os relatos de Bitencourt e Homechin (1998), que citam estes mesmos gêneros entre os principais fungos patogênicos contaminantes de sementes de espécies florestais. A maior parte dos problemas ligados a estes patógenos ocorre durante a fase de germinação e formação de mudas (CARNEIRO, 1987; SANTOS et al., 2000).

TABELA 2 – Porcentagem de gêneros fúngicos ocorrentes nos lotes de sementes de *Pinus taeda* L. Celucat de 1<sup>a</sup> Geração (Celucat-1<sup>a</sup>G), Igaradas de 1<sup>a</sup> Geração (Igaras-1<sup>a</sup>G) e Igaras de 2<sup>a</sup> Geração (Igaras-2<sup>a</sup>G). Santa Maria-RS, UFSM, 2007.

Gêneros Fúngicos (%)	Lotes de Sementes			CV (%)
	Celucat-1 <sup>a</sup> G	Igaras-1 <sup>a</sup> G	Igaras-2 <sup>a</sup> G	
<i>Aspergillus</i>	0 a*	0,5 a	1 a	1,31
<i>Cercospora</i>	0,5 a	1 a	0 a	1,31
<i>Cladosporium</i>	0,5 a	0 a	0,5 a	1,13
<i>Curvularia</i>	0 a	0,5 a	0 a	0,8
<i>Fusarium</i>	0,5 a	17,5 b	0 a	6,2
<i>Penicillium</i>	12,5 b	14,5 b	1 a	5,9
<i>Pestalotia</i>	1,5 a	3,5 a	0,5 a	4,03
<i>Rhizoctonia</i>	0 a	1 a	0 a	1,05
<i>Trichoderma</i>	3,5 a	11 a	36 b	7,96

Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Utilizando os fungos identificados (Anexo A) como variáveis para as análises estatísticas, foi possível discriminar os lotes de sementes, o que permite dizer que esta técnica que pode ser utilizada como critério de seleção. Celucat-1<sup>a</sup>G, em geral, apresentou médias mais baixas de contaminação quando houve diferenças estatísticas entre as variáveis (gêneros fúngicos) analisadas. Apenas para o gênero *Penicillium* este lote apresentou-se sanitariamente inferior, porém, ainda assim, sua média de contaminação foi mais baixa que Igaras-1<sup>a</sup>G. Os respectivos coeficientes de variação, observados nos experimentos, mostraram-se dentro dos padrões considerados como baixos (Tabela 2).

Do ponto de vista estatístico, os melhores patógenos para discriminar sementes de *Pinus taeda* pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Observa-se que, ao levar em consideração apenas as médias percentuais encontradas, também seria possível estratificar os lotes, chegando-se ao mesmo resultado, porém, com menor confiabilidade.

Quanto ao vigor (Tabela 3), a variável germinação aos sete dias não foi eficiente para discriminar os lotes. Este resultado assemelha-se aos observados por Alves et al. (2005), os quais em estudos sobre influência do tamanho de sementes e procedência destas, referentes à espécie *Mimosa caesapinnifolia*, concluíram que a primeira contagem de germinação não foi um bom critério para distinção dos lotes.

As variáveis sementes mortas, sementes duras e plântulas normais fracas, não apresentaram diferenças estatísticas e, portanto, podem ser consideradas como critérios sem sensibilidade na discriminação dos lotes de sementes de *P. taeda*. Santos et al. (1998) consideraram a variável sementes mortas como eficiente para observar o efeito de fungicidas sobre sementes de algodão.

Em contrapartida, as variáveis plântulas anormais e plântulas normais fortes mostraram-se eficientes para a discriminação dos lotes. Esses resultados diferem de Muniz et al. (2004), que comparando métodos de avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão, observaram a baixa sensibilidade dos testes de avaliação de plântulas para realizar uma estratificação significativa dos lotes pelo vigor. Santos et al.

(1998) consideraram as variáveis plântulas normais fortes e fracas significativas na determinação da época de coleta que proporciona os melhores índices de germinação em sementes de algodão.

As sementes Celucat-1<sup>a</sup>G apresentaram menor média de formação de plântulas anormais (13,5%), o que é desejável em um lote de sementes. As sementes Igaras-1<sup>a</sup>G e Igaras-2<sup>a</sup>G apresentaram médias de plântulas anormais 25 e 28%, não diferindo estatisticamente e, conseqüentemente, inferiores ao genótipo Celucat-1<sup>a</sup>G.

Na formação de plântulas normais fortes, o lote Celucat-1<sup>a</sup>G apresentou maior porcentagem (52%), sendo superior ao lote Igaras-2<sup>a</sup>G, o qual teve 26% de plântulas normais fortes. O lote Igaras-1<sup>a</sup>G foi considerado como intermediário, apresentando 34% de plântulas normais fortes, não diferindo dos demais estatisticamente.

Face ao exposto, observa-se que as sementes Celucat-1<sup>a</sup>G podem ser consideradas superiores por apresentarem menor formação de plântulas anormais e maior porcentagem de germinação de plântulas normais fortes. Tais critérios proporcionaram um bom grau de diferença entre o potencial germinativo das sementes. Estas mesmas variáveis foram consideradas eficientes por Santos et al. (1998) para discriminação de sementes de algodão. Já na espécie florestal *Pterogyne nitens*, as variáveis plântulas normais, anormais e sementes mortas não foram eficientes na extratificação dos diferentes lotes (NASCIMENTO et al., 2006).

As variáveis comprimento (cm), peso fresco (g) e peso seco (g), de plântulas normais fortes também foram eficientes para selecionar os lotes de sementes de *Pinus taeda* L., apresentando resultados que podem ser correlacionados aos obtidos nas plântulas normais fortes, de onde se originaram estas variáveis.

Com base nas análises realizadas, é possível dizer que os testes de vigor baseados no desempenho de plântulas, em especial as variáveis: plântulas anormais, plântulas normais fortes, peso seco, peso fresco e comprimento de plântulas normais fortes são eficientes como técnica para a seleção de lotes de sementes de *Pinus taeda* com qualidade fisiológica

superior. Estes resultados estão de acordo com as afirmações de Figliolia et al. (1993), os quais consideram de suma importância às análises de sementes por expressarem a qualidade física e fisiológica do lote, servindo como parâmetros para a comparação entre os mesmos, bem como para fornecer dados sobre suas condições durante o armazenamento.

TABELA 3 – Análise do vigor de três lotes de sementes de *Pinus taeda* L. através do desempenho de plântulas. Variáveis em porcentagem: germinação aos 7 dias (G7). Aos 28 dias: sementes mortas (SM), sementes duras (SD), plântulas anormais (PA), plântulas normais fracas (PN fracas) e plântulas normais fortes (PN fortes). Referente a plântulas normais fortes: comprimento (cm), peso fresco (g) e peso seco (g). Santa Maria, UFSM, 2007.

Lotes	Variáveis Analisadas		
	G7 (%)	SM (%)	SD (%)
Celucat-1°G <sup>1</sup>	5 a <sup>3</sup>	1,5 a	21,25 a
Igaras-1°G	12 a	4,5 a	29,50 a
Igaras-2°G	4,5 a	6,5 a	27 a
CV (%) <sup>2</sup>	5,84	3,63	6,98

Lotes	Variáveis Analisadas		
	PA	PN fracas	PN fortes
Celucat-1°G	13,5 a	13,5 a	52 a
Igaras-1°G	25 b	7 a	34 a b
Igaras-2°G	28 b	12,5 a	26 b
CV (%)	5,84	6,28	8,52

Lotes	Variáveis Analisadas (PN fortes)		
	Comprimento (cm)	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
Celucat-1°G	8,50 a	0,655 a	0,10 a
Igaras-1°G	6,34 b	0,327 b	0,04 b
Igaras-2°G	6,25 b	0,258 b	0,03 b
CV (%)	7,87	10,51	3,52

<sup>1</sup> 1°G= 1ª geração, 2°G= 2ª geração.

<sup>2</sup> Coeficiente de variação expresso em porcentagem.

<sup>3</sup> Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Bianchetti (1981) também salienta a importância dos testes de germinação para a possível comparação entre lotes de sementes e padronização de processos, além de mencionar a carência existente nestes dados, a qual é perceptível até hoje, considerando as poucas espécies

florestais presentes nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), conforme já havia sido anteriormente citado.

## 5.2 Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. – Experimento III

Não ocorreram interações significativas entre os níveis dos fatores testados e nem diferenças estatísticas nos mesmos, isoladamente, para as variáveis germinação e contaminação bacteriana.

Observou-se que as médias de germinação foram muito baixas, em especial ao tomar-se como base a germinação de plântulas que ocorreram na análise do vigor onde, considerando apenas plântulas normais fortes, se obteve 52%. A germinação após desinfestação nos diferentes tratamentos pode ser observada na figura 1. A maior porcentagem de germinação obtida foi 3,33%.

