

Aspectos anatômicos da cultura  
*in vitro* da *Araucaria angustifolia*. II. O enraizamento  
dos brotos axilares

Anatomical aspects of *in vitro*  
culture of *Araucaria angustifolia*. II. The rooting  
process on axillary shoots

CECÍLIA IRITANI<sup>1</sup>  
FLÁVIO ZANETTE<sup>2</sup>  
JOVITA CISLINSKI<sup>3</sup>

O enraizamento dos brotos axilares ortotrópicos obtidos *in vitro* é uma etapa importante da micropopulação da araucária, sem a qual não é possível obter-se plantas para a clonagem de genótipos superiores da espécie, para finalidades econômicas como a formação de pomares clonais de sementes de qualidade ou reflorestamentos uniformes.

Pela vasta bibliografia existente, sabe-se que o enraizamento de estacas ou microestacas<sup>4</sup> de coníferas não é fácil de ser obtido, principalmente *in vitro* e mesmo de microestacas de indivíduos jovens e muito jovens, nos quais a capacidade é reconhecidamente maior.

Tendo em vista objetivos práticos, este trabalho relata os resultados de observações anatômicas da estrutura do calo formado na base de brotos axilares postos a enraizar em meio de cultura com auxinas; a origem das raízes formadas, a funcionalidade morfológicas das mesmas, estabelecendo-se paralelos com o enraizamento de estacas de ramos superiores de indivíduos com quatro anos, cultivados em arcia e sob nebulização intermitente.

---

<sup>1</sup> Professor Adjunto do Departamento de Botânica, SCB, Universidade Federal do Paraná — C. Postal 19.041 — 81.531-970 Curitiba, PR, Brasil. <sup>2</sup> Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, SCA, UFPR e Bolsista do CNPq. <sup>3</sup> Bolsista do CNPq. <sup>4</sup> Término aplicável a segmentos de caule ou brotos obtidos *in vitro*.

De segmentos caulinares de mudas de 30-60 dias (outubro-dezembro), cultivados em meio básico de Murashigue & Skoog (ver Iritani, Zanette & Cislinski, 1992), foram obtidos brotos ortotrópicos, de 3 a 6 cm, 60 dias após o isolamento. Estes brotos foram postos a enraizar no meio básico, mas acrescidos de 1-2 mg de ácido indol-3-butírico (AIB).

## MATERIAL E MÉTODO

Como o enraizamento ocorre em média aos 30-450 dias de cultivo, brotos com calos de tamanhos variáveis, foram coletados entre o 26º e 32º dias, sendo que as bases (cerca de 1 cm), foram separadas, lavadas e fixadas em FAA-50%. Para a microtomia, utilizou-se a metodologia de (IRITANI, SOARES & GOMES, 1986 a e b; IRITANI, ZANETTE & CISLINSKI, 1992). O micrótomo utilizado foi o ANCAP 781; as lâminas examinadas com microscópios ópticos Zeiss e Nikkon e, os eventos mais relevantes registrados através de fotomicroscópios Wild, em filmes T-MAX ASA 100. Foram feitas cerca de 600 lâminas permanentes, cada uma com 6-15 secções em série e devidamente numeradas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos feitos ao longo de três anos (1986-1989), tendo sempre por base, brotos de segmentos caulinares de mudas de 30-60 dias (entre dezembro-fevereiro), verificou-se que esta é uma etapa difícil, obtendo-se baixas porcentagens de enraizamento e também muito variável conforme o ano (0-50%).

Tendo em vista que em cada um dos anos mencionados as sementes foram obtidas de diferentes procedências, este fator pode ser uma das variáveis responsáveis pelas diferentes taxas de enraizamento obtidas. Em meio básico sem AIB, a taxa de enraizamento sempre foi nula (0%).

O calo formado na base dos brotos axilares cultivados, atinge grandes proporções (Figs. 1 e 2), sendo mais firmes enquanto nas etapas iniciais do desenvolvimento. A medida que novas células vão sendo acrescentadas, as mais velhas se distanciando da base, formam saliências de aspecto poroso, desmanchando-se com facilidade, sendo este calo, portanto, do tipo friável. É possível que o tempo de vida dessas células seja curto e, suas lamelas médias facilmente desintegráveis após determinado período. Este tipo de calo também é formado na base de segmentos de caule cultivados para se obter as brotações, em meio básico com ou sem reguladores do crescimento e, na base de brotos dominados, postos a crescer no meio básico, mas com carvão ativado e ácido giberélico.

