

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEGMENTOS CAULINARES DE ARAUCÁRIA (*Araucaria angustifolia*)

Mariane de Oliveira Pereira^{1*}; Marcio Carlos Navroski²; Lia Rejane Silveira Reiniger³; Debora da Silva Teixeira⁴; Francieli De Fatima Missio⁵; Erasmo Luis Tonett⁶

SAP 7845 Data envio: 14/03/2013 Data do aceite: 24/10/2013
Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471
Marechal Cândido Rondon, v. 13, n. 4, out./dez., p. 303-309, 2014

RESUMO - A araucária ou pinheiro-brasileiro é uma espécie de alto valor econômico, madeireiro, resinífero e alimentar. Pode ser propagada via semente, porém possui problemas em virtude da baixa viabilidade. A micropropagação pode ser uma alternativa para a produção de mudas. Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de *A. angustifolia* coletados em diferentes posições da muda, mantidos em diferentes meios de cultura e suas diluições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se o esquema bifatorial (3 x 4), três posições de coleta na muda x quatro concentrações dos meios nutritivos 100% MS; ½ MS; 100% WPM e ½ WPM. Utilizaram-se seis repetições de cinco explantes cada. Após 60 dias de cultivo *in vitro* avaliaram-se a porcentagem de estabelecimento das plântulas, contaminação e formação de calos, além do número de brotos/explante e comprimento das brotações formadas. A formação de calos foi menor com o uso do meio nutritivo 100% MS e ½ MS. Observou-se maior formação de brotações e maior comprimento de brotações com a utilização de explantes coletados da posição basal. O estabelecimento *in vitro* de araucária a partir de explantes de origem seminal tem maior sucesso quando se faz uso de meio nutritivo adequado e observando-se a posição de coleta na muda.

Palavras-chave: Araucariaceae, cultura de tecidos, micropropagação, pinheiro-brasileiro, silvicultura de nativas.

In vitro establishment of araucaria (*Araucaria angustifolia*) stem segments

ABSTRACT - The Araucaria or Brazilian pine is specie of high economic, timber, and food values. It can be propagated by seed, but there are problems because of its low viability. Micropropagation can be an alternative for the production of seedlings. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* establishment of stem segments of *A. angustifolia* collected in different positions of switches, maintained in different culture media and their dilutions. The experimental design was randomized using a factorial (3 x 4) scheme, three positions in the collection changes x four concentrations of nutrient media: 100% MS, ½ MS, 100% WPM and ½ WPM. Six replicates were used with five plants each. After 60 days of *in vitro* were evaluated the percentage of seedling establishment, contamination and callus formation, and the number of shoots / explant and length of shoots. Callus formation was lower with the use of medium 100% MS and ½ MS. We observed increased formation of shoots and shoots length with the use of explants collected from the basal position. The *in vitro* establishment of Araucaria from explants of seminal origin is most successful when it makes use of suitable nutrient medium and observing the position of the collection changes.

Key words: Araucariaceae, tissue culture, micropropagation, Brazilian pine, native forestry.

¹ Eng^a Florestal, Mestre em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba/PR. maripereira.florestal@gmail.com. *Autor para correspondência

² Eng^a Florestal, Dr., Professor da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. E-mail: navroski@cav.udesc.br

³ Eng^a Agrônoma, Dra., Professora da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. E-mail: liarejanasilveirareiniger@yahoo.com.br

⁴ Eng^a Florestal, Mestranda em Eng. Florestal da UFSM. E-mail: dehbora_teixeira@hotmail.com

⁵ Eng^a Florestal, Mestranda em Eng. Florestal da UDESC. E-mail: franmissio@yahoo.com.br

⁶ Estudante de Eng. Florestal da UDESC. E-mail: erasmo.l@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze (Araucariaceae) é uma das mais importantes essências florestais do Sul do Brasil e uma das coníferas mais valiosas de ocorrência natural no país. A espécie está inserida no domínio da Mata Atlântica, classificada como Floresta Ombrófila Mista, e tem grande importância econômica e ecológica (MATTOS, 1994).