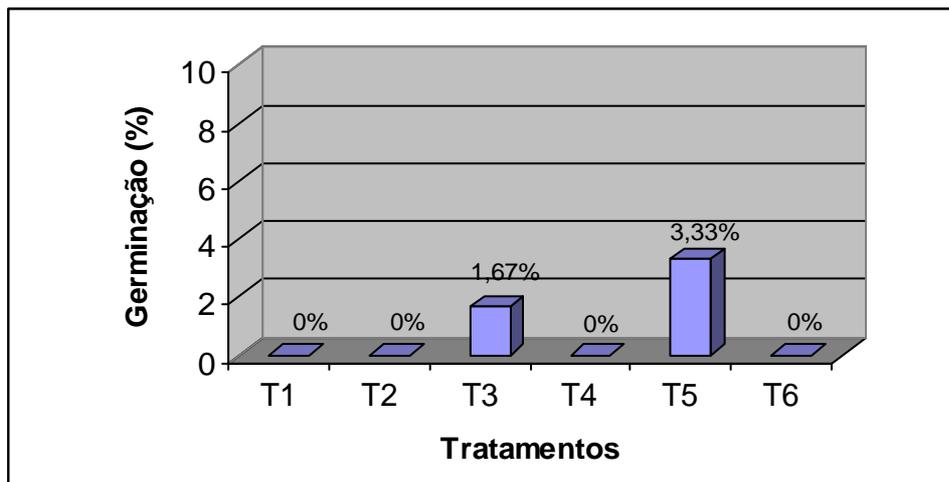


Figura 1 – Percentagem de germinação das sementes nos tratamentos T1 (NaOCl 2% por 10 min), T3 (NaOCl 3% por 5 min) e T5 (NaOCl 4% por 3 min), tendo estes permanecido durante o experimento em fotoperíodo de 16 h. T2 (NaOCl 2% por 10 min), T5 (NaOCl 3% por 5 min) e T6 (NaOCl 4% por 3 min), permaneceram 7 dias em ausência de luz e, após, nas mesmas condições de luminosidade que os demais. Santa Maria-RS, UFSM, 2007.

É possível que fatores ligados ao meio físico ou químico, como a toxidez causada por ágar, hipoclorito ou baixa disponibilidade de água tenham tido

relação direta com a baixa porcentagem de germinação observada. Caldas et al (1998) mencionam a possível toxicidade ocasionada pelo ágar que pode ocorrer em algumas espécies vegetais, especialmente quando este composto geleificante/solidificante apresenta baixo grau de pureza. Nogueira et al. (2004) em seus experimentos com *Byrsonima intermedia* referiram-se à interferência no processo de embebição, necessário à germinação de sementes, ocasionado pela presença de sais, carboidratos e solidificantes que alteram a condição osmótica do meio de cultura. A utilização de determinadas concentrações de hipoclorito de sódio podem ser úteis na desinfestação das sementes, mas prejudiciais à germinação. Sementes de Capiçova (*Erechtites valerianaefolia*), que sofreram assepsia com hipoclorito de sódio, tiveram seu potencial germinativo reduzido em 24%, além do retardo de aproximadamente 2,95 dias em seu tempo de germinação (ZAYAT e RANAL, 1997).

Em relação à contaminação fúngica, não ocorreu interação significativa entre os tratamentos e também não houve efeito significativo para os níveis do fator B (presença ou ausência de luminosidade durante a primeira semana de execução do experimento). Já o fator A (desinfestações com hipoclorito em diferentes tempos) evidenciou a ocorrência de diferenças estatísticas.

A desinfestação em NaOCl, na concentração de 3% durante 5 minutos, foi estatisticamente superior ao procedimento com NaOCl concentrado a 2% durante 10 minutos, apresentando também a menor porcentagem de contaminação em relação a desinfestação com NaOCl, na concentração de 4% por 3 minutos, porém, não diferindo estatisticamente deste último. Além disso, NaOCl 4% por 3 minutos também não diferiu estatisticamente do tratamento que apresentou maior porcentagem de contaminação, podendo assim ser considerado intermediário (Figura 2).

Estes resultados estão, em parte, de acordo com Pérez-Bermúdez e Sommer (1987), que para desinfestação de sementes de *Pinus elliottii* (Engelm.) utilizaram solução de hipoclorito de sódio concentrado a 3%. Porém, esses autores também utilizaram álcool 70% durante 15 minutos, além de tratamento com ácido clorídrico diluído; pois o embrião foi excisado para o processo *in vitro*. Também para cultivo de embriões, sementes de *Pinus taeda*

L. são desinfestadas em clorox 50% durante 20 minutos, apresentando bons resultados (LI e HUANG, 1996).

Na desinfestação de sementes de *Pinus eldarica*, Sen et al. (1994) utilizam solução de hipoclorito de sódio com concentração bem mais reduzida, 0,8%, durante 15 minutos, obtendo eficácia na assepsia destas para posterior excisão dos embriões. Em sementes de *Pinus banksiana* (Lamb) Harry e Thorpe (1994) obtiveram bons resultados de desinfestação com concentrações de hipoclorito de sódio a 6% durante 20 minutos. Comparando-se estes resultados com os obtidos, observa-se a grande diferença nas respostas dos tratamentos quanto à desinfestação das sementes de diferentes espécies do gênero *Pinus*. Estes resultados demonstram que diferentes espécies, mesmo pertencendo a um mesmo gênero, resultam em respostas distintas, ratificando o que cita Handley et al. (1995), autor que relata a grande gama de comportamentos diferenciados das diversas espécies vegetais *in vitro*.

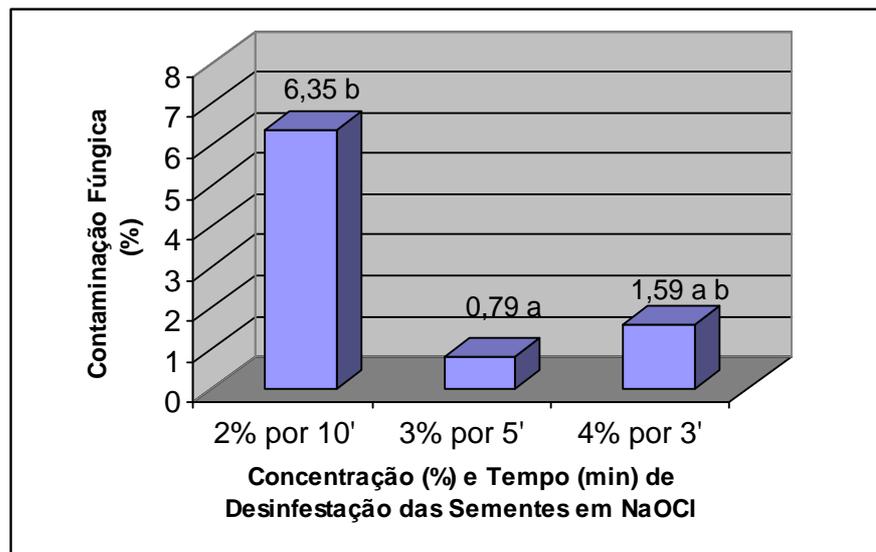


FIGURA 2 – Percentual de contaminação fúngica nos três níveis do fator A, diferentes tempos de desinfestação e concentração de Hipoclorito de Sódio (NaOCl). Santa Maria, UFSM, 2007.

Observa-se a existência de uma estreita relação entre a concentração de hipoclorito e o tempo de contato deste com as fontes de explantes. Nesse caso, em especial, baixas concentrações por tempos elevados e altas concentrações por tempos restritos apresentaram menor eficiência e igualdade estatística. Em contrapartida, uma concentração intermediária em tempo também intermediário mostrou-se de grande eficiência, não chegando às

contaminações a 1%, o que pode ser considerado um bom resultado tratando-se de espécies florestais, as quais costumam apresentar problemas sérios de contaminação, conforme já havia sido citado.

Essa relação existente entre o tempo de contato e a concentração da solução desinfestante com as fontes de explantes é muito importante e pode variar muito. Dela depende o sucesso do processo de desinfestação, ligado à ocorrência ou não de possíveis patógenos que possam impedir o desenvolvimento *in vitro*, mas também é fator dependente desta condição, a necessidade de regular tempo e concentrações de forma adequada para que não ocorra injúria ou morte dos tecidos ou órgãos que serão cultivados (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A utilização do álcool, *a priori*, não foi responsável pelos problemas de germinação, considerando que este foi utilizado apenas por 30 segundos, com intuito de sua ação surfactante auxiliar na assepsia posterior. Tempos em segundos são normalmente usuais para álcool em cultura de tecidos e, de modo geral não apresentam problemas. Poucas espécies necessitam e aceitam maiores tempos de contato com o álcool (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

### **5.3 Utilização de meios alternativos para a germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. – Experimentos IV e V**

Para o experimento que se utilizou como substrato papel filtro (PF), meio água-amido (AM) e meio água-amido-ágar (AG+AM) como substratos, não ocorreram diferenças estatísticas significativas para a germinação. Esta ocorreu em 1,43% das sementes inoculadas nos meios solidificados com amido e ágar+amido. O meio de papel filtro apresentou germinação zero. Essas taxas podem ser consideradas muito baixas em relação aos experimentos anteriores.

A ausência de germinação no meio papel filtro deve-se à ausência de água neste, decorrente da autoclavagem, a qual diminuiu o teor de água do papel, seguido da temperatura de incubação das UEs. A água não foi repostada para evitar contaminações externas.

Não ocorreram diferenças significativas para as contaminações bacterianas nos tratamentos testados. Bactérias foram observadas apenas no meio solidificado com amido, onde contaminaram 1,43% das sementes.

Quanto à contaminação fúngica, o tratamento papel filtro apresentou-se superior ao tratamento água-amido, porém, não diferiu estatisticamente do tratamento água+amido+ágar. Porém, não é possível confirmar a superioridade, neste caso, do uso do papel filtro, devido à ocorrente ausência de umidade, já citada anteriormente, o que pode reduzir a ocorrência de bactérias. A Tabela 4 mostra os dados obtidos através das análises estatísticas.

TABELA 4 – Percentual de germinação, contaminação fúngica e bacteriana de sementes de *Pinus taeda* L. nos meios alternativos para o cultivo *in vitro*: Papel Filtro, Água+Amido de Milho (AM) e Água+Ágar+Amido de Milho (AG+AM). Santa Maria, UFSM, 2007.