Várias referências sobre o enraizamento de estacas, entre as quais REINES & MCALPINE (1959), HARTMANN & KESTER (1967), KOMISSAROV (1969), DALGAS (1973) e BROWN (1974), atestam que as raízes em estacas, de muitas espécies, principalmente de coníferas, são formadas a partir de primórdios que se originam de um câmbio que envolve ninhos de traqueóides formados no calo. Em todos os casos, as estacas foram postas a enraizar sob nebulização intermitente e em substrato de areia, os calos obtidos sendo do tipo compacto. Todos estes aspectos foram constatados por IRITANI & SOARES (1982) e IRITANI, SOARES & GOMES (1986 a).

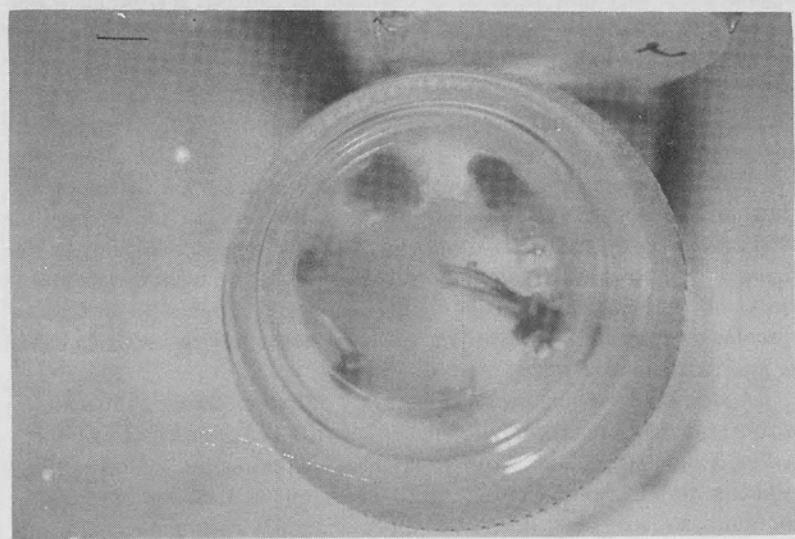
Não são muitas as referências quanto aos aspectos morfológicos do enraizamento *in vitro* de microestacas de coníferas, talvez devido aos muitos e complexos aspectos da micropropagação. Raízes obtidas *in vitro* e, a partir do calo da base de brotos, são mencionadas por BIGOT & ENGELMANN (1987), para *Cunninghamia lanceolata*, e por HORGAN (1987), para *Pinus radiata*.

É lógico esperar que os processos de enraizamento em estacas e microestacas sejam semelhantes, além do que, há inúmeras constatações da capacidade morfogênica de calos cultivados isoladamente.

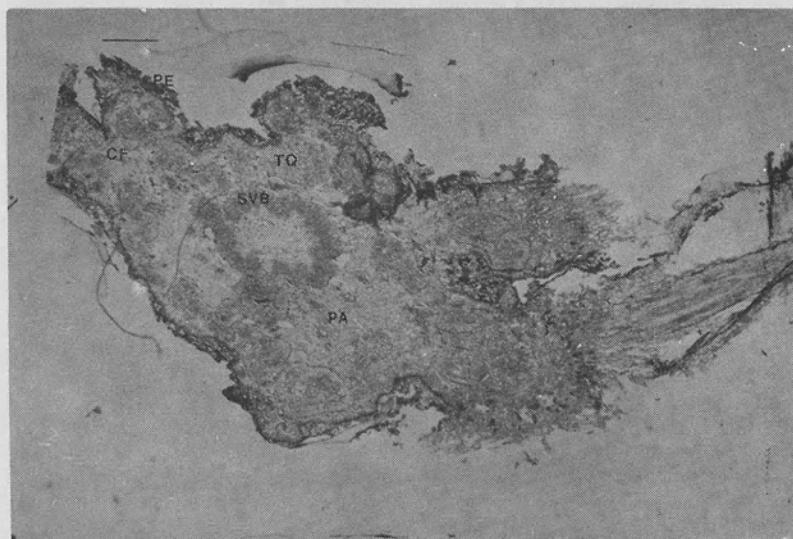
A microtomização transversal e longitudinal do material coletado, revelou que muito próximo, praticamente na base dos brotos, o calo é do tipo compacto e, é onde ocorre a iniciação radial (Figs. 2, 3, 6 a 12). As figuras 4 e 5 mostram aspectos da estrutura do calo das microestacas que são iguais aos das estacas, isto é, desdiferenciação de células parenquimáticas formando câmbios isolados, que dão origem a ninhos de traqueóides e células parenquimáticas calosas. Na periferia deste calo, as saliências maiores apresentam suas partes distais em processo de desintegração (Figs. 4 e 6).