Por se tratar de uma espécie de alto valor econômico, madeireiro, resinífero e alimentar, ao longo dos anos houve uma progressiva exploração das populações naturais (EIRA et al., 1994). A espécie foi incluída na lista brasileira de espécies ameaçadas, na categoria em perigo de extinção (BRASIL, 2008) e em perigo crítico de extinção segundo a International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2013). Durante a maior parte do século XX, *A. angustifolia* foi a espécie lenhosa mais importante do Sul do Brasil. Nas últimas décadas, a demasiada exploração de sua madeira causou uma redução drástica das populações naturais, restando cerca de 2%-4% da população original (ASTARITA et al., 2003).

Outro fator que vem contribuindo para a vulnerabilidade da espécie é a curta longevidade natural das sementes, com perda total de viabilidade em até um ano após a coleta (DAVID; SILOCHI, 2010). Além disso, a regeneração natural da araucária pode ser comprometida devido à predação dos pinhões pela avifauna e por roedores e primatas (LORENZI, 1992).

Para a maioria das espécies do gênero *Araucaria*, os métodos de propagação convencional são lentos, considerando que a propagação vegetativa por estaquia é difícil devido à topófitose, além da dificuldade de enraizamento. A incompatibilidade é um problema quando se utiliza a enxertia (SARMAST et al., 2009).

Métodos de propagação vegetativa *in vitro* podem auxiliar a produção de mudas com vistas à conservação da espécie e também para a formação de novos plantios com o objetivo de produção de madeira. A cultura de tecidos vegetais e métodos de transformação genética oferecem uma opção importante para a multiplicação eficaz e melhoria de árvores dentro de um prazo limitado. Entretanto, a micropropagação também é considerada uma técnica difícil para a espécie (OLIVEIRA et al., 2013).

As primeiras tentativas de micropropagar *A. angustifolia* por meio da cultura de tecidos foram feitas por Handro (1986). Contudo, essa abordagem não demonstrou ser a mais indicada para a propagação clonal, apresentando respostas limitadas. Conforme o mesmo autor, a micropropagação da *A. angustifolia* é difícil por apresentar uma elevada recalcitrância na formação de brotos e raízes.

O êxito de um protocolo de micropropagação depende claramente da fase de estabelecimento *in vitro*. Isso porque as etapas seguintes de multiplicação e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas após o estabelecimento de culturas assépticas e providas de bom vigor vegetativo (GEORGE; DEBERGH, 2008).

Diversos critérios são importantes para o

estabelecimento de cultivos *in vitro* como, por exemplo, a contaminação por fungos e bactérias, a oxidação fenólica e fatores como a escolha do tipo de explante e do meio nutritivo. Embora, teoricamente, qualquer tecido possa ser utilizado como fonte de explante, alguns aspectos devem ser considerados e testados quanto à escolha do mais adequado aos processos morfogênicos de interesse (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dentre os meios de cultura mais empregados na cultura de tecidos vegetais de espécies lenhosas estão o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o WPM (LLOYD; McCOWN, 1981). O meio WPM, em razão da sua menor concentração de nitrogênio e potássio e menor força iônica total (HARRY; THORPE, 1994), promove bons resultados em espécies lenhosas (PEREZ-PARRON et al., 1994). Além da composição do meio de cultura, suas diluições têm sido estudadas em diversas fases da micropropagação (SOUZA et al., 2003). A concentração de sais pode ser adequada a cada espécie, com a redução da concentração iônica favorecendo, muitas vezes, a micropropagação (GUERRA; NODARI, 2006).

Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar o estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de *A. angustifolia* coletados em três diferentes posições na muda e em diferentes meios de cultura e suas diluições.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes utilizadas para a realização do experimento foram coletadas de árvores matrizes com 30 anos de idade em área de coleta de sementes particular, localizada no município de Santo Antônio do Palma – RS. As sementes de 10 árvores matrizes foram misturadas, selecionadas as melhores (maiores e mais firmes) e 15 dias após a coleta foram colocadas para germinar em bandejas plásticas brancas de polietileno contendo areia média como substrato. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação pertencente a Universidade Federal de Santa Maria (RS) até a utilização das mudas no experimento. A cada dois dias de intervalo foi realizada a irrigação nas bandejas.