Substrato	Variáveis Observadas		
	Germinação (%)	Fungos (%)	Bactérias (%)
Papel Filtro	0 a*	0 a	0 a
Água + Amido	1,43 a	8,6 b	1,43 a
Água+Amido+Ágar	1,43 a	1,43 a b	0 a
CV (%)	4,87	8,99	3,46

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A utilização de amido como solidificante e desse combinado com agar, são metodologias viáveis na substituição do ágar como solidificante em cultura de tecidos, porém, a técnica mostrou-se mais demorada e com dificuldades de elaboração. Diferente do ágar, o qual quando misturado ao meio em temperatura elevada apresenta-se em estado líquido, o amido misturado à água, ou ainda combinado com ágar, apresenta-se muito consistente, o que dificulta as dosagens em para vertê-lo nos frascos. Além disso, conforme reduz a temperatura, ocorre à formação de grumos que também dificultam de forma significativa os procedimentos, implicando em maior tempo de manipulação.

No decorrer do experimento, observou-se que o meio de cultivo solidificado com amido ou amido e agar (Anexo B) mantiveram sua consistência, servindo como solidificante e suporte para as sementes (Figura

4). A redução na germinação em comparação ao experimento anterior possui, possivelmente, relação com a capacidade do meio em reter água e a relação deste evento com o fornecimento hídrico essencial à germinação das sementes. Caldas et al. (1998) citam que meios muito consistentes podem limitar a difusão de água e nutrientes para os explantes que estão sendo cultivados.

Erig et al. (2004) testaram a utilização de amido de milho e amido de mandioca, em diversas combinações com água e ágar, como solidificantes alternativos na multiplicação *in vitro* de *Malus domestica*. Os autores consideraram, do ponto de vista de multiplicação, a possibilidade de substituição do ágar por amido de milho, o qual se igualou-se ao ágar, como costuma ser utilizado na rotina laboratorial, em todos os aspectos referentes às variáveis que foram observadas.

Cultivos *in vitro* de anteras de cevada e tubérculos de batata apresentaram resultados satisfatórios quando se substituiu o solidificante do meio por amido. Porém, observar o aspecto físico do meio durante o decorrer dos experimentos é muito importante, já que algumas plantas liberam *in vitro* a enzima amilase, capaz de degradar o amido, gerando perda da consistência (CALDAS et al., 1998).

A vermiculita, associada a meio MS líquido e o meio MS solidificado com ágar, acrescido de carvão ativado (Anexo C), não mostraram diferenças significativas, levando-se em consideração a variável contaminação fúngica. Em contrapartida, observaram-se diferenças em relação às variáveis germinação (Tabela 5) e contaminação bacteriana (Tabela 6), as quais permitiram concluir sobre a utilização destes dois meios alternativos.

TABELA 5 – Análise da Variância para os tratamentos MS+Vermiculita e MS+Carvão ativado referentes à variável germinação onde se observa: causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F). Santa Maria, UFSM, 2007.

CV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	0,0245	0,0245	4,29*
Resíduo	38	0,2171	0,0057	
Total	39	0,2416		

\* teste F significativo com  $\alpha 0,05$

TABELA 6 – Análise da Variância para os tratamentos MS+Vermiculita e MS+Carvão ativado referentes à variável contaminação bacteriana onde se observa: causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F). Santa Maria, UFSM, 2006.

CV	GL	SQ	QM	Teste F
Tratamentos	1	0,0358	0,0358	21,04*
Resíduo	38	0,6388	0,0168	
Total	39	0,9926		

\* teste F significativo com  $\alpha 0,05$

A germinação em meio líquido contendo vermiculita com suporte para as sementes, foi superior estatisticamente a germinação em meio com ágar e carvão ativado (Figura 3). Além disso, é possível observar que, em relação aos experimentos *in vitro* anteriores, a maior média de germinação até o momento ocorreu em vermiculita com meio MS líquido. Esse fato deve-se à maior disponibilização de água do meio para a semente, proporcionando a embebição inicial necessária e, posteriormente, a ativação de metabólitos que auxiliarão na germinação. Meios líquidos podem não favorecer a respiração do explante sem a presença de um suporte. Nesse caso, a vermiculita serviu como suporte aos explantes.

A afirmativa do parágrafo anterior está de acordo com Caldas et al (1998), que relatam que meios sólidos são mais eficientes no fornecimento de sais para as plantas, tendo em vista que, em experimentos de cenoura utilizando meio líquido, percebeu-se um aumento na concentração de água e redução na concentração de sais em seus tecidos. Possivelmente, este fato tenha favorecido a germinação das sementes de *Pinus taeda*, já que sementes necessitam maior fornecimento de água em comparação à disponibilidade de sais para iniciar o processo germinativo. Caldas et al (1998) também citam que vermiculita promove maior aeração do meio e, por este motivo, favorece o enraizamento.

Testes de germinação com *Adenantha pavonina* demonstraram que o substrato de vermiculita ofereceu ótimas condições para os estudos de germinação da planta, comparando-se a outros citados, como papel filtro e algodão (FANTI e PEREZ, 1999).

Em relação à variável contaminação bacteriana, o meio líquido contendo vermiculita também foi superior ao meio MS com solidificante e carvão, o qual teve 33,31% de contaminação. Em todos os experimentos *in vitro*, até o

momento, não havia sido utilizada sacarose. Assim, pode-se concluir que a significativa incidência de bactérias tenha forte relação com a disponibilidade de carboidratos presentes no meio.

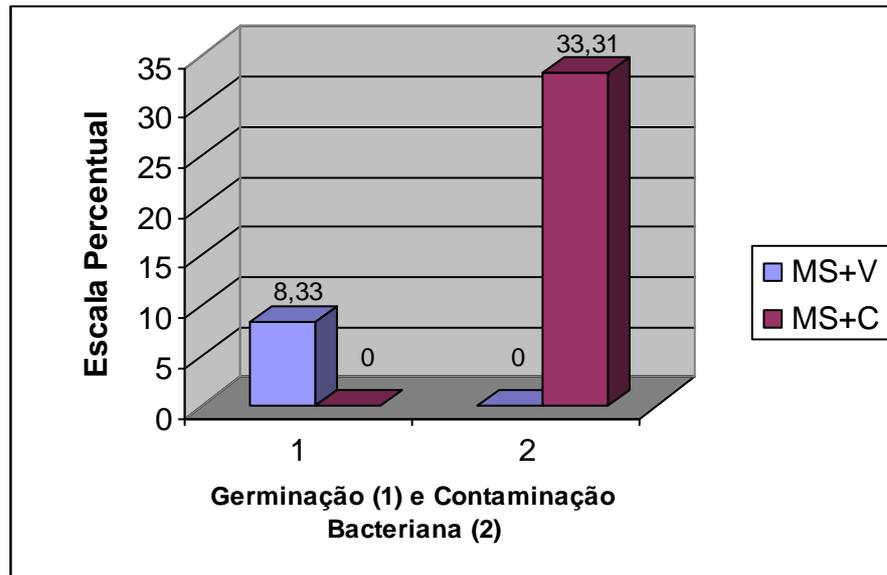


FIGURA 3 – Porcentagens de Germinação (1) e Contaminação Bacteriana (2) em Meio MS líquido tendo como suporte vermiculita (MS+V) e meio MS solidificado com ágar acrescido de carvão ativado (MS+C). Santa Maria, UFSM, 2007.

#### 5.4 Efeito de diferentes substratos no suprimento hídrico de sementes de *Pinus taeda* L. – Experimento VI

A utilização dos substratos papel filtro (PF), algodão hidrófilo (AH) e ágar-água (AA) permitiu a observação da capacidade de fornecimento hídrico destes para o condicionamento osmótico necessário à germinação de sementes de *P. taeda*. Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas em todos os tempos em que foram analisados (3, 6, 9, 24 e 48 horas), exceto quando atingiu 72 horas de contato das sementes com os respectivos substratos (Tabela 7). Os tempos de análise serviram como parâmetros para observação dos níveis de absorção de água durante o início do processo de germinação das sementes.

Após três horas de contato com os substratos, a maior porcentagem de ganho de massa (g) nas sementes, pela absorção de água, foi observada no

substrato papel filtro, sendo este superior estatisticamente ao substrato ágar-água, que apresentou a menor média. O meio de germinação algodão hidrófilo não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos testados, apresentando percentagem mais próxima ao tratamento de papel filtro.

Com percentagens de absorção de água muito semelhantes, algodão e papel filtro não diferiram estatisticamente quanto ao fornecimento hídrico às sementes, depois de decorridas seis horas. Ambos foram superiores ao tratamento ágar-água. A mesma expressão estatística é observada após terem decorrido nove horas de contato das sementes com os substratos.

Em 24 horas, papel filtro e algodão hidrófilo forneceram quantidades muito semelhantes de água para as sementes e são estatisticamente iguais, diferindo do tratamento ágar-água. Após 48 horas, ocorreu redução nas percentagens de fornecimento de água para as sementes pelo papel filtro. Este tratamento fica intermediário entre os demais, igualando-se estatisticamente a ambos. Já algodão hidrófilo mostra-se estatisticamente superior ao tratamento com ágar-água.

Quando as sementes atingem 72 horas de permanência nos substratos, observa-se que não ocorrem diferenças estatísticas quando ao suprimento hídrico oferecido a estas pelo substrato utilizado como meio de cultivo.

TABELA 7 – Quantidade percentual do aumento na massa de sementes de *Pinus taeda* L. pela absorção de água nos tempos 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas, nos substratos: papel filtro (PF), algodão hidrófilo (AH) e meio ágar-água (AA). Santa Maria-RS, UFSM, 2007.