Primórdios radiciais podem ser vistos nas figuras 6 a 8 e, na figura 7, é clara a ligação da iniciação dos mesmos ao câmbio dos ninhos de traqueóides. Esta associação também é vista sem maiores dificuldades na figura 12, com a conexão direta do sistema vascular da microestaca com o ninho de traqueóides, formado muito próximo e, deste com o sistema vascular da raiz formada. Esta é a situação encontrada em todos os casos de microestacas enraizadas.

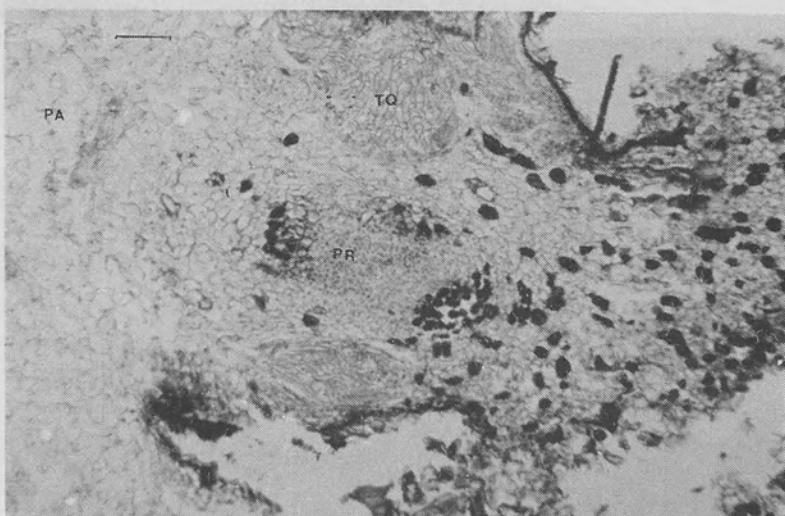
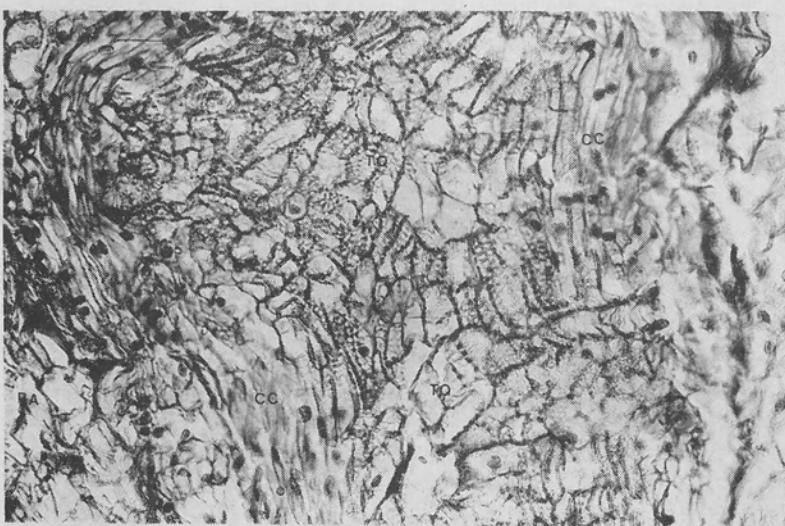
A diferença de textura entre os calos de microestacas cultivadas *in vitro* e estacas cultivadas em areia, pode ser vista comparando-se as figuras 6, 7 e 8 com as figuras 9, 10 e 11. Nas três primeiras, os primórdios radiciais foram formados um tanto distantes da base e, apresentam configuração irregular devido à dificuldade da microtomização, nas segundas, os primórdios formados, praticamente na periferia do calo firme das estacas, apresentam configuração muito regular e, a compacação dos tecidos muito evidente. Esta situação, aliada ao fato de que a microtomização dos calos volumosos sem raízes resultou na constatação da ausência completa de primórdios radiciais nos mesmos, leva a crer que a



