

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

Clarissa Stahl Gomes

**QUALIDADE DE SEMENTES E RIZOGÊNESE *IN VITRO* EM
Peltophorum dubium (SPRENGEL) TAUBERT**

Santa Maria, RS
2017

Clarissa Stahl Gomes

**QUALIDADE DE SEMENTES E RIZOGÊNESE *IN VITRO* EM *Peltophorum
dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

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 título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stahl Gomes, Clarissa
Qualidade de sementes e rizogênese in vitro em
Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert / Clarissa Stahl
Gomes.- 2017.
60 p.; 30 cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Coorientadora: Maristela Machado Araújo
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2017

1. Canafístula 2. Qualidade física, sanitária e
fisiológica 3. Sacarose 4. Vermiculita 5. Período de
cultivo I. Silveira Reiniger, Lia Rejane II. Machado
Araújo, Maristela III. Título.

Clarissa Stahl Gomes

QUALIDADE DE SEMENTES E RIZOGÊNESE *IN VITRO* EM *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

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 título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2017:



**Lia Rejane Silveira Reiniger, Profª Drª (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**



Aline Ferreira Paim, Drª (UFSM)



Aline Ritter Curti, Profª Drª (UFPEL)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Denise e João Batista,
que me ensinaram que educação
é a maior herança que se pode legar.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho só foi possível graças ao apoio de diversas pessoas que participaram desta jornada. A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

.- à minha família. Aos meus pais, que sempre me deram todas as oportunidades e fizeram todo o possível por mim. Que me amaram incondicionalmente e me mostraram como é possível ir longe. Ao meu irmão, com quem descobri mais uma forma de amor. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida;

- aos demais familiares, tios, primos, padrinhos e, em especial aos meus avós, pelo amor, cuidado, preocupação e carinho sempre dedicados a mim;

- ao Lucas, pelo amor, parceria, compreensão e apoio, por ser minha fonte de conforto ao final dos dias mais desgastantes;

- aos amigos, por todos os momentos de felicidade que ajudam a tornar a vida mais leve;

- à professora Lia, pela ótima orientadora que é, pelas oportunidades e a confiança que me concedeu e por toda a ajuda oferecida;

- aos colegas de Laboratório, da graduação e da pós, sempre solícitos, pelas dicas e ajudas e pela convivência do dia-a-dia;

- à banca examinadora, por aceitarem meu convite para participar desta etapa tão importante e pelas contribuições ao trabalho;

- à CAPES, pela concessão da bolsa, que viabilizou a execução do trabalho;

- à Universidade Federal de Santa Maria, instituição a qual tenho muito carinho, e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela oportunidade de formação que me foi concedida;

A todos àqueles que fazem parte da minha vida e fizeram parte desta caminhada, contribuindo para meu crescimento humano e profissional.

RESUMO

QUALIDADE DE SEMENTES E RIZOGÊNESE *IN VITRO* EM *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

AUTORA: Clarissa Stahl Gomes
ORIENTADORA: Lia Rejane Silveira Reiniger

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert é uma espécie nativa com ocorrência da região Nordeste à região Sul do país. Sua rusticidade e rápido crescimento, além da durabilidade de sua madeira, atribuem-lhe grande importância ambiental e econômica. Suas sementes possuem dormência e são classificadas como ortodoxas, conferindo-lhe características físicas, sanitárias e fisiológicas específicas. Em nosso Grupo de Pesquisa já foram desenvolvidos vários estudos com essa espécie, entretanto, não foram ainda avaliados alguns componentes do meio de enraizamento. Assim, o objetivo do presente estudo foi otimizar o processo de micropropagação de *Peltophorum dubium*, em particular da etapa de rizogênese *in vitro* das brotações. A qualidade das sementes que doaram explantes para os experimentos de rizogênese *in vitro* foi analisada quanto a umidade, peso de mil sementes, biometria, sanidade e germinação. Na rizogênese *in vitro* foram avaliados componentes do meio nutritivo, como pH, ágar e sacarose, em diferentes níveis e concentrações, combinados à presença ou ausência de vermiculita. Além disso, foram analisados diferentes meios nutritivos, na ausência de sacarose, associados a dois períodos de cultivo. O grau de umidade e o peso de mil sementes confirmaram sua classificação como ortodoxa e portadora de sementes pequenas. As dimensões avaliadas, bem como a pequena amplitude de variação atestaram a homogeneidade do lote. As sementes associaram-se a 10 gêneros fúngicos e apresentaram 86 % de germinação. Na ausência de sacarose foram observadas médias superiores de formação e comprimento de raízes (57,14 % e 2,79 cm respectivamente). Independentemente da concentração de ágar, a presença de vermiculita favoreceu a formação de raízes (17,46% versus 3,2%), e, independentemente das concentrações de sacarose, a vermiculita prejudicou a qualidade do sistema radicular (0,46 versus 2,41 cm e 9,51 versus 1,59 % para comprimento e raízes secundárias respectivamente). Os resultados observados para a calogênese indicaram que a presença de vermiculita no meio de cultivo é controversa, variando de acordo com a composição do meio nutritivo, no que diz respeito ao ágar e sacarose. Aos 60 dias de cultivo foi obtida a maior média (59,83 %) de rizogênese *in vitro* já observada para a espécie. As características físicas do lote se encontram dentro do padrão registrado na literatura. Os níveis de pH e as concentrações de ágar não influenciam a rizogênese *in vitro*. A ausência de sacarose promove a maior formação de raízes, além de maior comprimento. A presença de vermiculita aumenta o enraizamento, entretanto afeta negativamente a qualidade do sistema radicular. A adição do substrato afeta a calogênese, variando de acordo com a composição do meio nutritivo utilizado. O meio nutritivo não influencia a rizogênese *in vitro*, mas o período de cultivo é relevante, apresentando, aos 60 dias, uma maior formação e comprimento de raízes, bem como de raízes secundárias.

Palavras-chave: Canafístula. Qualidade física, sanitária e fisiológica. Sacarose. Vermiculita. Período de cultivo.

ABSTRACT

QUALITY OF SEEDS AND *IN VITRO* RHIZOGENESIS OF SHOOT *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

AUTHOR: Clarissa Stahl Gomes
ADVISOR: Lia Rejane Silveira Reiniger

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert is a native species occurring from the Northeast region to the Southern region of the Brazil. Its rusticity and rapid growth in addition to the durability of its wood give it great environmental and economic importance. Their seeds have dormancy and are classified as orthodox, conferring specific physical, sanitary and physiological characteristics. In our Research Group several studies have already been developed with this species, however, some components of the *in vitro* rooting medium have not yet been evaluated. Thus, the objective of the present study was to optimize the micropropagation process of *Peltophorum dubium*, in particular the *in vitro* rhizogenesis stage of the shoots. The quality of the seeds that gave explants to *in vitro* rhizogenesis experiments was analyzed for moisture, weight of one thousand seeds, biometry, sanity and germination. In the *in vitro* rhizogenesis, nutritive medium components such as pH, agar and sucrose were evaluated at different levels and concentrations, combined with the presence or absence of vermiculite. In addition, different nutritive medium, in the absence of sucrose, were analyzed, associated to two growing periods. The degree of moisture and the weight of one thousand seeds confirmed its classification as orthodox and small seeds. The dimensions evaluated, as well as the small amplitude of variation, confirmed the homogeneity of the lot. The seeds have associated to 10 fungi genera and presented 86% germination. In the absence of sucrose, higher averages of root formation and length were observed (57.14 % and 2.79 cm respectively). Regardless of the concentration of agar, the presence of vermiculite favored the formation of roots (17.46 versus 3.2%) and regardless of sucrose concentrations, vermiculite impaired the quality of the root system (0.46 versus 2.41 cm and 9.51 versus 1.59% for length and secondary roots respectively). The results observed for calogenesis indicated that the presence of vermiculite in the culture medium is controversial, varying according to the composition of the nutritive medium, with respect to agar and sucrose. After 60 days of *in vitro* culture the highest mean (59.83%) of rhizogenesis was observed for the species. The physical characteristics of the seed lot are within the standard registered in the literature. The pH levels and agar concentrations do not influence *in vitro* rhizogenesis. The absence of sucrose promotes greater root formation, in addition to greater length. The presence of vermiculite increases the rooting, however it negatively affects the quality of the root system. Addition of the substrate affects the calogenesis, varying according to the composition of the nutritive medium used. The nutritive medium does not influence the *in vitro* rhizogenesis, but the period of growth is relevant, presenting at 60 days a greater formation and length of roots as well as of secondary roots.