<b>Aumento na Massa das Sementes (%) pela Absorção de Água</b>			
<b>Substrato</b>	<b>3 horas</b>	<b>6 horas</b>	<b>9 horas</b>
PF	22,87 a*	27,98 a	32,12 a
AH	18,99 a b	27,67 a	29,43 a
AA	11,27 b	17,59 b	20,06 b
CV (%)	20,3	15,57	14,71

<b>Aumento na Massa das Sementes (%) pela Absorção de Água</b>			
<b>Substrato</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
PF	31,63 a	29,39 a b	30,51 a
AH	30,09 a b	32,45 a	32,57 a
AA	21,08 b	22,54 b	24,36 a
CV (%)	16,05	15,31	15,63

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com base nos dados relatados e nas médias de absorção de água pelas sementes nos diferentes substratos, observadas na figura 7, pode-se dizer que papel filtro e algodão hidrófilo forneceram maior quantidade de água para as sementes, enquanto ágar-água apresentou o menor suprimento hídrico.

Analisando as linhas expressas no gráfico (Figura 4), observa-se que ocorre um aumento exponencial na massa das sementes nas primeiras horas de contato com os substratos, decorrente da absorção de água. Este permanece por um tempo, sofre estabilizações e, em alguns momentos, até mesmo reduz. Pode-se dizer, portanto, que as sementes absorvem inicialmente água em grande quantidade para iniciarem seu processo germinativo, de maneira praticamente osmótica e, após, quando são ativados metabólitos e rotas bioquímicas essenciais da germinação, além da respiração da semente, estas taxas de absorção tendem a diminuir.

Esse fato está de acordo com Borges e Rena (1993), os quais consideram a umidade é um fator imprescindível para a germinação, pois é com a absorção de água por embebição que se inicia este processo. As sementes devem alcançar um nível adequado de hidratação para que iniciar a reativação do seu metabolismo. Em geral, a embebição ocorre em três etapas. Na primeira um processo rápido e físico, onde não atuam inibidores metabólicos. A segunda etapa é uma fase estacionária na absorção, para que ocorra a terceira etapa, a qual é metabólica, mais lenta, prolongada e depende da temperatura e oxigênio (BORGES e RENA, 1993).

Pode-se inferir, portanto, que a última fase explicitada no gráfico refere-se à segunda etapa, na qual está ocorrendo a ativação de metabólitos que irão, posteriormente, promover a germinação.

Avaliações efetuadas, referentes à germinação após 21 dias de permanência das sementes no meio, apresentaram resultados estatisticamente significativos (Figura 5). Os substratos papel filtro e ágar-água não diferiram entre si, apresentando médias 74 e 76%, respectivamente. O meio algodão hidrófilo foi inferior, com média 22%. Embora o fornecimento de água por algodão seja, inicialmente, maior do que ágar-água, nestes outros meios a semente fica exposta a maior luminosidade, por permanecer na superfície, enquanto no algodão, essas se deslocaram durante os manuseios dos

experimentos, alojando-se entre o mesmo. Este fator pode ter alterado a germinação, considerando que sementes podem apresentar melhores resultados sob ou entre substrato, conforme se observa nas RAS (BRASIL, 1992).

Esse resultado difere dos testes de germinação em diferentes substratos realizados por Fanti e Perez (1999) onde, substratos de papel filtro, algodão e vermiculita, foram utilizados nos experimentos e resultaram em porcentagens elevadas e estatisticamente iguais na germinação de *Adenantha pavonina*.

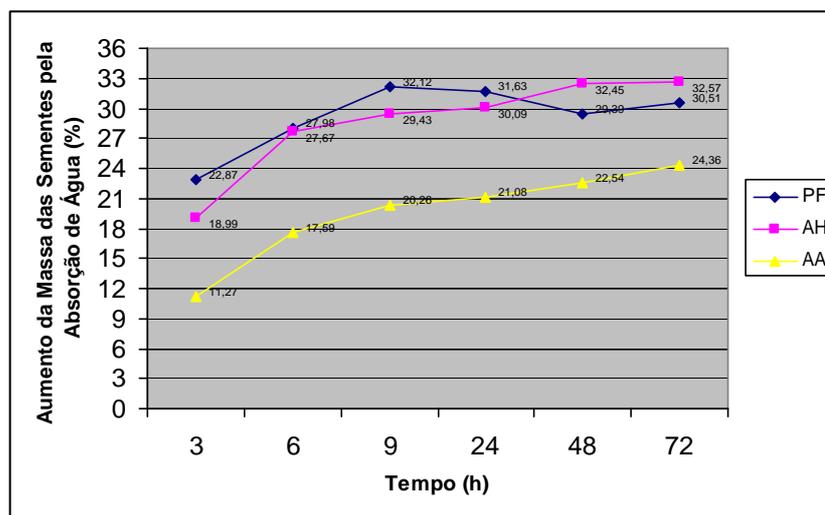


FIGURA 4 – Percentagens de aumento na massa das sementes de *Pinus taeda* L. devido à absorção de água nos substratos: papel filtro (PF), algodão hidrófilo (AH) e ágar-água (AA). Estes estão amostrados nos diferentes tempos de observação do experimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

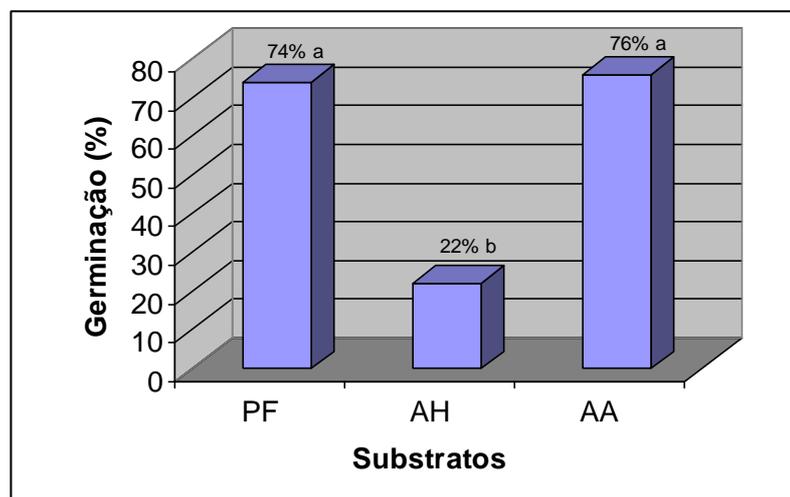


FIGURA 5 – Efeito dos tratamentos papel filtro (PF), algodão hidrófilo (AH) e ágar-água (AA) sobre a germinação de sementes de *Pinus taeda* L. após 21 dias. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

Porém, quanto à contaminação fúngica aos vinte um dias (Figura 6), os tratamentos papel filtro e algodão hidrófilo foram estatisticamente superiores ao tratamento ágar-água, que apresentou 100% de contaminação. Embora iguais estatisticamente, algodão hidrófilo apresentou média 0% de contaminação, o que permite a recomendação deste meio, caso seja necessário evitar a presença de fungos. É válido salientar, que nestes experimentos não houve desinfestação superficial das sementes, justamente para possibilitar uma análise mais eficaz quanto à inocuidade do meio aos patógenos.

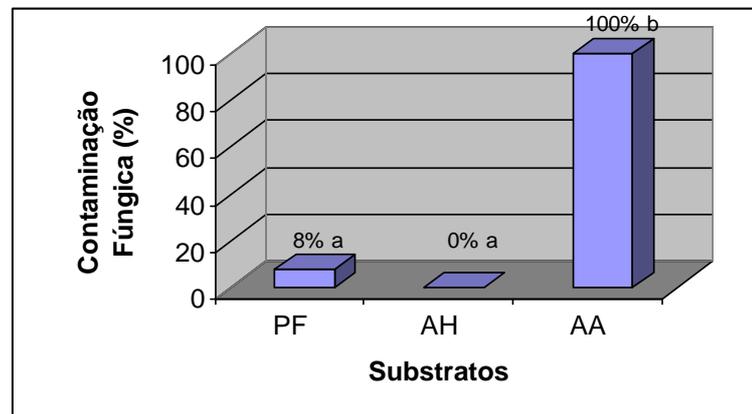


FIGURA 6 – Efeito dos diferentes substratos sobre a contaminação fúngica de sementes de *Pinus taeda* L. após 21 dias de inoculação em diferentes substratos. PF – papel filtro; AH – algodão hidrófilo, AA – ágar-água. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

### 5.5 Diferentes tempos de embebição como tratamentos pré-germinativos de sementes de *Pinus taeda* L. – Experimentos VII e VIII

Não houve diferenças estatísticas significativas para todas as variáveis, exceto contaminação fúngica, nos tempos de embebição 24, 48 e 72 horas se sementes de *Pinus taeda* L. seguidas de desinfestação antes da inoculação.

Neste caso, a variável contaminação fúngica apresentou comportamento quadrático, com máxima eficiência nas sementes que permaneceram embebidas durante 48 horas, as quais apresentaram contaminação fúngica 0% (Figura 7). A embebição por 24 horas ocasionou 4,35% de contaminações, enquanto que 72 horas, 8,69%.