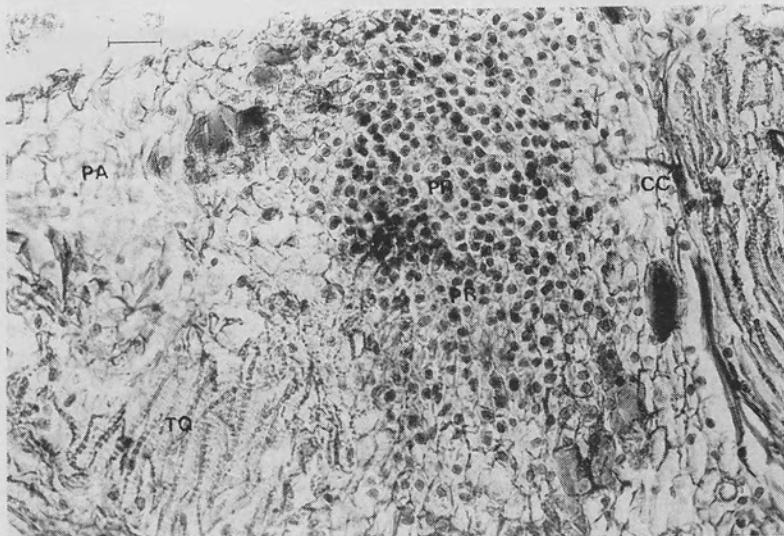
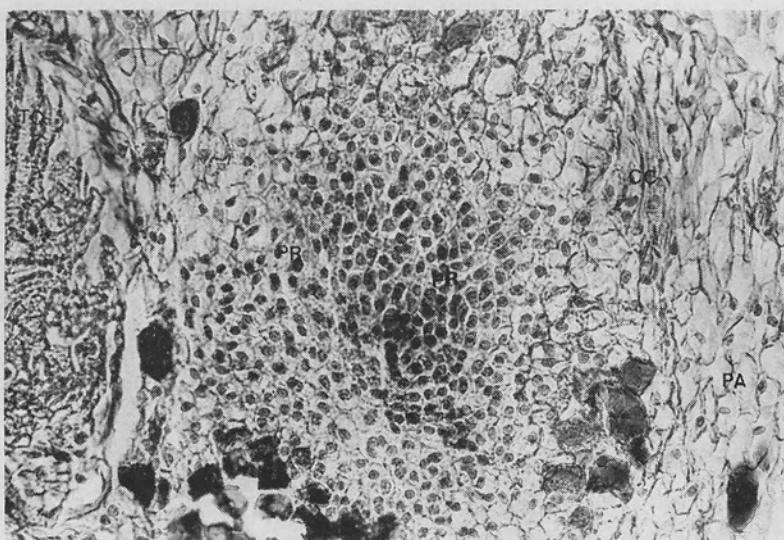
Figs. 1 e 2. *Araucaria angustifolia*: brotos axilares de segmentos caulinares de mudas de 30-60 dias. 1, postos a enraizar em meio MS/2, com 1-2 mg de ácido indol-3-butírico; 2, após 30-35 dias de cultivo, dois deles enraizados e dois com calos muito volumosos.