Keywords: Forestry species. Physical, sanitary and physiological seed quality. Sucrose. Vermiculite. Culture period.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento (A), largura (B) e espessura (C) do lote de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert do ano de 2012.....34
- Figura 2 – Porcentagem de germinação do lote de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert do ano de 2012 avaliada aos sete, 14, 21 e 28 dias.....37
- Figura 3 – Formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM/2 em função da ausência (A) ou presença (B) de vermiculita, independentemente das concentrações de ágar.....41
- Figura 4 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM/2: na ausência de sacarose e na ausência (A) e na presença (B) do substrato vermiculita (30 cm³); na presença de sacarose a 30 gL⁻¹ e na ausência do substrato vermiculita (C).....45
- Figura 5 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 30 (A) e 60 (B) dias de cultivo, independentemente dos meios nutritivos utilizados..48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comprimento, largura e espessura (mm) do lote de sementes de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert do ano de 2012	33
Tabela 2 –	Média de incidência (%) dos gêneros fúngicos identificados no lote de sementes de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert do ano de 2012	36
Tabela 3 –	Porcentagem de formação de raízes e de calogênese na base em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio WPM/2 em função da presença ou ausência do substrato vermiculita, independentemente das concentrações de ágar	39
Tabela 4 –	Porcentagem de formação de raízes e comprimento de raízes em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo WPM/2 em função das diferentes concentrações de sacarose, independentemente da presença ou ausência de vermiculita.....	42
Tabela 5 –	Comprimento de raízes, porcentagem de formação de raízes secundárias e de calos na base em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio WPM/2 em função da presença ou ausência do substrato vermiculita, independentemente das concentrações de sacarose	44
Tabela 6 –	Porcentagem de formação de raízes, comprimento de raízes e de formação de raízes secundárias em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert em função do período de cultivo <i>in vitro</i> , independentemente dos meios nutritivos utilizados	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT	14
3.2	QUALIDADE DE SEMENTES	17
3.3	CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS: MICROPROPAGAÇÃO	19
3.4	RIZOGÊNESE <i>IN VITRO</i> EM ESPÉCIES LENHOSAS.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	QUALIDADE DE SEMENTES	24
4.1.1	Determinação do grau de umidade.....	24
4.1.2	Determinação do peso de mil sementes	24
4.1.3	Aspecto biométrico	25
4.1.4	Qualidade sanitária	25
4.1.5	Germinação.....	26
4.2	RIZOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	27
4.2.1	Obtenção dos explantes	27
4.2.2	Efeito do pH e vermiculita	27
4.2.3	Efeito do ágar e vermiculita.....	28
4.2.4	Efeito da sacarose e vermiculita	28
4.2.5	Efeito do meio nutritivo e do período de cultivo	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	QUALIDADE DE SEMENTES	31
5.1.1	Determinação do grau de umidade.....	31
5.1.2	Determinação do peso de mil sementes	32
5.1.3	Aspecto biométrico	33
5.1.4	Qualidade sanitária	35
5.1.5	Germinação.....	37
5.2	RIZOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	38
5.2.1	Efeito do pH e vermiculita	38
5.2.2	Efeito do ágar e vermiculita.....	39
5.2.3	Efeito da sacarose e vermiculita	41
5.2.4	Efeito do meio nutritivo e do período de cultivo	46
6.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A exploração de recursos naturais ocorre no Brasil desde o início de sua colonização. A expansão urbana e de atividades agropecuárias, industriais e de infraestrutura, sem planejamento e controle, como forma de desenvolvimento econômico, consolidaram os danos aos ambientes florestais de todo o território nacional, afetando os diversos biomas do país. Atendendo às necessidades de recuperação desses ambientes, de minimização de perdas e de aprimoramento de formas de desenvolvimento mais sustentáveis, se faz necessária a expansão de projetos bem estruturados de restauração e de formas produtivas e eficientes de obtenção de produtos de origem florestal, aumentando a demanda por espécies nativas.

Ao contrário das espécies florestais de uso estritamente comercial, invariavelmente exóticas, as nativas apresentam peculiaridades diversas e grande heterogeneidade entre populações e indivíduos, inclusive entre àqueles de mesma espécie, o que dificulta sua produção em maior escala e com equilíbrio de qualidade, mas oportuniza a realização de uma vasta gama de pesquisas. O êxito na utilização de espécies nativas depende, além do conhecimento de seus requerimentos silviculturais, do domínio de técnicas de propagação eficientes e do aperfeiçoamento no sistema de produção de mudas. Nesse sentido, as técnicas de cultura de tecidos podem viabilizar a obtenção de matérias primas com maior qualidade e menores custos.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação se destaca devido à possibilidade de multiplicação das espécies, incluindo àquelas que apresentam dificuldades de serem propagadas de forma convencional, devido a recalcitrância ou dormência das sementes. Assim, essa técnica se apresenta como método modelo para o crescimento da produtividade e da qualidade das mudas, em menor tempo e com espaço reduzido.

Entre as espécies nativas com potencial de uso em projetos de restauração e de micropropagação, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert, conhecida popularmente na região sul do Brasil como canafístula, tem ocorrência em áreas que abrangem diversos biomas, incluindo a Mata Atlântica, a Caatinga, o Cerrado e o Pantanal (LEWIS, 2013). A canafístula atua como pioneira e secundária inicial, ocorrendo em mata ciliares, clareiras, bordas e suportando solos úmidos ou bem

drenados (DURIGAN et al., 1997), fatores que ajudam a justificar seu desenvolvimento em diversas regiões do país. Em nosso Grupo de Pesquisa já foram desenvolvidos estudos com essa espécie, objetivando otimizar o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*, a partir de explantes de origem seminal, e que abrangem desde a análise de métodos para superação de dormência das sementes (BASSAN, 2006) até o enraizamento e aclimatização de miniestacas (CURTI, 2014), contemplando, portanto, todas as etapas do processo de micropropagação. Entretanto, ainda não foi desenvolvido um protocolo otimizado para *P. dubium*, o que justifica o presente trabalho.