Após o início da germinação (\pm 20 dias após a semeadura) efetuaram-se aplicações semanais do fungicida Captan® (3 g L⁻¹) e três dias antes da implantação do experimento, aplicações diárias deste fungicida. Dois meses após a semeadura, as mudas, contendo em torno de 20 cm de altura, foram seccionadas na base e imediatamente colocadas em béquer de polietileno contendo água esterilizada, duas gotas de detergente neutro e fungicida Captan® (3 g L⁻¹), permanecendo sob agitação constante por 20 min, a qual foi efetuada com auxílio de bastão de vidro. Decorrido esse período, os segmentos caulinares obtidos foram lavados em água corrente durante 10 min e enxaguados em água esterilizada.

A desinfestação superficial foi efetuada em câmara de fluxo laminar, sendo os segmentos caulinares imersos em solução de etanol a 70% (v/v), por 30 segundos, enxaguados com água esterilizada e, após, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v) durante 10 min, com posterior enxágue triplo com água

esterilizada. Na sequência, os segmentos caulinares foram divididos em segmentos sem acículas/folhas, com aproximadamente 2-3 cm de comprimento, oriundos de três posições: apical, mediana e basal, as quais constituíram os tratamentos (Figura 1).

Na sequência, os segmentos caulinares foram inoculados individualmente, na posição vertical, em tubos de ensaio (20 x 150 mm) com capacidade para 100 mL, contendo 25 mL dos meios nutritivos (tratamentos) + vitaminas, sacarose (30 g L⁻¹) e 6 g L⁻¹ de ágar (Sigma®).

Adicionaram-se, ainda, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 250 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), com a finalidade de controlar a oxidação fenólica. Após, o pH dos meios foi ajustado para 5,8. Os tubos de ensaios foram vedados com papel alumínio e na sequência o meio nutritivo foi previamente esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C (1,5 kgf cm⁻²).

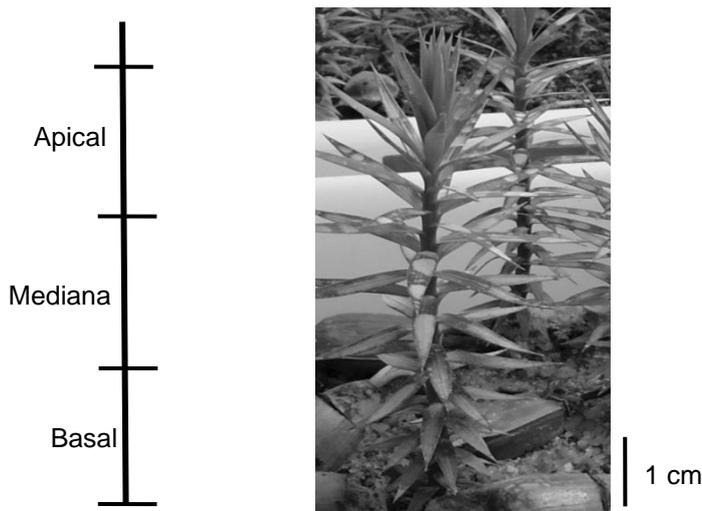


FIGURA 1 - Muda de araucária e delimitação das posições de coleta dos segmentos caulinares para posterior estabelecimento *in vitro*, em diferentes meios de cultivo. Santa Maria - RS/2012.