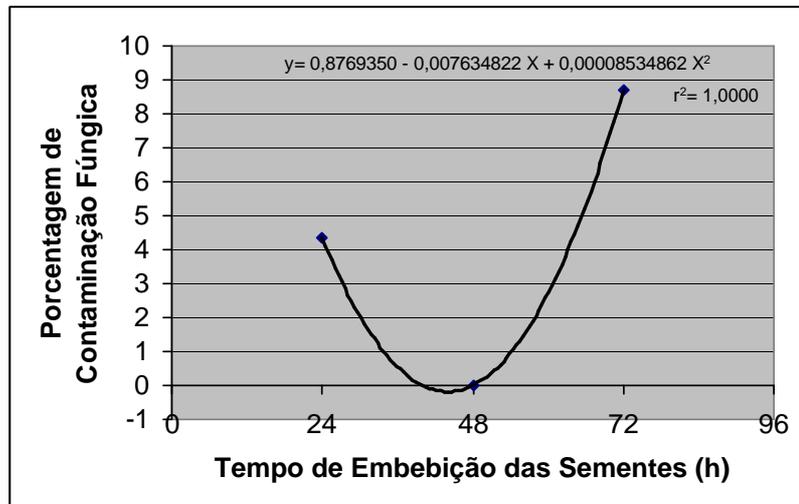


FIGURA 7 – Efeito dos diferentes tempos de embebição na contaminação fúngica de sementes de *Pinus taeda* L. que haviam passado por desinfestação prévia. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

Observou-se, porém, que sementes que foram embebidas e inoculadas no substrato de algodão hidrófilo sem sofrerem desinfestação prévia, mostraram porcentagens de germinação satisfatórias. Afirma-se, portanto, que hipoclorito de sódio (NaOCl), nas concentrações utilizadas e tempos de contato com as sementes, teve efeito fitotóxico. Em sementes de *Erechtites valerianaefolia* também ocorreu toxidez quando se utilizou para desinfestação hipoclorito de sódio, reduzindo a germinação ou aumentando o tempo para tal evento (ZAYAT e RANAL, 1997).

A embebição apresentou comportamento linear quanto à variável germinação aos sete dias (Figura 8). Observa-se que a maior média de germinação (41,66%) ocorreu quando as sementes permaneceram previamente embebidas durante 72 horas em água destilada. O gráfico de regressão demonstra que a equação encontrada teve bom ajuste aos dados, pois seu coeficiente de determinação é igual a 0,8300.

Utilizando o critério para germinação, considerando com tais, apenas plântulas que emitiram cotilédones e possuíam a partir de 3 cm de comprimento, também observou-se diferenças significativas aos sete dias. Esta variável mostrou comportamento linear (Figura 9), sendo a maior média obtida nas sementes que permaneceram em embebição durante 72 horas (18,33%). As sementes que não foram embebidas apresentaram média de 1,67% de emissão de cotilédones, seguidas de 9,99% (24h) e 13,33% (48h).

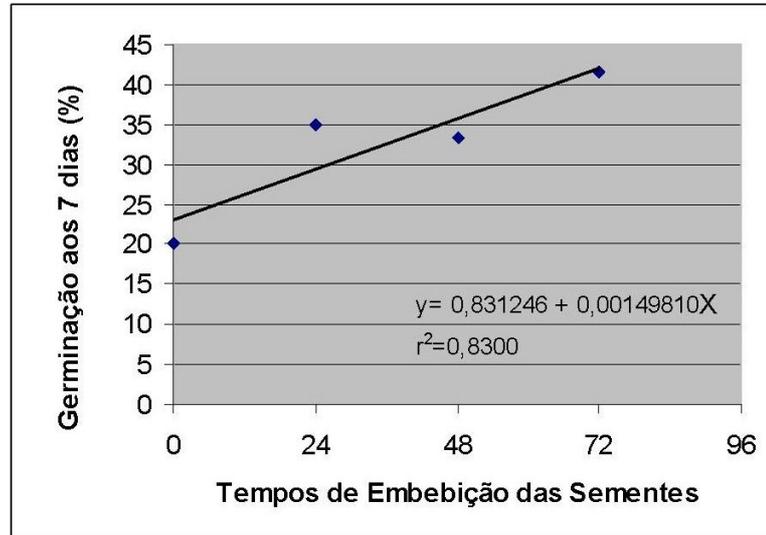


FIGURA 8 – Efeito dos diferentes tempos na embebição das sementes de *Pinus taeda* L. sobre a germinação aos 7 dias. Sementes não desinfestadas. Santa Maria-RS, UFSM, 2007.

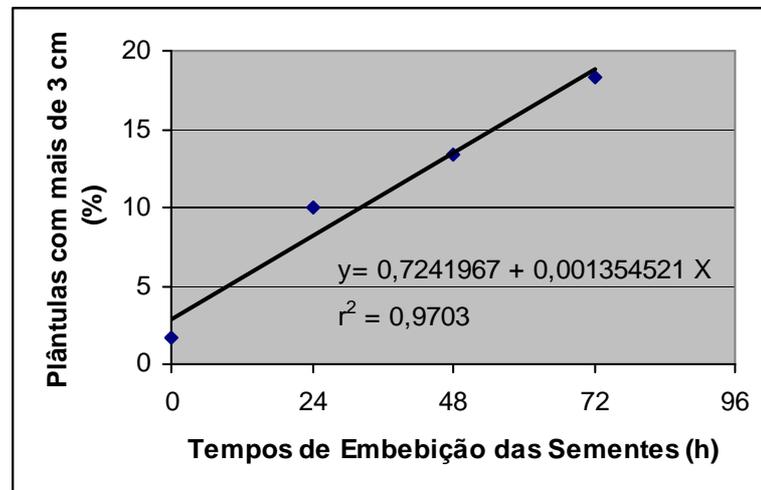


FIGURA 9 – Efeito dos diferentes tempos de embebição das sementes de *Pinus taeda* L. em relação à emissão de cotilédones (plântulas maiores de 3 cm) aos 7 dias. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

Não houve significância entre os diferentes tratamentos para germinação aos 14 dias. Porém, esses se mostraram significativos quanto à variável emissão de cotilédones (Figura 10), o que demonstra que este critério foi eficiente na melhor discriminação dos efeitos dos tratamentos. Com comportamento linear, a embebição das sementes mostrou sua máxima eficiência no tempo de 72 horas, onde apresentou a maior média de emissão de cotilédones, sendo esta 46,66%. A equação de regressão apresentada junto ao gráfico na Figura 10 teve bom ajuste aos dados, o que é demonstrado pelo seu coeficiente de determinação (0,9159).

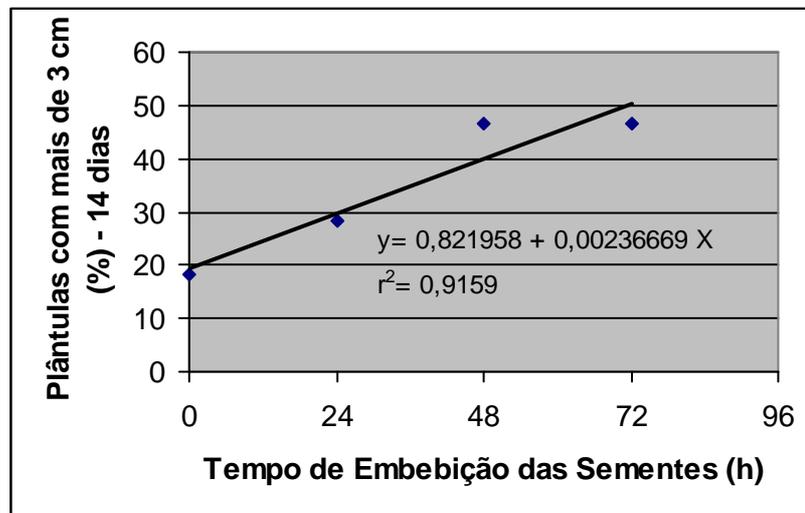


FIGURA 10 – Efeito dos diferentes tempos de embebição das sementes de *Pinus taeda* L. em relação à emissão de cotilédones (plântulas maiores de 3 cm) aos 14 dias de cultivo. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

A germinação aos vinte e um dias também não se mostrou como um critério eficiente para a determinação do melhor tratamento. Em contrapartida, a emissão de cotilédones mostrou-se mais uma vez superior no fornecimento de informações referentes à velocidade da germinação, sendo eficaz. A regressão linear (Figura 11) mostrou a máxima eficiência quando houve embebição por 72 horas, com média de plantas germinadas que haviam emitido cotilédones e possuíam altura superior a 3 cm de 56,33%, não sendo encontradas plântulas anormais. Houve bom ajuste dos dados a equação, com coeficiente de determinação 0,9162.

Também após 21 dias, comportou-se linearmente (Figura 12) a contaminação fúngica. O melhor tempo de embebição, o qual proporcionou as menores taxas de contaminação foi 0, sendo 72 horas o tempo onde observou-se maiores índices de contaminação. A equação também mostrou bom ajuste, com coeficiente de determinação 0,9032.