Para estabelecer protocolos de micropropagação de plantas lenhosas, os explantes utilizados podem ser oriundos de plantas germinadas *in vitro*. A utilização de sementes como fontes de explantes tende a ser mais viável sob o ponto de vista fisiológico e experimental, devido ao estágio juvenil e sanidade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), além da possibilidade no aumento da taxa de germinação quando realizada *in vitro*. Adicionalmente, a variabilidade genética presente em um lote de sementes de espécies alógamas ou com sistemas mistos de cruzamento, possibilita a ampliação da probabilidade de sucesso da metodologia, haja vista que avaliação é efetuada para uma ampla gama de genótipos (GOLLE et al., 2014). Assim, as características das sementes utilizadas como doadoras de explantes podem influenciar uma etapa fundamental do processo de micropropagação, o estabelecimento *in vitro*, que consiste na retomada do crescimento dos fragmentos vegetais, sendo, portanto, muito importante a avaliação da qualidade física, fisiológica e sanitária do lote de sementes para que se obtenha êxito no processo de propagação.

Da mesma maneira, a penúltima etapa da propagação *in vitro*, antes da aclimatização da planta, o enraizamento, é também fundamental, pois a uniformidade e funcionalidade do sistema radicular possibilitarão a sustentação da planta no solo e sua sobrevivência *ex vitro*. Nesse sentido, estudos anteriores realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa mostraram que, para além da utilização de fitorreguladores, os meios nutritivos, seus componentes, bem como o emprego associado de substratos, como a vermiculita, por exemplo, podem influenciar de maneira significativa a rizogênese *in vitro* e a qualidade do sistema radicular em brotações de *P. dubium* (REINIGER et al., 2016; CURTI; REINIGER, 2014).

Em virtude da importância ambiental e científica exercida pela espécie e pela utilização da técnica de micropropagação, o presente trabalho teve como finalidade

avaliar a qualidade de sementes de um lote de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert para emprego como doador de explantes e analisar o efeito de fatores relacionados ao meio nutritivo e de cultivo (este referindo-se à associação entre meio nutritivo e vermiculita) na formação *in vitro* de raízes dessa espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de micropropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em particular da etapa de rizogênese *in vitro* das brotações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, em relação a aspectos da qualidade física, sanitária e fisiológica, o lote de sementes de *Peltophorum dubium* utilizado como doador de explantes para experimentos de rizogênese *in vitro*.
- Avaliar o efeito dos diferentes níveis de pH e da presença do substrato vermiculita no meio nutritivo sobre a rizogênese *in vitro*.
- Analisar o efeito de diferentes concentrações de ágar e da presença do substrato vermiculita no meio nutritivo sobre a rizogênese *in vitro*.
- Analisar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e da presença do substrato vermiculita no meio nutritivo sobre a rizogênese *in vitro*.
- Analisar o efeito de diferentes meios de cultivo (meios nutritivos MS, WPM, MS/2, WPM/2 combinados à vermiculita) sobre a rizogênese *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

A espécie arbórea *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinoidea, é conhecida comumente, de acordo com a região de ocorrência, como canafístula, angico-cangalha, angico-amarelo, faveiro, tamboril, acari (CARVALHO, 2003). Frequente no domínio da floresta estacional semidecidual, sendo abundante em formações secundárias (LORENZI, 1992), ocorre no Brasil do estado da Paraíba ao Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2003).

Devido às características marcantes de rápido crescimento e rusticidade (DONADIO; DEMATTÊ, 2000), é habitualmente encontrada colonizando pastagens, ocupando clareiras e bordas de matas, o que a torna espécie potencial na composição de reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992). Possui pouca exigência em relação à fertilização química, o que permite seu desenvolvimento em vários tipos de solo (CARVALHO, 2003).

A madeira dessa espécie é dura, moderadamente pesada e de longa duração. Essas qualidades lhe conferem valor econômico, propiciando seu emprego na construção civil, indústria de móveis, construção naval, marcenaria e carpintaria (MATTEI; ROSENTHAL, 2002). A canafístula, por ser medianamente tolerante ao frio pode ser usada para a arborização urbana, pois além de muito ornamental quando em florescimento, proporciona ótima sombra quando isolada, tendo uma altura estimada entre 15-40m (PIROLI *et al.*, 2005).

O processo reprodutivo da espécie inicia-se entre 8 e 12 anos (NAKAGAWA *et al.*, 2010), com a propagação ocorrendo predominantemente via sementes, as quais se dispersam de modo anemocórico (LORENZI, 2002). A produção de sementes é abundante (SALERNO *et al.*, 1996), porém apresentam forte dormência tegumentar, o que torna a germinação baixa e irregular caso não haja submissão a tratamento para superação de dormência, o qual, quando aplicado, aumenta o poder germinativo em até 95% (CARVALHO, 2003).

A superação da dormência ocorre por meio de um estresse aplicado à semente que permita a entrada de água e a consequente germinação (HARTMANN; KESTER,

1967). Em ambientes naturais esse processo ocorre pelo aumento na temperatura do solo por ocasião da abertura de clareiras na floresta. Para a obtenção de mudas, são sugeridos tratamentos de escarificação mecânica, cortando-se o tegumento na região oposta àquela em que ocorre a protrusão da radícula (CARVALHO, 2003); química, através do uso de ácido sulfúrico concentrado (CAPELANES, 1991; GUERRA et al., 1982; BIANCHETTI; RAMOS, 1982); ou pela imersão das sementes em água quente (100°C) (SALERNO et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2003). Entre 15 e 30 dias ocorre a emergência da plântula e o desenvolvimento das mudas é rápido, sendo consideradas prontas para o plantio no local definitivo em 4 a 5 meses (LORENZI, 2002).

A existência de dormência nas sementes, acarretando em germinação lenta e irregular suscitou a necessidade de investigar a multiplicação de *P. dubium* por meio de técnicas de propagação vegetativa, inicialmente via micropropagação, e utilizando-se explantes isolados de plântulas obtidas via germinação *in vitro* de sementes de maneira a desenvolver protocolos potencialmente aplicáveis à variabilidade genética existente na espécie. Os primeiros estudos realizados demonstraram a potencialidade da espécie para a micropropagação por meio da emissão de gemas laterais (BASSAN, 2006), sendo que, a partir desse resultado, o Grupo de Pesquisa Desenvolvimento de Germoplasma investiu na continuidade das pesquisas no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, ligado ao Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria, a fim de gerar informações que permitissem uma otimização da micropropagação de *P. dubium*, sendo os principais resultados obtidos com esses estudos sintetizados a seguir.

Para a fase de estabelecimento *in vitro*, o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi considerado mais eficiente que o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e não foram observadas diferenças entre a utilização dos explantes do tipo segmento apical caulinar e segmento nodal (BASSAN, 2006). Na sequência, após avaliar diferentes concentrações do meio nutritivo MS foi verificado que a concentração original de sais é a mais adequada para o estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares de *P. dubium* (FLORES et al., 2011).

No que diz respeito à fase de multiplicação *in vitro*, o Grupo desenvolveu estudos avaliando o efeito de 5 ou 10 µM das citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN), Isopenteniladenina (2iP) ou Thidiazuron (TDZ), e 0,015 µM da auxina Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA), adicionadas ao meio nutritivo MS, obtendo o melhor resultado com TDZ a 10 µM, que resultou em uma média de 73% de explantes

com brotações adventícias emitidas (CURTI et al., 2010). Entretanto, não foi possível obter brotações adventícias sem que ocorresse a formação de calos, o que é indesejável nessa fase de cultivo. Além da multiplicação *in vitro*, a senescência foliar e calogênese na espécie também foram estudadas (CANDIDO, 2013).