Após inoculação, os tubos de ensaio contendo os meios e os segmentos caulinares foram mantidos na sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas diárias e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Após 60 dias de cultivo *in vitro* avaliaram-se a porcentagem de estabelecimento (segmentos reativos e sem oxidação), porcentagem de contaminação (contaminação geral por micro-organismos), porcentagem de formação de calos (avaliação visual da formação de calo em qualquer parte do explante); número de brotos/explante e comprimento médio das brotações (mm).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 3 x 4 (três posições de coleta – apical, mediana e basal x quatro concentrações de meios de cultivo – 100% MS; ½ MS; 100% WPM e ½ WPM). Utilizaram-se seis repetições de cinco explante cada.

Em caso de não obtida a normalidade dos erros e homogeneidade de variância, os dados foram transformados, para a função $\sqrt{x+0,5}$, sendo “x” o valor observado, e submetidos à análise de variância. Quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de

Tukey, a 5% de probabilidade. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011) para a análise estatística dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos segmentos caulinares de *A. angustifolia* objetivando o estabelecimento *in vitro* mostrou efeito significativo para a formação de calos em relação ao meio nutritivo e interação para o número de brotos. O comprimento destas brotações foi influenciado pelo meio nutritivo e pela posição de coleta (Tabela 1).

A formação de calos em segmentos caulinares foi influenciada pelo meio nutritivo (Tabela 2). O meio MS completo ou reduzido à 50% da concentração de sais não ocasionou o aparecimento de estruturas calogênicas. O meio WPM reduzido à 50% da concentração de sais resultou uma reduzida formação destas estruturas, não diferenciando do meio MS completo e reduzido. O meio nutritivo WPM foi responsável por um elevado aparecimento de calos, sendo esse aparecimento superior em um quarto dos explantes.

Em geral, o meio nutritivo WPM é mais eficiente em espécies arbóreas, pois foi desenvolvido para este grupo de plantas (FERMINO JUNIOR; PEREIRA, 2012), entretanto algumas características deste meio nutritivo e algumas relações hormonais endógenas podem explicar a maior formação de calos no estabelecimento de araucária *in vitro*. Além disso, a elevada juvenilidade do material (explantes de origem seminal) pode elevar o aparecimento de calos. Um exemplo poderia ser a concentração de vitaminas no meio WPM. Este apresenta na sua

formulação maior disponibilidade de vitaminas, o que na maioria dos casos é benéfico para espécies arbóreas. Entretanto, algumas vitaminas presentes no meio WPM podem promover um grande crescimento celular (LOPES et al., 1997). Este crescimento celular pode, em alguns casos, ocorrer de forma desordenada, ocasionando a formação de calos, fato presenciado neste estudo com *A. angustifolia*.

TABELA 1. Resultado da análise de variância para estabelecimento (%), contaminação geral (%), formação de calos (%), número de brotos por explante e comprimento das brotações (mm) em segmentos caulinares de *A. angustifolia* coletados em quatro diferentes posições na muda e cultivados em quatro diferentes meios nutritivos, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

FV	GL	Quadrado médio				
		Estabelecimento (%)	Contaminação	Calos	Brotos	Comprimento(mm)
MC	3	0,6667 ^{ns}	0,444 ^{ns}	23,889*	2,387*	175,36*
PC	2	20,0 ^{ns}	35,00 ^{ns}	11,667 ^{ns}	5,029*	123,89*
MC*PC	6	33,33 ^{ns}	12,778 ^{ns}	13,889 ^{ns}	2,428*	6,894 ^{ns}
Resíduo	48	20,833	16,667	5,83	0,423	12,319
Média geral	-	70,0	20,0	8,33	2,47	9,27
CV(%)	-	22,09	26,07	16,66	26,26	37,82

^{ns} F não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro. MC = meio de cultivo, PC = posição de coleta.

TABELA 2. Médias da formação de calos (%) em segmentos caulinares de *A. angustifolia* cultivadas em diferentes meios nutritivos, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Meio nutritivo	Formação de calos (%)
½ MS	0,0 a*
MS	0,0 a
½ WPM	6,67 ab
WPM	26,67 b

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

A formação de calos resulta do processo de desdiferenciação das células dos tecidos dos explantes, e progride, por meio de divisões celulares, basicamente pela presença de reguladores de crescimento, ou da própria constituição química deste meio nutritivo (WAREING; AL-CHALABI, 1985).