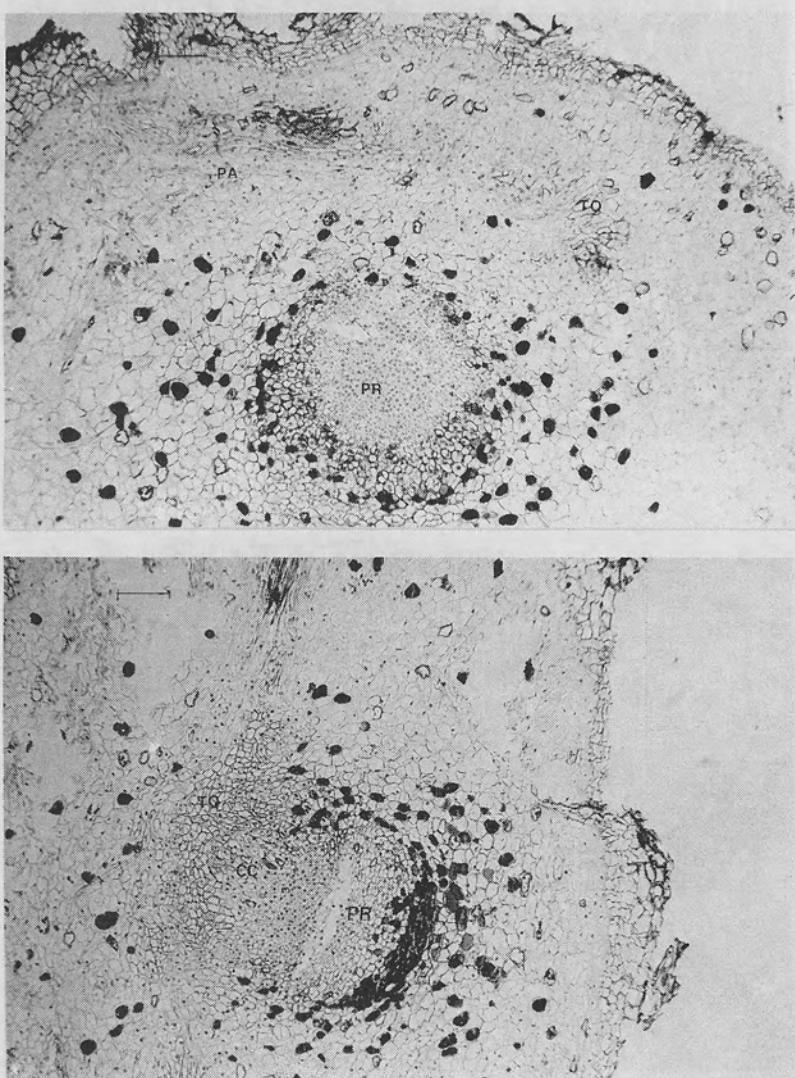
Figs. 3 e 4. *Araucaria angustifolia*. 3, broto axilar de 30-60 dias, com três raízes bem desenvolvidas, 50 dias de cultivo e prestes a ser transplantado para o solo, note o calo volumoso; 4, corte transversal da base do broto axilar cultivado em meio de enraizamento, 30 dias de cultivo, SVB - sistema vascular do broto, TQ - ninho de traquóides, PE - periderme, CF - calo friável, PA - parênquima caloso (escala: 0,1667 mm).