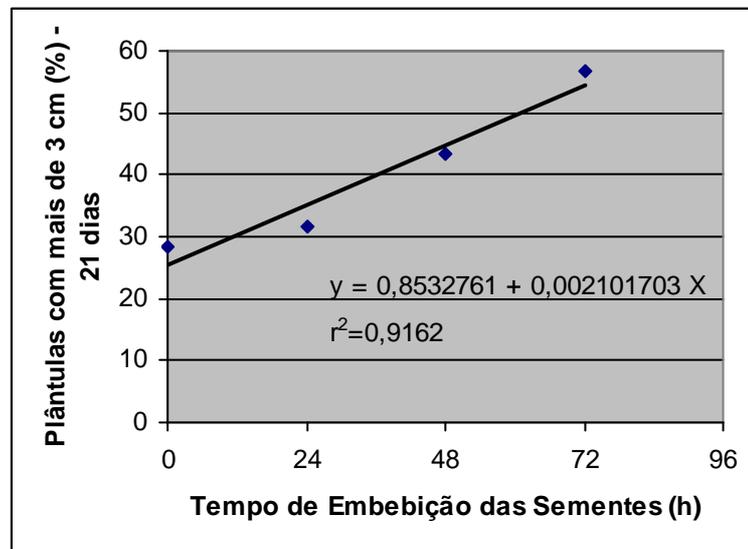


FIGURA 11 – Efeito dos diferentes tempos de embebição sobre a emissão de cotilédones, considerando plântulas maiores que 3 centímetros, de sementes de *Pinus taeda* L. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

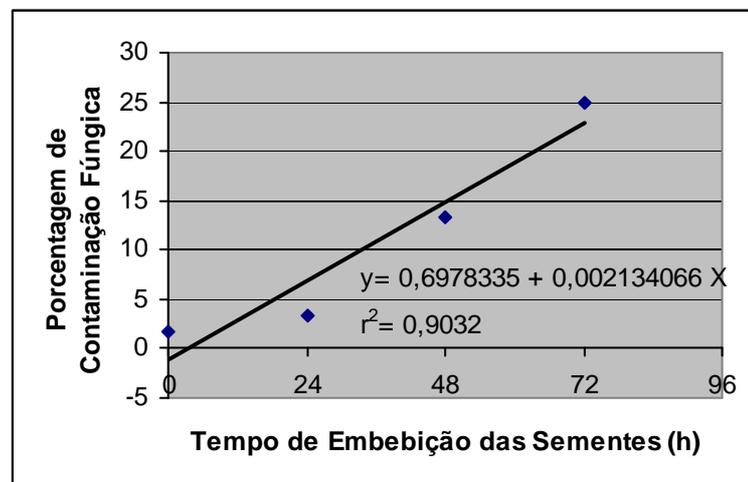


FIGURA 12 – Efeito dos diferentes tempos de embebição sobre a contaminação fúngica de sementes de *Pinus taeda* L. Sementes não desinfestadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

Durante as últimas avaliações do experimento, alguns problemas ligados à climatização da sala de cultivo fizeram com que houvesse uma elevação significativa da temperatura, prejudicando as plântulas *in vitro*. Porém, observou-se que o grau de injúria não se comportou igualmente em todas as plantas. Assim, os dados foram computados e submetidos à análise de variância e regressão polinomial sendo que, através destas análises, verificou-se a influência da embebição na fragilidade das plântulas.

Essa variável teve comportamento cúbico (Figura 13). O tempo 0 de embebição mostrou a máxima eficiência nesta variável, sendo as plântulas

originadas deste tratamento mais resistentes a temperaturas extremas. O tempo 24 horas mostrou-se como mínima eficiência, tendo o maior número de plantas injuriadas pela temperatura. Este fato pode ser explicado pelo excesso de água nas plântulas. Aquelas que possuíam maior índice de água em seus tecidos, fornecido pelo excesso durante a embebição, tornaram-se mais frágeis. Tempos maiores a 24 horas de embebição também apresentaram plântulas injuriadas, porém, em menor quantidade. Possivelmente, por que nestes tempos há uma diminuição da embebição natural das sementes, pelo início da segunda fase de germinação, já relatada, o que pode ser observado através da comparação de índices de água da figura 14.

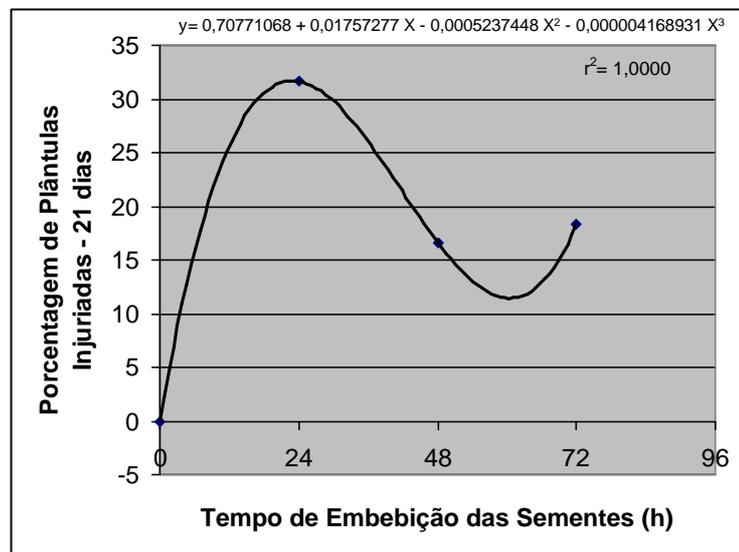


FIGURA 13 – Efeito dos diferentes tempos de embebição quanto a ocorrência de injúrias nas plântulas de *P. taeda* L. Santa Maria-RS, UFSM, 2007.

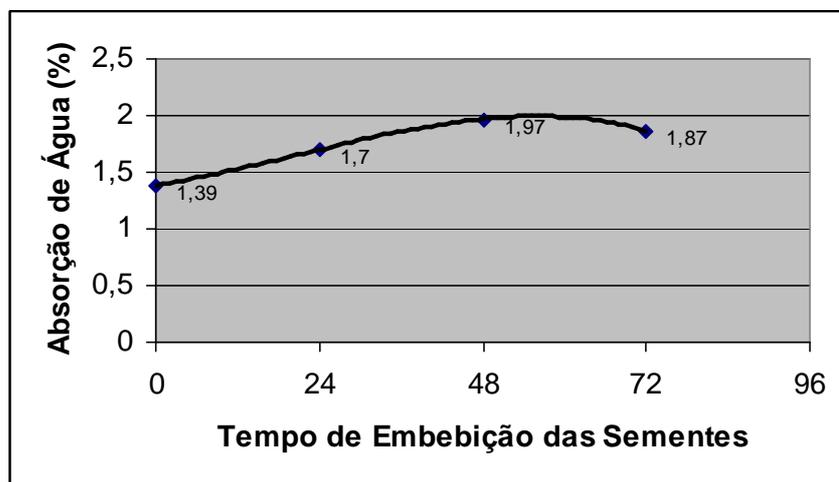


FIGURA 14 – Absorção de água em relação à massa das sementes de *Pinus taeda* L. durante os tempos de embebição 0, 24, 48 e 72 horas. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

Por fim, pode-se dizer que os tratamentos pré-germinativos de embebição solucionaram o problema de germinação em algodão hidrófilo, bem como aceleraram o processo. Dentre os fatores que podem auxiliar neste processo, estão a embebição mais rápida e posterior ativação metabólica das sementes (BORGES e RENA, 1993). Franco e Ferreira (2002) observaram que a embebição em sementes em água destilada por 30 minutos e em água e álcool resultaram em condições adequadas do tegumento para facilitar a germinação.

Tratamentos pré-germinativos em *Ormosia nitida* melhoraram significativamente a absorção de água para germinação (LOPES et al., 2006). A embebição das sementes de *Passiflora edulis* também apresentou os melhores resultados germinativos após passarem por tratamento de 48 horas de embebição (RIBAS e AYUB, 2001).

## **5.6 Pré-estabelecimento *in vitro* de *Pinus taeda* L. – Experimento IX**

O experimento de seleção de meios para o estabelecimento *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de nós cotiledonares (Anexo D) como fonte de explantes, apresentou altas taxas de contaminação, o que impediu sua análise por mais de 40 dias. Além disso, as contaminações prejudicaram o desenvolvimento dos explantes e interferiram na confiabilidade do experimento, o que se observa pelo coeficiente de determinação em porcentagem ter sido muito alto (33,97).

Estatisticamente, não ocorreram diferenças entre os meios testados para a variável formação de brotos. Todos os explantes apresentaram formação de um broto, apenas. Quanto ao comprimento dos brotos, também não ocorreram diferenças estatísticas. As médias encontradas foram 0,31 cm para MS, 0,53 cm para WPW e 0,71 cm para meio MS. Porém, houve grande variação nos comprimentos dos brotos, entre 0,1 e 3,5 cm, a qual também foi expressa no alto CV encontrado no experimento.

Bassan et al. (2006) utilizaram ápices caulinares obtidos através de nós cotiledonares de *Peltophorum dubium* (canafístula) em experimentos de estabelecimento *in vitro* onde foram testados os meios MS e WPM. Observou-se que o meio MS foi mais eficiente no estabelecimento *in vitro* desta essência florestal.

Mantovani e Franco (1998) relatam que o meio WPM é costumeiramente utilizado em cultura de tecidos de espécies lenhosas, pois possui quantidades de sais minerais balanceadas para estas plantas. Porém, o meio MS e diluições deste têm apresentado diversos resultados positivos em experimentos de cultivo *in vitro*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

### Quanto aos testes de vigor

É válido salientar que, segundo as RAS (BRASIL, 1992), as sementes de *Pinus taeda* L. devem permanecer incubadas em Gerbox por sete dias, para então ser feita a primeira contagem de germinação e, após, permanecem até completar 28 dias de incubação para a realização da análise das variáveis mencionadas. Porém, percebeu-se que, dois problemas necessitam de maior atenção. O primeiro refere-se ao excesso de contaminações fúngicas, o que pode ocorrer durante o desenvolvimento dos experimentos e, possivelmente, diminuir a precisão do mesmo pelas dificuldades das contagens e classificação de plântulas quanto ao seu desenvolvimento. Isso foi percebido ao se deixar as sementes apenas para germinarem na mesma época em que estavam sendo realizados os testes de vigor. Dessa forma, a realização de cuidados especiais, semelhantes aos utilizados, como incubação em fluxo e esterilização dos materiais utilizados, podem tornar o teste mais eficiente. O segundo refere-se à classificação das plântulas segundo os critérios utilizados como variáveis. Observou-se que, com aproximadamente 35 dias, algumas das plântulas que foram previamente classificadas como anormais, por possuírem apenas determinados órgãos ou más características de formação, ou então plântulas classificadas como normais fracas, apresentavam-se com caracteres mais desenvolvidos, mas ainda assim, diferenciavam-se de outras. Dessa forma, um aumento de sete dias nos testes de vigor de sementes de *Pinus taeda* L. poderia melhorar as informações obtidas através do mesmo.