Em relação ao número de gemas axilares originados no processo de estabelecimento obteve-se interação entre o fator posição de coleta e meio nutritivo, ou seja, o número de brotos varia conforme se altera um dos fatores estudados.

O maior número de brotos por explante foi obtido utilizando o meio nutritivo MS completo com explantes coletados da posição basal (Tabela 3). Em geral, a utilização de explantes da posição basal resultou na maior

formação de brotos por explante, a exceção do meio nutritivo ½ MS que apresentou maior formação na posição mediana. Em relação ao meio nutritivo, o meio MS obteve em média a maior formação de brotos por explante.

A exemplo da variável formação de calos, o meio WPM completo ou reduzido não apresentou resultado superior ao meio MS quanto a formação de brotos por explante. Isso pode indicar que o balanço nutricional do meio WPM não é o mais adequado para o cultivo *in vitro* de araucária em comparação ao meio MS, sendo que a espécie requer um potencial osmótico maior, aumentando o crescimento *in vitro*. A menor formação de brotos com a utilização do meio WPM pode estar relacionada à menor concentração dos macronutrientes, que em araucária são essenciais para o crescimento, podendo ser muitas vezes

limitante, como é o caso do nitrogênio (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

O nitrogênio é um dos mais importantes elementos que contribuem para o crescimento de plantas *in vitro* e *in vivo*, sendo que a forma do nitrogênio, como amônia ou nitrato tem uma influência drástica na resposta morfogênica de tecidos vegetais *in vitro* (BOJWANI; RAZDAN, 1996). O meio MS e WPM apresentam amônio similar, ou seja, doses de nitrato, mas a concentração total de amônio no meio WPM é 45% da encontrada no meio MS. O efeito da fonte de nitrogênio sobre o desenvolvimento de orquídea-da-restinga (*Epidendrum fulgens* Brong) foi verificado em estudo onde a forma e a concentração do nitrogênio tiveram uma influência significativa na síntese de citocininas endógenas (MERCIER; KERBAUY, 1991).

A maior formação de brotações nas posições mais próximas à base pode estar relacionada ao gradiente de juvenildade. Em algumas plantas, especialmente lenhosas, há um gradiente de juvenildade em direção à base da árvore, o que promove um aumento da maturação em função da maior proximidade com o meristema apical (WENDLING; XAVIER, 2001). Segundo Hartmann et al.

(2011), a maior juvenildade da região basal das plantas se deve ao fato de que os meristemas mais próximos da base formaram-se em épocas mais próximas à germinação que o das regiões terminais.

O número de brotos por explante observado no presente estudo foi superior ao registrado por Bertholdo et al. (2009), trabalhando com araucária no qual houve, em média, 0,45 brotos por explante após 60 dias de cultivo em meio nutritivo WPM, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA), um inibidor do transporte de auxina.

O comprimento das brotações foi influenciado de maneira independente pela ação dos fatores testados (Tabela 4). O meio MS completo, a exemplo das outras variáveis, obteve melhor resposta de cultivo *in vitro* no estabelecimento da araucária. A média de comprimento das brotações (14,50 mm) encontrada para este tratamento difere dos demais avaliados. O meio nutritivo WPM apresentou resultado inferior ao MS, mas superior a ambos os meios nutritivos na metade das concentrações de sais. Pode-se inferir que há um maior comprimento das brotações com a utilização dos meios nutritivos completos, principalmente o MS.