Dando sequência às fases da micropropagação, também foram efetuados estudos relacionados à rizogênese *in vitro* com a utilização de substratos alternativos, como vermiculita, areia fina ou Plantmax® adicionados ao meio nutritivo MS, contendo 10 µM de ácido 3-indol butírico (AIB), acrescido ou não de ágar, após 30 ou 60 dias de cultivo *in vitro* (CURTI; REINIGER, 2014). O melhor resultado de formação de raízes, tanto quantitativamente (36,78%) como pela qualidade das raízes, foi obtido no tratamento que incluiu vermiculita, além de MS, aos 60 dias de cultivo. A seguir, foi obtida uma otimização que permitiu a redução no período de cultivo para 30 dias, mantendo-se a média de formação de raízes em torno dos 36%, após testar quatro meios nutritivos (MS, MS/2, WPM e WPM/2), acrescidos de 30 cm³ de vermiculita, na presença (10µM) ou ausência de AIB, e concluir que, nas condições testadas, o meio nutritivo mais adequado para essa fase é o WPM/2 acrescido da auxina (dados não publicados). Finalmente, foi obtida uma otimização na rizogênese que incrementou a média de formação de raízes para 44,43% e dispensou o emprego de sacarose e auxina, mantendo-se o meio de cultivo WPM/2 com 7 g L⁻¹ de ágar e 30 cm³ de vermiculita, porém com período de cultivo de 60 dias. Simultaneamente, foi concluído que esse mesmo tratamento também propicia uma eficiente aclimatização *in vitro* das mudas produzidas (REINIGER et al., 2016).

Da mesma maneira que a micropropagação, a potencialidade da técnica de miniestaquia com propágulos juvenís foi comprovada na produção de mudas de *P. dubium* (CURTI, 2014). O estudo realizado teve como objetivo avaliar o efeito da época de coleta, ácido indolbutírico (AIB) e período de cultivo sobre a rizogênese em miniestacas, bem como avaliar a aclimatização das mudas produzidas. Foram utilizadas miniestacas coletadas, no outono ou no inverno, em um minijardim clonal de origem seminal, tratadas com (0, 1.000, 2.000 ou 4.000 mg L⁻¹) AIB e avaliadas após 30 ou 60 dias de cultivo. Na sequência, miniestacas enraizadas transferidas para casa de vegetação, avaliando-se o efeito dos tratamentos aos quais foram submetidas na rizogênese, após 30, 60 ou 90 dias de cultivo. Na rizogênese tanto miniestacas coletadas no outono quanto no inverno foram consideradas adequadas, devendo o período de cultivo ser estendido para 60 dias. Já na aclimatização, os melhores

resultados foram obtidos com o emprego de propágulos coletados no inverno e que não foram tratados com a auxina, cultivados por 90 dias (CURTI, 2014).

Dando continuidade aos esforços em prol da otimização do protocolo de micropropagação, o presente trabalho descreverá ensaios relacionados à etapa de rizogênese.

3.2 QUALIDADE DE SEMENTES

Os atributos inerentes às sementes determinam seu potencial germinativo e as características de crescimento, definindo sua qualidade (MBORA et al., 2009). Esses atributos podem ser genéticos, físicos, sanitários e fisiológicos, e influenciam a produtividade das plantas (POPINIGIS, 1985; MBORA et al., 2009), o potencial de armazenamento das sementes, o florescimento e a produção (CARVALHO; NAKAGAWA, 1980). A análise de sementes é realizada com o objetivo de conhecer as qualidades das mesmas.

As técnicas usadas para a análise de qualidade de sementes, no Brasil, seguem a metodologia baseada nas Regras para Análise de Sementes (RAS)(BRASIL, 2009), que estão de acordo com as Regras Internacionais da ISTA (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 1993, 1999) e da AOSTA (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS, 1983) (FERREIRA; BORGUETTI, 2004). Para as espécies florestais nativas brasileiras, entretanto, há poucas informações, pois apenas 0,2% delas estão contidas nas RAS, sendo a maioria das prescrições baseadas naquelas estabelecidas para espécies agrícolas (FIGLIOLIA et al., 2007). Amenizando essa situação, Lima Junior (2010) publicou o Manual de Procedimentos para a Análise de Sementes Florestais, que foi lançado no VI Simpósio Brasileiro de Sementes Florestais e XVII Congresso Brasileiro de Sementes, em Natal – RN (WALKER, 2013).

A pureza e a informação genética contida na semente, determinam a sua qualidade genética, sendo transmitidas às futuras plantas e que influenciarão sua adaptabilidade e crescimento (FERREIRA; BORGUETTI, 2004; MBORA et al., 2009). Para determinar a qualidade física são analisadas características como tamanho, teor de umidade, cor, peso de mil sementes, entre outras (MBORA et al., 2009; BRASIL, 2009). A avaliação da qualidade sanitária baseia-se na análise das sementes para detecção de eventuais agentes patogênicos que possam estar associados (BRASIL,

2009). As características que indicam a capacidade da semente em desempenhar funções vitais, como germinação, vigor e longevidade, são analisadas na determinação da qualidade fisiológica das sementes (FIGLIOLIA, 1995; OLIVEIRA, 2012), fornecendo informações a respeito da semeadura e armazenamento das sementes (FIGLIOLIA et al., 2007).

A determinação do teor de umidade das sementes é uma das técnicas mais empregadas para a avaliação da qualidade física da semente. Através dela é possível estabelecer parâmetros adequados para o manejo da colheita e conservação de sementes, tanto ortodoxas, que requerem baixo grau de umidade durante o armazenamento, quanto recalcitrantes, que têm sua viabilidade afetada negativamente quando o teor de umidade está abaixo do nível de segurança (LIMA JUNIOR, 2010). O peso das sementes, determinado através do teste do peso de mil sementes, é influenciado pelo teor de umidade. Utilizado para calcular a densidade de semeadura e o peso da amostra de trabalho para a realização da análise de pureza, está relacionado também ao estado de maturidade e sanidade das sementes (BRASIL, 2009). O controle de qualidade para avaliação de lotes é otimizado com a utilização deste teste (BRUNING et al., 2011). O tamanho das sementes também apresenta informações importante acerca do estudo de qualidade das sementes de uma espécie, sendo um parâmetro básico para entender a dispersão e o estabelecimento de plântulas (FENNER, 1993). Além de ser utilizado para diferenciar espécies pioneiras e não pioneiras em florestas tropicais (BASKIN; BASKIN, 1998), o tamanho das sementes pode indicar maior ou menor vigor quando comparadas entre si e sendo provindas de um mesmo lote (POPINIGIS, 1985). Sementes maiores supostamente seriam aquelas que receberam maior quantidade de assimilados durante o seu desenvolvimento, apresentando embriões bem formados, com maiores reservas nutritivas, sendo, potencialmente, mais vigorosas (GRAY et al., 1986).

A sanidade da semente refere-se primeiramente à presença ou ausência de agentes patogênicos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides. Entretanto, pode também indicar anomalias advindas de alterações nutricionais e condições climáticas adversas (BRASIL, 2009). O grupo dos fungos, mais numeroso, ganha ênfase nos estudos relacionados à associação de organismos patogênicos nas sementes, em decorrência da fácil disseminação desses micro-organismos (CHEROBINI, 2006). Para a obtenção de uma muda ótima, se faz necessário o controle da qualidade

sanitária das sementes utilizadas, pois a disseminação e propagação de patógenos pode dizimar plantações inteiras de ecossistemas (MENDES, 2006).