## Quanto ao estabelecimento *in vitro*

No decorrer dos experimentos, as dificuldades iniciais de germinação das sementes em meio de cultura não propiciaram grande número de fontes de explantes para a realização rápida de experimentos de desenvolvimento e multiplicação *in vitro*.

Porém, para via de ensaios prévios, diferentes regiões dos materiais germinados foram inoculadas em meio de sais minerais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) para observar-se o comportamento da planta *in vitro*.

Com exceção dos nós cotiledonares, todos os demais órgãos (cotilédones, segmentos caulinares e raízes), após 15 dias, apresentaram-se oxidados, desidratados ou, simplesmente, não desenvolvidos.

Em contrapartida, os nós cotiledonares não apresentaram contaminações, possuíam coloração verde e brotações iniciais na região do nó (inserção do caule e cotilédones).

Após 35 dias, foi possível observar o estabelecimento destas plantas, as quais apresentavam desenvolvimento de acículas e em algumas, observava-se brotações (Anexo E). Com 65 dias, havia um significativo aumento do desenvolvimento desta plantas e do número de brotos emitidos (Anexo F).

Observa-se também a formação de calos na base dos explantes, mesmo sem a utilização de reguladores de crescimento (Anexo G). A fragmentação de brotações e inoculação em meio MS para subsequente subcultivo mostrou-se viável quando se utilizam brotos bem desenvolvidos. A utilização de brotações muito jovens resulta na oxidação e não estabelecimento *in vitro* da planta.

Grattapaglia e Machado (1998) relatam que, de maneira geral, a multiplicação *in vitro* utiliza citocininas ou combinações destas com auxinas e, a formação de calos está ligada a balanços entre estes reguladores ou apenas presença de auxinas. Nos experimentos com *Pinus taeda* L. estas duas condições ocorreram sem a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos a partir dos experimentos realizados pode-se concluir que:

- a análise de sanidade é um método eficiente na seleção de lotes de sementes que servirão como fontes de explantes para o cultivo *in vitro* de *Pinus taeda* L.;
- os testes de vigor, baseados no desempenho de plântulas, são eficientes na discriminação dos lotes de sementes, sendo as variáveis plântulas anormais, plântulas normais fortes, comprimento (cm), peso fresco (g) e peso seco (g) de plântulas normais fortes os critérios que mais distinguem os lotes de *Pinus taeda* L.;
- nos lotes testados, os fungos mais representativos pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*;
- hipoclorito de sódio nas concentrações utilizadas tem efeito tóxico sobre as sementes de *Pinus taeda* L., inibindo a germinação;
- a substituição de ágar pelos solidificantes ágar+amido e amido não favorecem a germinação das sementes, mas servem como substituto ao ágar convencional apresentando boa característica de geleificação;
- papel filtro e algodão fornecem mais água para as sementes no período inicial de embebição;
- papel filtro e ágar-água são eficientes na germinação de sementes em comparação a algodão hidrófilo, se não houver tratamentos pré-germinativos;

- a embebição de sementes em água por 72 horas pode ser utilizada como tratamento pré-germinativo, favorecendo a germinação e velocidade de emergência de plântulas;
- a emissão de cotilédones, como variável para avaliar a germinação, apresenta melhores resultados para esta finalidade e também para a velocidade de germinação e desenvolvimento de plantas;
- plântulas *in vitro* apresentam bom estabelecimento, quando originadas a partir de nós cotiledonares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEAS. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior. **Ciência e Tecnologia de Sementes**. Curso de Especialização por Tutoria à Distância. Brasília: ABEAS, 1998. 51 p.
- ABIMCI. Associação Brasileira da Indústria de Madeira Processada Mecanicamente. **Madeira processada mecanicamente** – estudo setorial. Curitiba: ABIMCI, 2001, p. 27.
- AHRENS, S. A concepção de regime de manejo para plantações de *Pinus* spp. no Brasil. **Revista Espaço Florestal**, v.1, n.2, p.37-43, set. 1985.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa: Editora da UFV, 2004. 442 p.
- ALVES, E.U. et al. Influência do tamanho e da procedência de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. sobre a germinação e vigor. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 877-855, 2005.
- AMMIRATO, P.V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: BHOJWANI, S.S. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. New York: Cambridge University Press, 1986. p. 23-45.
- AOSA. Association of Official Seed Analysis. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln: AOSA, 1983. 93 p.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-296.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores cultivadas no sul do Brasil**: guia de identificação e interesse paisagístico das principais espécies exóticas. Porto Alegre: Serafinense, 2004. 205 p.
- BASSAN, J.S.; REINIGER, L.R.S.; ROCHA, B.H.G.; SEVERO, C.R.P.; FLÔRES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1. p. 365-392.

BIANCHETTI, A. Tecnologia de sementes de essências florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 3, n. 3, p. 27-46, 1981.

BITENCOURT, L.F.; HOMECHIN, M. Avaliação da qualidade sanitária de sementes de Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz – Flacourtiaceae) por três métodos de incubação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 233-236, 1998.

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes: In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Abrates, 1993. p. 83-135.

BORGES, E.E.L.; SILVA, L.F.; BORGES, R.C.G. Avaliação do osmocondicionamento na germinação de sementes de quaresminha (*Miconia candolleana* Triana.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 90-94, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BURNS, A.B.; SCHWARZ, O.J.; SCHLARBAUM, S.E. Multiple shoot production from seedling explants of slash pine (*Pinus elliottii*, Engelm.). **Plant Cell Reports**, p. 439-443, 1991.

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

CAMPANHOLA, C. **Entrevista**. 1 de fevereiro de 2005. Disponível em: <<http://www.celuloseonline.com.br/colunista/colunista.asp?IDAssuntoMateria=113eiditem=996>>. Acesso em: 12 jun. 2005.

CARNEIRO, J.S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. **Patologia de sementes**. Campinas: Abrates/Cargil, 1987. p. 386-394.

CARVALHO, N.M. O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Unesp/Fuvest, 1994. p.1-30.

DAVID, A.C.; FARIA, J.M.R.; OLIVEIRA, L.M. Quebra de dormância em sementes de candiúva (*Trema micrantha* (L.) Blume – Ulmaceae). In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1993, Curitiba. **Anais....** Curitiba: SBEF, 1993. p. 463-471

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 1-13.

DINGRA, O.D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. 502 p.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cambridge University Press, 1995. 256p.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C. Multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Galaxy: meio de cultura e agentes solidificantes alternativos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 3, p. 297-302, jul./set., 2004.

ESTAT – 2.0. **Sistema de Análise Estatística**. Jaboticabal: Pólo Computacional – Departamento de Ciências Exatas – Unesp, 1994.

FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G.A. Influência do substrato e do envelhecimento acelerado na germinação de olho-de-dragão (*Adenanthera pavonina* L. – Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p. 135-141, 1999.

FERRARI, M.P. **Beneficiamento e armazenamento de sementes de algumas espécies de *Pinus***. Colombo: Embrapa Floresta, 2003. 4 p. (Documento 69)

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 21-43.

FIGLIOLIA, M.B.; OLIVEIRA, E.C.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Análise de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Abrates, 1993. p.137-174.

FILHO, O.A.L. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. **Patologia de sementes**. Campinas: Abrates/Cargil, 1987. p. 276-299.

FRANCO, E.H.; FERREIRA, A.G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. Et Planch. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2002.

GAMBORG, O.L.; PHILLIPS, G.C. Laboratory facilities, operation, and management. In: GAMBORG, O.L.; PHILLIPS, G.C. **Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods**. New York: Springer-Verlag, 1995. p.3-42.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON. P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley, 1984.

GOLLE, D.P. et al. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Pinus taeda* L. visando o cultivo *in vitro*. IV SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, 4. Piracicaba. **Anais...**, Piracicaba: ESALQ, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa –SNPH, 1998. p.183-260. v. 1.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. **Doenças da erva-mate: identificação e controle**. Colombo, PR: Embrapa-CNPq, 1996. 23p.

HANDLEY, L.W.; et al. Research and development of commercial tissue culture system in loblolly pine. **Tappi Journal**, v. 78, n. 5, p.169-75, 1995.

HARRY, I.S.; THORPE, T.A. Regeneration of plantlets through organogenesis from matures embryos of jack pine. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.37, p.159-164, 1994.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. **Handbook of vigor test methods**. Zurich: ISTA, 1995. 177 p.

IPEF. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **Ciência e tecnologia no setor florestal brasileiro**: diagnóstico, prioridades e modelo de financiamento – Relatório Final. Piracicaba: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2002.

JAIN, S.M. Biotechnology of industrially important tree species in developing countries. In: WATANABE, K.N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity**. Austin: Academic Press, 1997. p. 227-238.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. v. 2. p. 519-531.

LASCA, C.C. Diagnóstico da patologia de sementes de essências florestais no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v.7, n.1, p. 55-56, 1985.

LI, X.Y.; HUANG, F.H. Induction of somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** v. 32, p. 129-135, 1996.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montains laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v. 30, p. 327-421, 1981.

LOPES, J.C.; DIAS, P.C.; MACEDO, C.M.P. Tratamentos para acelerar a germinação e reduzir a deteriorização das sementes de *Osmosia nitida* VOG. **Revista Árvore**, v. 30, n. 2, p. 171-177, 2006.

LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil**: madeireiras, ornamentais e aromáticas. São Paulo: Nova Odessa/Instituto Plantarum, 2003. 368p.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Lavras, Editora da UFLA, 1988. 106p.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM/CEPEF, 1998.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das gimnospermas**. Santa Maria: UFSM, 1996. 158 p.