TABELA 3. Número de brotos em segmentos caulinares de *A. angustifolia* cultivadas em função de diferentes meios nutritivos e diferentes posições de coleta, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Posição de coleta	½ MS	100% MS	½ WPM	100% WPM
Apical	1,40 b B	3,33 ab A	2,00 b B	1,40 b B
Mediana	3,50 a A	2,40 b A	2,00 b A	2,00 b A
Basal	2,75 a AB	4,00 a A	3,66 a A	3,50 a B

*Médias em minúsculo seguidas pela mesma letra na coluna e em maiúsculo na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 4. Médias do comprimento das brotações em segmentos caulinares de *A. angustifolia* cultivadas em diferentes meios nutritivos e em diferentes posições de coleta, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Meios nutritivos	Comprimento das brotações (mm)
½ MS	6,58 bc*
MS	14,50 a
½ WPM	5,34 c
WPM	9,99 b
Posições de coleta	
Apical	6,26 b
Mediana	10,48 a
Basal	11,89 a

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

Pode-se afirmar que o meio MS foi mais adequado ao desenvolvimento *in vitro* de araucária. A

maior adaptação dos explantes a este meio demonstrou a preferência da espécie pelo cultivo em meio nutritivo com

concentração iônica completa em comparação ao meio WPM e meios reduzidos. Além disso, as relações nutricionais também são importantes, pois definem a dissociação dos nutrientes e a disponibilidade para absorção pelo tecido vegetal. O meio WPM possui cerca de 45% da força iônica do meio MS (NUNES et al., 2002; VENGADESAN et al., 2003). O meio ½ MS, por sua vez, possui 22,5% da capacidade iônica do MS, explicando os resultados inferiores visualizados com o emprego dos meios nutritivos ½ MS, WPM e ½ WPM.

Comportamento semelhante foi observado na micropropagação de *Melia azedarach* L. (Meliaceae), por exemplo, destacando-se os efeitos positivos do meio MS, com sua constituição completa de sais, especialmente no número e comprimento de brotações emitidas, ao serem testados os meios MS, ½ MS, WPM e B5 (HUSAIN; ANIS, 2009).

As posições basais e medianas apresentaram o maior comprimento dos brotos, diferenciando da posição apical, a qual obteve resultado bem inferior as posições mais basais de origem dos explantes (Tabela 4). Da mesma forma que foi obtido o maior número de brotações na posição basal e mediana, também foi observado maior comprimento nestas posições. O gradiente de juvenildade que exerce grande influência no enraizamento das estacas (BITENCOURT et al., 2009) também pode explicar o maior número e comprimento das brotações.

No presente estudo, a formação de gemas axilares foi induzida diretamente na haste principal do explante de araucária. Na maioria das coníferas, as gemas axilares se formam em pouco número em relação a grande quantidade de folhas (SARMAST et al., 2012). Segundo o mesmo autor, espécies do gênero *Agathis*, *Araucaria* e *Wollemia* (pertencentes família Araucariaceae) possuem uma estrutura axilar aparentemente única, composta de células indiferenciadas e meristemas axilares que não têm folha primordial, nem conexões vasculares. Estes meristemas são inicialmente formados em um local exógeno, mas são transferidos para um local endógeno por meio da atividade de um felogênio localizado (BURROWS et al., 2003).

A. angustifolia é uma espécie recalcitrante para a micropropagação, apresentando uma baixa taxa de formação de brotos *in vitro*. A utilização de um meio nutritivo mais adequado para a espécie pode servir para futuros trabalhos no âmbito da propagação clonal da espécie, seja para fins de conservação ou manipulação genética.

A propagação da espécie por mudas da origem seminal também pode auxiliar na produção de mudas, principalmente em intervalos no ano que não há disponibilidade de sementes viáveis da espécie. A elevada ocorrência de diferenciação celular e a formação de calos nos tecidos cultivados *in vitro* desta espécie representam uma dificuldade a mais para o processo de micropropagação (HANDRO, 1986), podendo muitas vezes inviabilizar o cultivo *in vitro* se métodos adequados de cultivo não forem adotados.

CONCLUSÕES

A formação de calos foi menor em explantes estabelecidos em meio nutritivo MS completo ou reduzido à metade da concentração de sais.