O teste de germinação, usado na análise da qualidade fisiológica da semente, tem por finalidade a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, em laboratório, demonstrando sua viabilidade para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009). A dormência das sementes deve ser levada em conta, pois as sementes dormentes são vivas, mas não são viáveis, devido à interferência de mecanismos de bloqueio à germinação, existindo a possibilidade do teste não permitir distinguir as sementes vivas e dormentes das vivas e viáveis (MARCOS FILHO, 2005). As vantagens do uso de sementes com elevado potencial fisiológico incluem germinação rápida e uniformidade, plântulas mais tolerantes às adversidades ambientais e maturidade mais uniforme da cultura (BENNETT, 2001).

3.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS: MICROPROPAGAÇÃO

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como a produção em ambiente artificial, sob condições assépticas e controladas, de células vegetais isoladas, tecidos ou órgãos, capazes de originar plantas inteiras, diretamente do explante ou, indiretamente, através de calos. O cultivo *in vitro* é um procedimento relevante na propagação de diferentes espécies (LEDO, 2007).

Baseada no mesmo princípio das técnicas clássicas de propagação vegetativa, a cultura de tecidos tem sua base fisiológica apoiada na teoria da totipotência vegetal, fenômeno representado pela capacidade potencial de células ou tecidos vegetais formarem todos os tipos de células e/ou regenerar plantas inteiras (VALOIS et al., 1996). Trata-se de uma biotecnologia, composta por vários métodos de propagação vegetal em laboratório. Essas técnicas têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas através do melhoramento, contribuindo de acordo com os objetivos e com as características biológicas da espécie alvo (FERREIRA et al., 1998).

A aplicação de suas técnicas pode resolver ou minimizar entraves referentes à propagação das espécies florestais nativas do Brasil, através da multiplicação sistematizada de plantas, do intercâmbio de material genético, resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado, da redução no período de

germinação, isenção de pragas e doenças e uniformização nas plântulas obtidas (MELO, 2000).

Além dos aspectos do melhoramento genético das plantas, a cultura de tecidos é amplamente utilizada na propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação, aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos, acelerando os métodos convencionais de propagação vegetativa (DONATO et al., 2005). Seu destaque se deve à rápida produção de mudas saudáveis num espaço físico reduzido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Essa configuração torna essencial o aprimoramento constante dos processos de multiplicação *in vitro* e o controle de qualidade das mudas, aliado à redução de custos (NIETSCHE et al., 2006).

Englobando diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culmina com a aclimatização da microplanta, através de condições de manuseio assépticas. A retirada de um explante de um organismo íntegro, e sua colocação no meio de cultura que contém nutrientes e reguladores de crescimento, ativam a capacidade celular de desdiferenciação e o genoma pode expressar-se de outras formas, conduzindo-o a novos padrões (BASTOS, 2007).

A micropropagação tornou-se a saída para o cultivo de muitas plantas que possuem limitações na propagação sexuada. A maior sobrevivência no campo, crescimento mais rápido nos primeiros estágios de desenvolvimento, florescimento até quatro meses antes, além da uniformidade de produção, são vantagens das plantas micropropagadas quando comparadas às oriundas de propagação convencional, proporcionando colheitas superiores (LIMA; MORAES, 2006).

As principais dificuldades encontradas para micropropagar espécies arbóreas podem ser atribuídas às condições fisiológicas dos explantes oriundos de plantas adultas. A taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimação são fatores que influenciam no sucesso da técnica, medido pela taxa de sobrevivência e do desenvolvimento das plantas regeneradas no campo ou em seu habitat (NOLETO; SILVEIRA, 2004). Uma das limitações apresentadas na cultura de tecidos de plantas lenhosas é o enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro*, devido ao desconhecimento do processo de rizogênese da maioria dessas espécies (TORRES et al., 1998).

3.4 RIZOGÊNESE *IN VITRO* EM ESPÉCIES LENHOSAS

Para que uma muda possa se estabelecer no solo, o sucesso do enraizamento das culturas geradas pelo cultivo *in vitro* dos explantes é um pré-requisito para qualquer protocolo de micropropagação (PATI et al., 2006). Entretanto, para a maioria das espécies lenhosas, a elucidação do processo de rizogênese ainda não foi conseguida. A complexidade dos fatores que controlam a formação de raízes adventícias, bem como a interação existente entre eles e a dificuldade de isolá-los e caracterizá-los, tornam-se obstáculos no conhecimento adequado desse processo (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). A rizogênese na micropropagação pode depender de vários fatores endógenos e exógenos, que quando analisados separadamente ou combinados, mostram efeitos significativos no enraizamento de algumas espécies (COUVILLON, 1988).

O enraizamento *in vitro* caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As raízes adventícias podem formar-se nas partes aéreas das plantas, em caules subterrâneos, em hipocótilos de plantas jovens, não tendo origem na radícula do embrião ou na raiz principal por ela formada (FILHO, 1993). O processo de formação de raiz adventícia ocorre de uma a três semanas, podendo ser dividido nas fases de indução, iniciação e alongação. Nas fases iniciais, existe geralmente uma dependência de auxinas, substância que pode, entretanto, inibir o crescimento (alongação) das raízes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para espécies lenhosas, porém, as dificuldades no método de rizogênese se ampliam, pois muitas não obtêm êxito no desenvolvimento do sistema radicular mesmo na presença de auxinas (SOARES et al., 2006).

Entre os principais fatores que influenciam o enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, destacam-se os níveis de auxina endógena, as condições intrínsecas à planta matriz, a juvenilidade do material, o meio nutritivo, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição, a presença de poliaminas e de substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das brotações *in vitro*, dentre outros (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Alterações na composição dos meios nutritivos e seus componentes podem auxiliar na obtenção de resultados mais promissores na formação de raízes. Nesse sentido, vêm sendo observado em diversos trabalhos que o ágar, componente

utilizado na gelificação dos meios, pode formar um sistema radicular quebradiço e desprovido de pelos radiculares (JAY-ALLEMAND et al., 1992; VIAGANÓ et al., 2007), influenciando na aclimatização das plantas (HOFFMANN et al., 2001). Como alternativa para o melhor desenvolvimento do sistema radicular, substratos inertes como a vermiculita têm sido indicados pela propriedade de melhorar a aeração e favorecer o desenvolvimento das raízes adventícias. As raízes desenvolvidas em vermiculita possuem pêlos absorventes, córtex mais compacto e espaços intercelulares menores, características semelhantes às raízes de plantas obtidas através de sementes (SIMÕES, 2000). Em brotações de *P. dubium*, os melhores resultados, tanto para a porcentagem de formação *in vitro* de raízes (36,78%) quanto para a qualidade do sistema radicular, foram obtidos com a utilização de vermiculita, combinada ao meio nutritivo MS acrescido de 10 μ M de AIB, e ágar (CURTI, 2011; CURTI; REINIGER, 2014).

O pH do meio nutritivo também pode intervir nesse processo, dependendo da espécie em estudo (EBRAHIM et al., 2000). O pH regula a acidez, o que também afeta a consistência do meio de cultura, que quando autoclavado em pH abaixo de 4,5 sofre um processo hidrólise do ágar, impedindo a sua polimerização ao esfriar. Além de interferir na textura do meio, esse processo pode aumentar a absorção de água pelos tecidos das plântulas, devido ao cultivo em meio mais aquoso (STOLTZ, 1971; WILLIAMS; LEOPOLD, 1989). O pH em torno de 5,7 é o mais utilizado para as culturas propagadas *in vitro* (XAVIER et al., 2009). Os valores de pH em torno de 5,6 a 5,8 disponibilizam facilmente os íons em solução para as células. Em condições naturais, valores próximos a esses envolvem as células vegetais (CANHOTO, 2010).