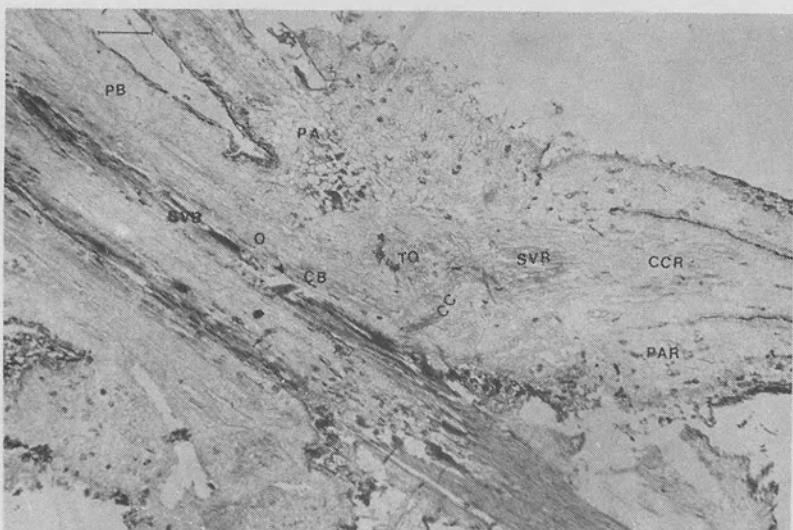
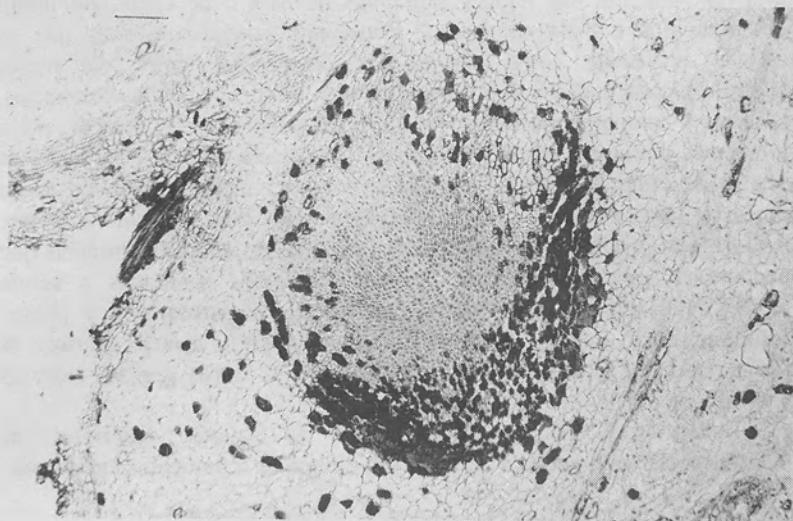
Figs. 5 e 6. *Araucaria angustifolia*. 5, corte transversal, detalhe do ninho de traqueóides, TQ - traqueóides, CC - câmbio do ninho de traqueóides, PA - parênquima caloso (escala: 0,0250 mm); 6, fotomicrografia de corte transversal do broto axilar cultivado em meio de enraizamento, 32 dias de cultivo, PR - primôrdio de raiz, PA - parênquima caloso, TQ - ninho de traqueóides (escala: 0,1667 mm).



Figs. 7 e 8. *Araucaria angustifolia*, secção transversal, detalhe de primórdio de raiz, note a proximidade com ninho de traqueóides; TQ - traqueóides, CC - câmbio do ninho de traqueóides, PA - parênquima caloso, PR - primórdio de raiz (escala: 0,0250 mm).



Figs. 9 e 10. *Araucaria angustifolia*, secção transversal de calo de estaca de ramo. 9, PR - primórdio radicial, PA - parénquima caloso, TQ - ninho de traqueóides, CC - câmbio do ninho de traqueóides (escala: 0,1667 mm); 10, primórdio de raiz em início de alongamento e nítida origem a partir do câmbio que envolve o ninho de traqueóides (escala: 0,1667 mm).



Figs. 11 e 12. *Araucaria angustifolia*. 11, primórdio de raiz em fase de alongamento e mostrando nítido zoneamento histológico (escala: 0,1667 mm); 12, fotomacrografia da secção longitudinal mediana da base de um broto axilar cultivado em meio de enraizamento, 45 dias de cultivo, note a conexão entre SVB, TQ E SVR; SVB - sistema vascular do broto, CB - câmbio do broto, CC - câmbio do ninho de traqueóides, SVR - sistema vascular da raiz, PA - parênquima caloso, PB - parênquima cortical do broto, PAR - parênquima cortical da raiz, CCR - cilindro central da raiz (escala: 0,1667 mm).

iniciação radical, nas microestacas cultivadas *in vitro*, ocorre preferencialmente nas regiões proximais da base e de calos não muito desenvolvidos e mais compactos. Entretanto, convém ressaltar que as estacas utilizadas como término de comparação, eram de ramos plagiotrópicos e com diâmetros bem maiores; mesmo com calos compactos, também o enraizamento obtido foi em taxas baixas (25%). Não há, até o momento, nenhuma referência, quanto ao processo de enraizamento de estacas de caule de mudas, para que se possa ter melhor compreensão do processo; fatores, tais como, capacidade individual de enraizamento, conforme as procedências (populações), estações do ano, são variáveis que podem ser, em grande parte, responsáveis pelos resultados a serem obtidos. A friabilidade do calo das microestacas parece ser, *a priori*, resultante das condições de arejamento do substrato - o meio geloso e os frascos vedados não são fatores que facilitem as trocas gasosas entre as bases das microestacas e o meio exterior.