MARCOS FILHO, J.M. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIERIA, R.D.; NETO, J.B.F. **Vigor de sementes**: conceitos e aplicações. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1.1-1.21.

- McKELLAR, D.S.; HERMAN, B.; WATT, M.P. Towards a Protocol for the Micropropagation of *Pinus patula*. **Suid-Afrikaanse Bosboutydskrif**, n. 171, 1994.
- MENTÉN, J.O.M. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. 321 p.
- MIROV, N.T. **The Genus Pinus**. New York: The Ronal Press Company, 1967. 602p.
- MUNIZ, M.F.B.; et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 144-149, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIERIA, R.D.; NETO, J.B.F. **Vigor de sementes**: Conceitos e Aplicações. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.2-2.24.
- NASCIMENTO, W.M.O.; et al. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 149-153, 2006.
- NOGUEIRA, C.N. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência agrotécnica**, v.28, n.5, p. 1053-1059, set./out., 2004.
- PARANJOTHY, K. et al. Clonal multiplication of woody perennials. In: BHOJWANI, S.S. **Plant tissue culture**: applications and limitations. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 190-219.
- PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; SOMMER, H.E. Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliotii* (Engelm.) embryos cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 11, p. 25-35, 1987.
- PIZZINATTO, M.A. *Fusarium* spp. em sementes de algodão. In: MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: Esalq/Fealq, 1991. p. 83-113.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.
- PULLMAN, G.S.; NAMJOSHI, K.; ZHANG, Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. **Plant Cell Reports**, p. 85-95, 2003.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

RIBAS, A.F.; AYUB, R.A. Estudos sobre a cultura de tecidos do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa DEG.). **Scientia Agrária**, v. 2, Resumos de Dissertações e Teses, 2001.

ROSSETO, C.A.V. Estudos sobre a absorção de água e o desempenho de sementes de soja. 1995, 144 f. Tese (**Doutorado em Agronomia**) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba 1995.

SANTOS, A.F.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**. 30 (1/2), 2000. p.119-128

SANTOS, C.M.; PENNA, J.C.V.; FREITAS, F.C.; SANTOS, V.L.M. Potencial germinativo de sementes de algodão coletadas em diferentes épocas e submetidas ao deslincamento químico e tamento com fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 104-107, 1998.

SANTOS, F.E.M.; SOBROSA, R.C.; COSTA, I.F.D.; CORDER, M.P.M. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acácia mearnsii* De Wild). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 1, p. 13-20, 2001.

SELLE, G.L.; SCHNEIDER, P.R.; FINGER, C.A.G. Classificação de sítio para *Pinus taeda* L. através da altura dominante, para a região de Cambará do Sul, RS, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 4, n.1, p. 77-95, 1994.

SEN, S.; MAGALLANES-CEDENO, M.E.; KAMPS, R.H. *In vitro* micropropagation of Afghan pine. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 24, n. 6, p. 1248-52, 1994.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2001. p. 25-74.

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**. (2000) 19: 511-518. Springer-Verlag, 2000.

SHIMIZU, J.Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. **Revista Madeira**, n. 38, ano 14, ago., 2004. Disponível em: <<http://www.remade.com.br>> Acesso em: 07 dez. 2006.

SMIDERLE, O.J.; MOURÃO JUNIOR, M.; SOUZA, R.C.P. Tratamentos pré-germinativos em sementes de acácia. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 27, n. 1, p. 78-85, 2005.

STOJIEIĆ, D.; BUDIMIR, S.; CULAFIĆ, L. Micropropagation of *Pinus heldreichii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.59, p.147-150, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília, DF: Embrapa – Cenargen. Disponível em: <<http://www.redbio.org/.../simposios.pdf>> Acesso em: 10 set., 2004.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 182 p.

THORPE, T.A. The current status of plant tissue culture. In: BHOJWANI, S.S. **Plant tissue culture: applications and limitations**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 1-33.

TORRES, A.C. et al. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 2001. 20 p.

TUOTO, M. **Entrevista**. 2 de abril de 2003. Disponível em: <<http://www.celuloseonline.com.br>>. Acesso em: 12 jun., 2005.

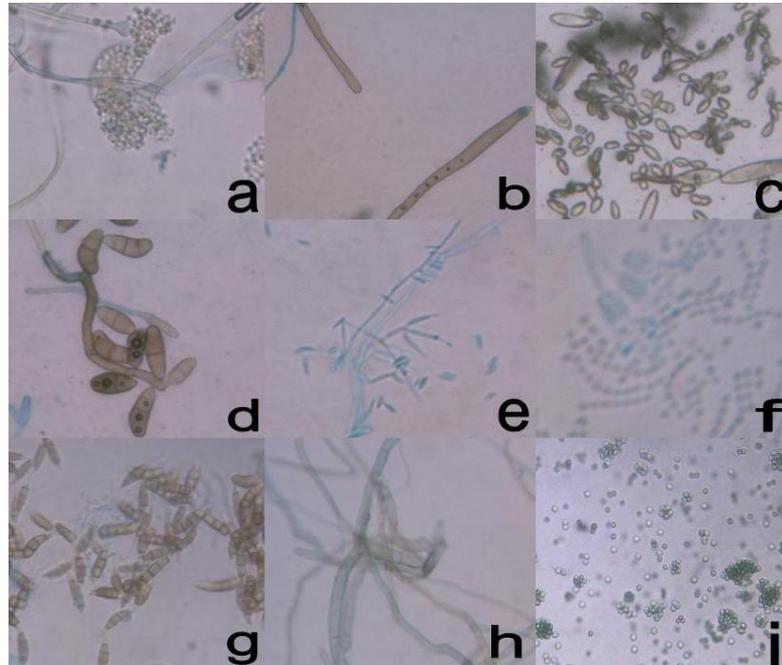
WATAI, L.T. Substituição de espécies de madeira nativas por madeiras de reflorestamento. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6. Campos do Jordão, 1990. **Anais...** p. 131-133. São Paulo: SBS, SBEF, v.1, São Paulo, 1990.

WATANABE, K.N.; RAMAN, K.V. Plant biotechnology and plant genetic resources: a global perspective. In: WATANABE, K.N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity**. Austin, Texas, U.S.A.: Academic press, 1997. p. 1-13.

WERBROUCK, S.P.O.; DEBERGH, P.C. Applied aspects of plant regeneration: Micropropagation. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1994. p. 127-145.

ZAYAT, A.G.; RANAL, M.A. Germinação de sementes de capivova. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 11, 1997. 80 p.

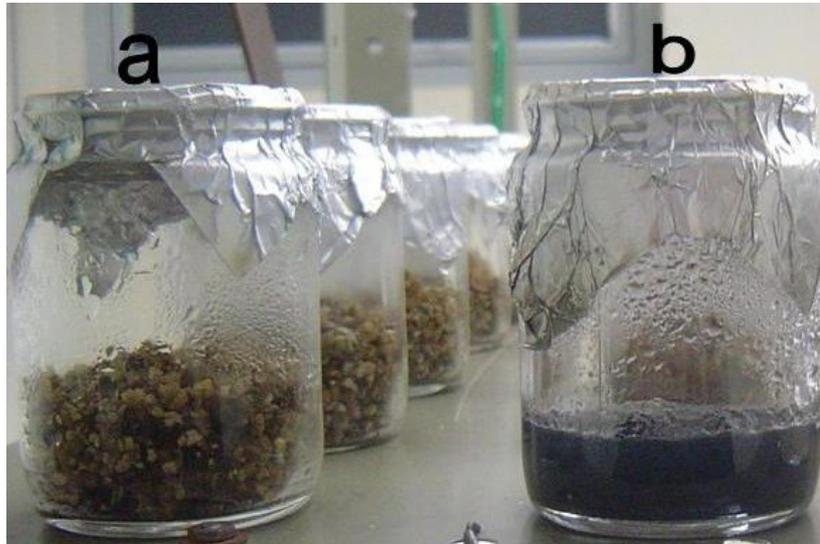
## **ANEXOS**



Anexo A – Principais gêneros fúngicos nos lotes Celucat-1<sup>a</sup>G, Igaras-1<sup>a</sup>G e Igaras-2<sup>a</sup>G de sementes de *Pinus taeda* L. sendo: *Aspergillus* (a), *Cercospora* (b), *Cladosporium* (c), *Curvularia* (d), *Fusarium* (e), *Penicillium* (f), *Pestalotia* (g), *Rhizoctonia* (h) e *Trichoderma* (i). Santa Maria-RS, UFSM, 2007.



Anexo B – Aspecto geral dos meios de cultura onde houve substituição do ágar como agente solidificante por amido de milho e amido de milho combinado com ágar. Santa Maria-RS, UFSM, 2007.



Anexo C – Aspecto dos meios de cultura: a – MS líquido+Vermiculita; b- MS solidificado com ágar acrescido de carvão ativado. Santa Maria, RS, UFSM, 2007.



Anexo D – Aspecto dos nós cotiledonares utilizados como fonte de explantes para a cultura de tecidos de *Pinus taeda* L. Santa Maria-RS, UFSM, 2006.



Anexo E – Aspecto geral de plantas de *Pinus taeda* L. obtido a partir de nós cotiledonares como fontes de explantes após 35 dias de inoculação em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Santa Maria, RS, UFSM, 2007.



Anexo F – Aspecto geral de plantas de *Pinus taeda* L. obtidas a partir de nós cotiledonares como fontes de explantes após 65 dias de inoculação em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Santa Maria, RS, UFSM, 2007



Anexo G – Formação de calo na base do caule de plantas de *Pinus taeda* L. obtidas a partir de nós cotiledonares como fontes de explantes após 65 dias de inoculação em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Santa Maria, RS, UFSM, 2007.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.