Os açúcares também constituem parte importante do processo de formação de raízes *in vitro*, pois o carbono exógeno no meio nutritivo serve como fonte de energia (DA CUNHA et al., 2009). A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos e, geralmente, sua concentração é de 30g.L⁻¹ (SANTOS, 2003). Nesse sentido, estudos sobre os níveis de concentração de sacarose no meio nutritivo podem fornecer informações importantes sobre sua influência no processo de rizogênese.

No meio nutritivo, os sais minerais empregados em sua composição, podem interferir no sistema de enraizamento. O meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) possui alta concentração de sais, podendo inibir o enraizamento *in vitro*, mesmo na presença de auxinas (MCCOWN, 1988). Diluições ou o uso de meios básicos

menos concentrados, como o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), podem possibilitar melhores resultados para muitas espécies de plantas (ALOUFA, 2003). Curti (2014), testando o efeito de diferentes meios nutritivos contendo AIB na rizogênese *in vitro* em brotações de *P. dubium*, aferiu que a utilização do meio nutritivo WPM reduzido à metade da sua concentração de sais (WPM/2), com 30 g L⁻¹ de vermiculita, possibilita que ocorra a formação de raízes mesmo sem a utilização de AIB (6,60 %). Porém, ocorre maior formação de raízes (36,30 %) quando da presença da auxina exógena.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS. O lote de sementes utilizado foi coletado e armazenado pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, e são provenientes da produção de 2012. Na UFSM, permaneceram armazenadas em frascos de vidro contendo sílica gel, acondicionadas na geladeira sob temperatura de 8-10 °C até seu emprego nos experimentos descritos a seguir.

4.1 QUALIDADE DE SEMENTES

4.1.1 Determinação do grau de umidade

O teste de umidade foi realizado conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), empregando-se o método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 h. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições de 4,5 g de sementes. Como recipiente foram utilizadas placas de petri, medindo 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura, devidamente vedadas.

A porcentagem de umidade foi calculada aplicando-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ de Umidade } (U) = \frac{100 (P - p)}{P - t}$$

Em que: P = massa inicial, constituída pela massa do recipiente mais a massa da semente úmida; p = massa final, constituída pela massa do recipiente mais a massa da semente seca; t = tara, massa do recipiente. Os resultados foram expressos em porcentagem, com base na massa das sementes úmidas.

4.1.2 Determinação do peso de mil sementes

O peso de mil sementes foi determinado utilizando-se oito repetições de 100 sementes, conforme as RAS (BRASIL, 2009). Cada repetição foi pesada em balança analítica e calcularam-se a média, o desvio padrão e o índice de variação ($IV = CV / \sqrt{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições) dos valores

obtidos nas pesagens. O resultado da determinação foi calculado multiplicando-se por 10 o peso médio obtido nas oito repetições de 100 sementes.

4.1.3 Aspecto biométrico

Para a determinação do aspecto biométrico, 100 sementes amostradas aleatoriamente foram medidas, com o auxílio de paquímetro digital, com precisão de 0,01 mm, em relação ao comprimento, espessura e largura, sendo todas expressas em milímetros (mm), sendo que as duas últimas medidas foram tomadas a partir do centro da semente. Para cada dimensão, foram calculados a média, o desvio padrão e o índice de variação. Os dados foram classificados por meio de distribuição de frequência e plotados em histogramas, procedimento de acordo com o relatado por Valadares et al. (2009).

4.1.4 Qualidade sanitária

O ensaio visando à avaliação da qualidade sanitária de sementes de *P. dubium* foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM, utilizando o método “blotter test”, conforme recomendações das RAS (BRASIL, 2009).

Foram utilizadas quatro repetições com 25 sementes cada, totalizando 100 sementes, as quais foram distribuídas e analisadas em delineamento inteiramente casualizado. As sementes foram inoculadas sobre duas folhas de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada, dentro de caixas plásticas do tipo “gerbox”, com dimensões de 11cm x 11cm x 3cm, previamente desinfestadas usando-se algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). A inoculação foi realizada com o auxílio de pinças, previamente autoclavadas e desinfestadas em solução de NaClO a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, as caixas foram fechadas e inseridas em sacos plásticos, para evitar a perda de umidade, e na sequência, foram acondicionadas em sala de cultivo com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A avaliação da sanidade foi realizada aos sete dias, identificando-se os gêneros fúngicos através da observação das sementes individualmente com a utilização de

microscópio estereoscópio. Foi determinada, em porcentagem, a incidência dos gêneros fúngicos no respectivo lote de sementes.

4.1.5 Germinação

O teste de germinação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo oito repetições de 25 sementes, e realizado seguindo as recomendações das RAS (BRASIL, 2009). Inicialmente, as sementes foram submetidas à superação de dormência através de escarificação mecânica com lixa nº 100 na região oposta ao embrião. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, passaram por processo de desinfestação superficial em solução de etanol a 70% (v/v) por 30 s e, após em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 % (v/v) por 15 min, passando, então, por triplo enxágue em água destilada e autoclavada.

A desinfestação das caixas plásticas tipo “gerbox” foi efetuada previamente, com o auxílio de algodão embebido em solução de NaClO a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, foram colocadas duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada.

As sementes foram inoculadas com o auxílio de pinças desinfestadas com algodão embebido em solução de NaClO a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Posteriormente à inoculação das sementes, as caixas plásticas foram fechadas e inseridas em sacos plásticos para evitar a perda de umidade. Na sequência, as caixas foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Aos sete, 14, 21 e 28 dias foi realizada a avaliação, observando-se a variável germinação, considerada como a emissão de radícula, expressa em porcentagem.

Todos os dados obtidos nos ensaios 4.1.1 até 4.1.5 foram analisados em planilha eletrônica Excel.

4.2 RIZOGÊNESE *IN VITRO*

4.2.1 Obtenção dos explantes

Inicialmente, as sementes foram submetidas à superação de dormência e desinfestação superficial conforme descrito anteriormente, em 4.1.5. Visando à germinação *in vitro*, as sementes, em número de três, foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio ágar-água a 0,7% (p/v), previamente autoclavado por um período de 40 min a 120 °C e 1 atm. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 15 a 20 dias, os epicótilos das plântulas germinadas *in vitro* foram isolados e cultivados em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 1 gL^{-1} de carvão ativado e 7 gL^{-1} de ágar, previamente autoclavado por 15 min a 120 °C e 1 atm, sendo colocados três explantes por frasco. A vedação dos frascos e as condições de cultivo foram as mesmas descritas no parágrafo anterior. O cultivo foi realizado até quando as brotações apresentaram de um a três pares de folhas, momento em que foram utilizadas nos experimentos descritos a seguir.

4.2.2 Efeito do pH e vermiculita

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 3x2, sendo os tratamentos constituídos da combinação de diferentes valores de pH (4,8; 5,8; ou 6,8) a que o meio nutritivo foi ajustado e da presença (30 cm^3) ou ausência de vermiculita. Essa combinação entre meio nutritivo e o substrato vermiculita será referida doravante como meio de cultivo. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo 'Wood Plant Medium' - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2) e três brotações cada, obtidas como descrito anteriormente (4.2.1). Foram utilizadas sete repetições por tratamento.