Todos estes aspectos serão objeto de estudos posteriores, as microestacas sendo postas a enraizar sob diferentes tratamentos auxínicos,

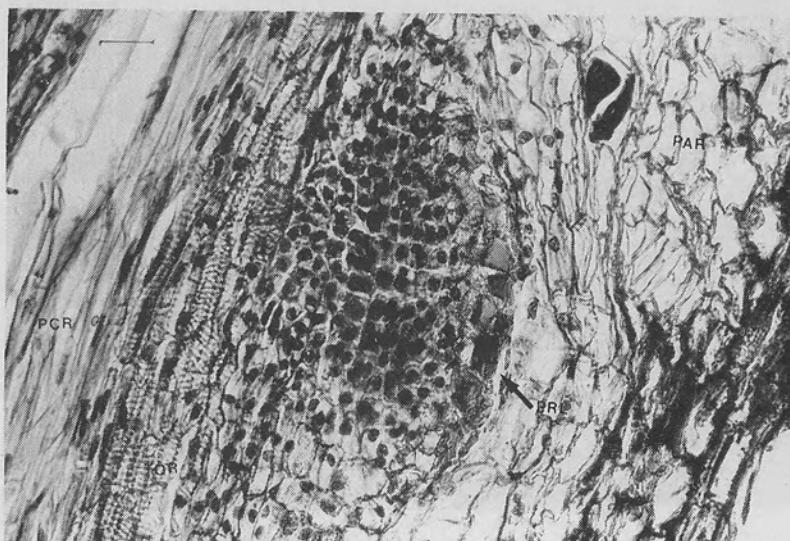


Fig. 13. *Araucaria angustifolia*, secção longitudinal mediana de raiz obtida *in vitro*; TQR - traqueóides da raiz, PRL - primórdio de raiz lateral, PAR - parênquima cortical da raiz, PCR - procâmbio da raiz (escala: 0,050 mm).

juntamente com estacas apicais de caule de mudas, sob nebulização intermitente e considerando-se fatores como idade, indivíduo e procedência e, dentro das possibilidades, estações do ano em dois anos consecutivos.

Estas possibilidades são relativas ao período necessário para o enraizamento das estacas de caule, que em testes preliminares, girou em torno de 90-120 dias.

A figura 13 atesta a funcionalidade morfológica das raízes formadas, através da formação de primórdios de raízes laterais (a ramificação não é característica destas raízes). A funcionalidade morfo e fisiológica também é inegavelmente dada pela conexão vascular (microestaca-traquicóides do calo-raiz formada), além da sobrevivência muito boa dos plantets obtidos quando transplantados para o solo.

## CONCLUSÕES

O enraizamento das microestacas de araucária, cultivadas in vitro, é um processo em parte dependente da textura do calo e, as raízes são formadas muito próximas da base, onde a compactação é maior. A iniciação das raízes nas mesmas é função de tratamentos auxínicos, notadamente o ácido indol-3-butírico.

O processo morfológico do enraizamento nestas microestacas é semelhante ao já constatado para estacas de ramos, ocorrendo no calo formado, às expensas do câmbio que envolve os ninhos de traquicóides. Fatores como condições de cultivo, capacidade individual de enraizamento, procedência e idade dos indivíduos e, estações do ano, podem estar envolvidos neste processo. As raízes formadas são morfo e fisiologicamente funcionais, permitindo uma boa sobrevivência dos plantets.

## RESUMO

Foram estudados os aspectos anatômicos da estrutura do calo e do processo de enraizamento de brotos axilares de *Araucaria angustifolia*. Estes brotos, em meio básico de Murashigue & Skoog, com a concentração dos nutrientes minerais reduzida à metade e 1-2 mg de ácido indol-3-butírico, formam calo rizogênico somente nas regiões muito próximas da base. O excedente é do tipo friável, provavelmente dificultando a iniciação radical. Entretanto, as raízes formadas são morfo e fisiologicamente funcionais.