Segmentos da posição basal e cultivados em meio nutritivo MS promoveram maior número de brotações com maior comprimento no estabelecimento *in vitro* da araucária através de segmentos caulinares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. 2003. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, Prahav, v.47, n.1, p.53-59, 2003.
- BERTHOLDO, L.M.; CORDEIRO, R.A.F.; ASTARITA, L.V. Indução de brotos de *Araucaria angustifolia* cultivada *in vitro*. **X Salão de Iniciação Científica – PUCRS**, 2009.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant Tissue Culture: theory and practice**. Amsterdam, 1996. 767p.
- BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H.S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguayensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.3, p.277-281, 2009.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente: Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Instrução Normativa nº 6**, Brasília, 2008.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.365-372, 2000.
- BURROWS, G.E.; OFFORD, C.A.; MEAGHER, P.F.; ASHTON, K. Axillary meristems and the development of epicormic buds in Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*). **Annals of Botany**, Exeter, v.6, n.92, p.835-844, 2003.
- DAVID, A.A.D.; SILOCHI, R.M.H.Q. Avaliação de métodos para conservação de pinhão. **Revista Faz Ciência**, Francisco Beltrão, v.12, n.15, p.207-216, 2010.
- EIRA, M.T.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R.; KARRARA, D.K.; MELLO, M.C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.16, n.1, p.71-75, 1994.
- FERMINO JUNIOR, P.C.P.; PEREIRA, J.E.S. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith – Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v.22, n.1, p.1-9, 2012.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E.F.; HALL, A.M.; DE KLERK, G.J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3.ed. Dordrecht: Springer, v.1, p.29-64, 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, p.183-260, 1998.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Material didático de apoio à disciplina de biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006. Disponível em: www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm. Acesso em: 14 mai. 2011.
- HANDRO, W. *Araucaria* (*Araucaria* spp.) In: Bajaj, Y.P.S. ed., **Biotechnology in agriculture and forestry**. Springer-Verlag, Heidelberg, v.1, pp.310-315, 1986.
- HARRY, I.S.; THORPE, T.A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T.A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.539-560, 1994.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 915p, 2011.
- HUSAIN, M.K.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v.31, n.4, p.765-772, 2009.

- IUCN 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 18/11/2013.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedins International Plant Propagators Society**, Washington, v.30, p.327-421, 1981.
- LOPES, S.O.; LEUCKERT, A.; HENRIQUES, A.T.; RECH, S.B. Influência da tiamina no cultivo *in vitro* de *Pilocarpus pennatifolius*. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v.13, n.2, p.167-168, 1997.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v.1, 1992. 352p.
- MATTOS, J.R. **O pinheiro brasileiro**. 2. ed. Lages: Artes Gráficas Princesa, 1994. v.1, 225p.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.195-199, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NUNES, E.C.; CASTILHO, C.V.; MORENO, F.M.; VIANA, A.M. *In vitro* cultures of *Cedrella fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, Dordrecht, v.70, n.1, p.259-268, 2002.
- OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.33, n.76, p.445-460, 2013.
- PÉREZ-PARRON, M.A.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; PÉREZ C. Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.37, p.297-302, 1994.
- SARMAST, M.K.; SALEHI, ; KHOSH-KHUI, M. Micropropagation of *Araucaria excels* R. Br. var. *glauca* Carrière from orthotropic stem explants. **Physiology Molecular Biology Plants**, Illinois, v.3, n.18, p. 265-271, 2012.
- SARMAST, M.K.; SALEHI, H.; KHOSH-KHUI, M. Using plagiotropic shoot explant in tissue culture of *Araucaria excels* R.Br. var. *glauca*. **Advances in Environmental Biology**, London, v.3, p.191-194, 2009.
- SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação in vitro de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, Edição Especial, p.1532-1538, 2003.
- VENGADESAN, G.; GANAPATHI A.; ANAND R.P.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. From nodal segments of a 10-year-old tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.39, n.4, p.409-414, 2003.
- WAREING, P.F., AL CHALABI, T. Determination in plant cells. **Plant Biology**, v. 27, n.4-5, p.241-248, 1985.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado e espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.187-94, 2001.