Ao meio nutritivo utilizado foram acrescidos 30 gL^{-1} de sacarose e 50 mgL^{-1} de mio-inositol. O pH foi ajustado conforme o tratamento antes da inclusão de ágar (7 gL^{-1}), e, posteriormente, adicionada a vermiculita pré-autoclavada, conforme o

tratamento. Os frascos contendo os meios de cultivo foram esterilizados por meio da autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 min. A vedação dos frascos e as condições de cultivo foram as mesmas descritas anteriormente.

Após 30 dias de cultivo, as brotações foram transferidas para meio fresco de composição idêntica àquela utilizada anteriormente. As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

4.2.3 Efeito do ágar e vermiculita

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 3x2, sendo os tratamentos constituídos da combinação de diferentes concentrações de ágar (4,0; 5,5 ou 7,0 gL⁻¹) a que o meio nutritivo foi ajustado e da presença (30 cm³) ou ausência de vermiculita. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo WPM/2 e três brotações, obtidas como descrito anteriormente (4.2.1). Foram utilizadas sete repetições por tratamento.

Ao meio nutritivo utilizado foi acrescentado 30 gL⁻¹ de sacarose e 50 mgL⁻¹ de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar (conforme o tratamento) e, posteriormente, adicionada a vermiculita pré-autoclavada conforme o tratamento. Os frascos contendo os meios nutritivos foram esterilizados por meio da autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 min. A vedação dos frascos e as condições de cultivo foram as mesmas descritas anteriormente.

Após 30 dias de cultivo, as brotações foram transferidas para meio fresco de composição idêntica àquela utilizada anteriormente. As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

4.2.4 Efeito da sacarose e vermiculita

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 3x2, sendo os tratamentos constituídos da combinação de diferentes

concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 gL⁻¹) a que o meio nutritivo foi ajustado e da presença (30 cm³) ou ausência de vermiculita. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo WPM/2 e três brotações, obtidas como descrito anteriormente (4.2.1). Foram utilizadas sete repetições por tratamento.

Ao meio nutritivo utilizado foi acrescido sacarose conforme os tratamentos e 50 mgL⁻¹ de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar (7 gL⁻¹) e, posteriormente, adicionada a vermiculita pré-autoclavada conforme o tratamento. Os frascos contendo os meios nutritivos foram esterilizados por meio da autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 min. A vedação dos frascos e as condições de cultivo foram as mesmas descritas anteriormente.

Após 30 dias de cultivo, as brotações foram transferidas para meio fresco de composição idêntica àquela utilizada anteriormente. As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

4.2.5 Efeito do meio nutritivo e do período de cultivo

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial (4x2), em que o fator “A” consistiu dos diferentes meios nutritivos (MS, WPM, MS/2, WPM/2) e o fator “B”, do período de cultivo (30 ou 60 dias). Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo, conforme o tratamento, e três brotações, obtidas como descrito anteriormente (4.2.1), sendo utilizadas 10 repetições por tratamento.

Aos meios nutritivos utilizados foram acrescidos 100 mgL⁻¹ (meios MS e WPM) ou 50 mgL⁻¹ (meios MS/2 e WPM/2) de mio-inositol e não houve adição de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar (7 gL⁻¹). Posteriormente, foram adicionados 30 cm³ de vermiculita pré-autoclavada em todos os tratamentos. Os frascos contendo os meios nutritivos foram esterilizados por meio da autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 min. A vedação dos frascos e as condições de cultivo foram as mesmas descritas anteriormente.

Após 30 dias de cultivo, as brotações foram transferidas para meio fresco de composição idêntica àquela utilizada anteriormente. As avaliações foram realizadas após 30 e 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

Em todos os experimentos de rizogênese *in vitro*, após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Quando o valor de F foi significativo, para a comparação das médias, sempre que necessário, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.6 (FERREIRA, 2011). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUALIDADE DE SEMENTES

5.1.1 Determinação do grau de umidade

As sementes de *P. dubium* do lote avaliado apresentaram grau médio de umidade reduzido ($5,13 \pm 0,61$ %), após armazenamento em refrigerador por três anos até o uso nesse teste. Em trabalho realizado com sementes da mesma espécie, o grau médio de umidade observado foi de 6 % (GUIMARÃES et al., 2011), valor próximo ao observado no presente estudo. Entretanto, foi inferior ao grau mínimo de 7,42 % registrado em outro trabalho que compilou o resultado de 73 análises de umidade de sementes de *P. dubium*, em que o máximo foi 13,57 % (BRÜNING et al., 2011). Todavia, em ambos os estudos citados não houve especificação do período e das condições de armazenamento ao qual as sementes foram submetidas até a realização das análises.

Não diferindo muito da faixa de amplitude dos valores de umidade referidos anteriormente, para um lote de sementes de *P. dubium* coletadas em Santa Maria - RS e analisadas após 11 meses de armazenamento sob refrigeração entre 7 e 9°C, o teor de água médio foi de $11,34 \pm 0,993$ % (ANDRADE, 2013). Da mesma maneira, em estudo realizado com *Enterolobium contortisiliquum*, também da família Fabaceae e com características semelhantes a *P. dubium*, como ortodoxia e dormência, o grau de umidade das sementes íntegras (sem escarificação), foi de 5,02%, em análise realizada após o beneficiamento das sementes e armazenamento em condições naturais até o início das análise (ARAÚJO, 2013).

De acordo com a literatura, *P. dubium* possui sementes com comportamento ortodoxo (EIBL et al., 1994; PEREZ et al., 1999), o que significa que podem ficar armazenadas com baixo teor de umidade por maiores períodos de tempo, sem que sofram danos em seu metabolismo e percam sua viabilidade. A impermeabilidade do tegumento à água, que configura a dormência das sementes da espécie, facilita a manutenção dos baixos teores de água durante o armazenamento (HARRINGTON, 1972). As sementes ortodoxas têm tolerância de até 5% de desidratação no conteúdo de umidade (FARRANT et al., 1993), nível que aumenta a imunidade ao ataque de fungos de armazenamento e eleva a longevidade das sementes (HARRINGTON,

1972; NKANG, 2002). O grau médio de umidade observado nas sementes, no presente trabalho, confirma, portanto, sua classificação quanto ao comportamento fisiológico durante o armazenamento.

5.1.2 Determinação do peso de mil sementes

O peso médio de mil sementes de *P. dubium* foi de $53,12 \pm 0,14$ g (IV=0,93%), o que corresponde a 18.823 ± 47 sementes kg^{-1} , sendo classificadas como sementes pequenas, pois a pesagem de mil sementes é menor que 200 g (BRASIL, 2009). O desvio-padrão e o IV estimados demonstram que a variação existente entre o peso das sementes é pequena, o que pode ser explicado por advirem do mesmo lote, e possuindo, portanto, maior homogeneidade. O peso médio observado no presente trabalho se insere na amplitude de 39,81 a 61,75 g registrados em estudo que compilou os resultados de 75 análises realizadas com sementes da mesma espécie (BRÜNING et al., 2011). Por outro lado, em um lote de sementes de *P. dubium* com grau de umidade de 8,6 %, o peso de mil sementes observado foi de 46,30 g (SENEME et al., 2012), valores respectivamente maiores e menores do que os obtidos no presente estudo, o que indica que esse caráter pode ser influenciado por outros fatores além do grau de umidade (BRASIL, 2009), como, por exemplo, suas características genéticas, as condições ambientais e o estágio de maturação (MARCOS-FILHO, 2005; CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

A classificação das sementes por densidade pode ser utilizada como estratégia para uniformizar a emergência das plântulas, obtendo mudas de tamanho semelhante e/ou de maior vigor. Sementes de maior densidade em uma mesma espécie, são, potencialmente, mais vigorosas do que as menores e de menor densidade, resultando em plântulas mais desenvolvidas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Em um estudo de correlação entre o peso de mil sementes e a germinação de *P. dubium*, a porcentagem de plântulas normais foi altamente dependente do tamanho das sementes, com um coeficiente de correlação linear de Pearson alto, positivo e significativo ($r=0,9276$), relacionando a garantia de uma boa germinação a sementes de maior peso (LÚCIO et al., 2007).