PALAVRAS CHAVE: brotos-axilares, micropromoção, enraizamento.

*Araucaria angustifolia*.

## SUMMARY

Anatomical aspects of the callus and the *in vitro* rooting process on axillary shoots of *Araucaria angustifolia* were performed. These shoots cultivated in Murashigue & Skoog's basal medium at the half strength of mineral nutrients and 1-2 mg of indol-3-butyric acid, showed firmly established and rhizogenic callus only at the proximal sites of its bases. The excedent were friable callus, probably affecting the root primordia initiation. However, developed roots are physiologically and morphologically functional.

KEY WORDS: axillary-shoots, micropropagation, rooting,  
*Araucaria angustifolia*.

## RESUMÉ

Les aspects anatomiques de la structure du cal et de la rhizogénèse *in vitro* de pousses axillaires d'*Araucaria angustifolia* ont été étudiés. Ces pousses cultivées sur le milieu de Murashigue & Skoog dans une concentration des minéraux réduit à 1/2, plus 1-2 mg de l'acid 3-indolybutirique, forment des cals compacts rhizogènes seulement à la proximité de leurs bases. L'excedant étaient du type friable, possiblement empêchent l'initiation des racines. Les racines formées sur les cals compacts, sont morphologique et physiologiquement fonctionnelles.

MOTS CLÉS: pousses-axillaires, micropagation, racinement,  
*Araucaria angustifolia*.

AGRADECIMENTOS — Ao Prof. Luiz Fernando Contin, pela orientação e auxílio na utilização do fotomicroscópio do Depto. de Botânica, SCB, UFPR. Ao Prof. Yves J. Sbalqueiro, pela orientação e utilização do fotomicroscópio do Depto. de Genética, SCB, UFPR. À Profa. Aracely V. Gomes, pela orientação e auxílio na utilização dos fotomicro e fotomacroskopios do Depto. de Tecnologia, SCA, UFPR.

## BIBLIOGRAFIA

- BIGOT, C. & F. ENGELMANN. 1987. Vegetative propagation of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb) Hook. in *Cell and tissue culture in forestry*, v. 3, 114-127 pp. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht.

- BROWN, A. G. 1974. Comparison of early growth in radiata Pines, raised by cuttings from parents of different ages with that of seedlings trees. *Austr. For. Sci.*, Canberra, 6 (3): 43-47.
- DALGAS, K. F. 1973. Anatomical studies on cuttings of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst), undergoing the rooting process. *For. Tree Improv., Arbaretet Horsholm* 5: 503-520.
- HARTMANN, H. T. & D. E. KESTER. 1967. *Propagacion de Plantas: Principio y Practicas*, 3a. ed., 692 pp. Continental, Mexico.
- HEAMANS, J. C. & J. W. OWENS. 1972. Callus formation and root initiation in stem cuttings of Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. *Can. J. For. Res.* 12: 121-134.
- HORGAN, K. 1987. *Micropagation of Pinus radiata in Cell and Tissue Culture in Forestry*, v. 3. 128-145 pp Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht.
- IRITANI, C. & R. V. SOARES. 1982. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze., através da aplicação de reguladores do crescimento. *Anais do 4º Congresso Florestal Brasileiro, Silvicultura* 28: 313-317.
- IRITANI, C.; R. V. SOARES & A. V. GOMES. 1986a. Aspectos morfológicos da ação de reguladores do crescimento em estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. *Acta Biol. Parana.* 15 (1,2,3,4): 1-20.
- IRITANI, C.; R. V. SOARES & A. V. GOMES. 1986b. Aspectos morfológicos da aplicação de reguladores do crescimento nas estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. *Acta Biol. Parana.* 15 (1,2,3,4): 21-46.
- KOMISSAROV, D. A. 1969. *Biological basis for the propagation of woody plantas by cuttings*. Israel Program of Scientific Translation, Jerusalem, 250 pp.
- REINES, M. & R. G. MCALPINE. 1959. The morphology of normal callused and rooted dwarf shoots of slash pine. *Botanical Gazette*, Chicago, 12 (2): 118-124.

---

Recebido em 12.02.93.