5.1.3 Aspecto biométrico

As sementes de *P. dubium* do lote avaliado apresentaram comprimento médio de $9,54 \pm 0,73$ mm, largura de $4,23 \pm 0,34$ mm e espessura de $1,94 \pm 0,24$ mm, conforme pode ser observado na Tabela 1, juntamente com as medidas mínimas e máximas de cada parâmetro. Os valores dos IV indicam que o lote apresentou pouca amplitude de variação no que diz respeito ao tamanho das sementes, atributo observado também na avaliação do peso de mil sementes, outra determinação da qualidade física de sementes, corroborando com a suposição de maior homogeneidade das sementes pertencentes ao mesmo lote.

Tabela 1 – Comprimento, largura e espessura (mm) de um lote de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert do ano de 2012.

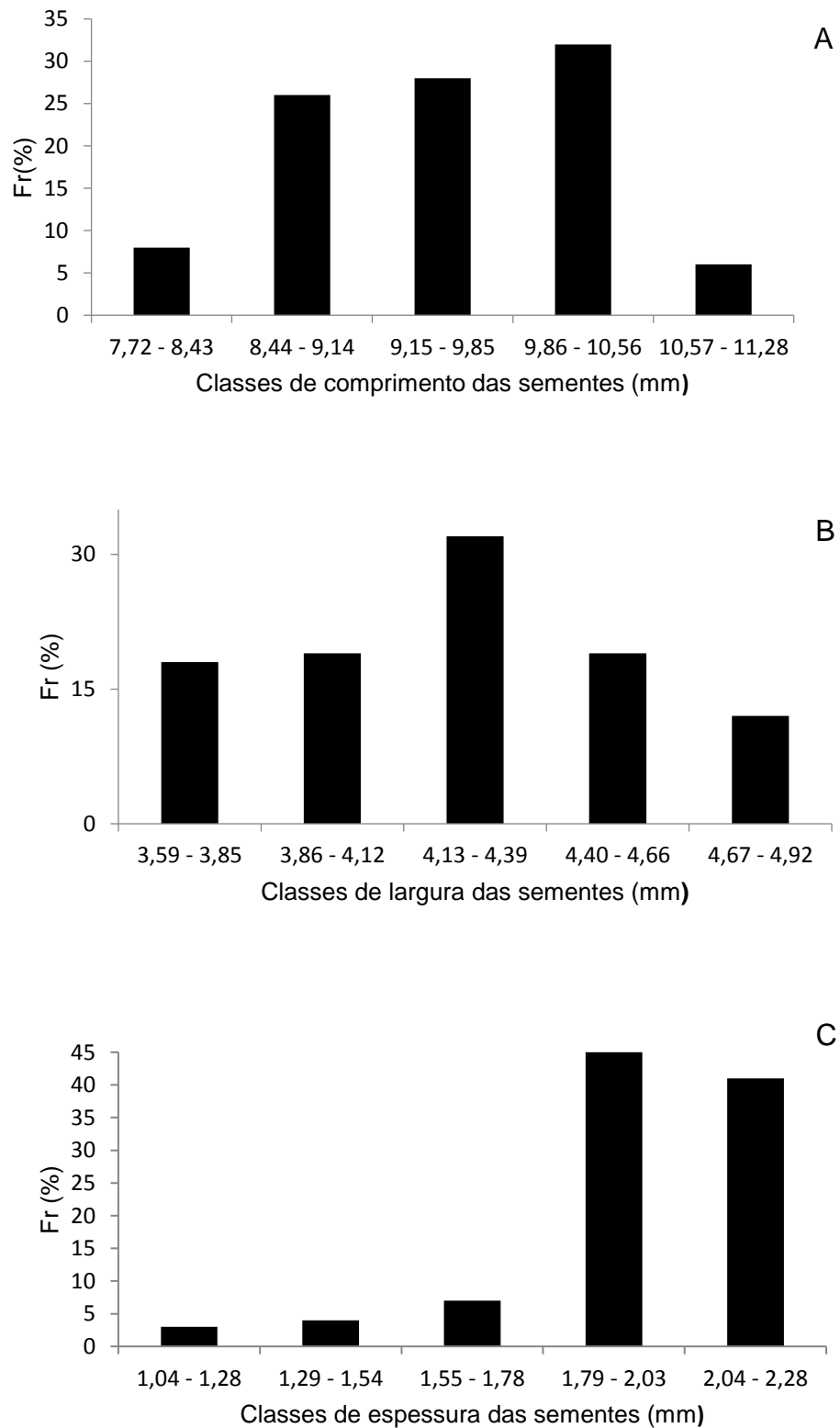
Parâmetro	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)
Mínimo	7,72	3,59	1,04
Máximo	11,28	4,92	2,28
Média	9,54	4,23	1,94
Desvio Padrão	0,73	0,34	0,24
IV (%)	0,77	0,81	1,24

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

IV (Índice de variação) = CV / \sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Em estudo avaliando as características biométricas de sementes de *P. dubium* provenientes de quatro populações distintas, Andrade (2013) observou médias de comprimento (mm) que variaram de $10,63 \pm 0,654$ a $9,699 \pm 0,607$, de largura entre $3,857 \pm 0,265$ e $4,548 \pm 0,275$ e de espessura entre $1,473 \pm 0,129$ e $1,837 \pm 0,177$. Amplitudes diversas foram observadas nas sementes dessa espécie para as medidas (mm) de comprimento e largura, variando de 9 a 12 e de 4 a 6, respectivamente (DONADIO; DEMATTÊ, 2000). A Figura 1 apresenta os histogramas de frequência para comprimento, largura e espessura, em que a amplitude de variação individual desses caracteres é dividida em cinco classes.

Figura 1 – Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento (A), largura (B) e espessura (C) de um lote de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert do ano de 2012.



Os histogramas permitem a visualização mais clara da distribuição das sementes, que leva em conta o número de sementes analisadas. É possível observar que os parâmetros comprimento e largura seguiram uma distribuição simétrica. Por outro lado, a frequência relativa da espessura é assimétrica, haja vista que a grande maioria das sementes (86%) se distribuiu entre as duas maiores classes de espessura. Esses resultados observados podem fornecer indícios a respeito da herança genética desses caracteres quantitativos, em que o comprimento e a largura seriam condicionados por genes de ação aditiva enquanto a espessura, por genes não aditivos (RAMALHO et al., 2012). Entretanto, essa hipótese necessita de confirmação por estudos adicionais.

5.1.4 Qualidade sanitária

O lote de sementes avaliado apresentou 10 diferentes gêneros fúngicos em sua análise, sendo de maior incidência *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., com 51 % e 32 % de sementes infectadas respectivamente. O fungo *Illosporium* sp. apresentou contaminação em 8 % das sementes enquanto os demais (*Pestalotia* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora* sp., *Curvularia* sp., *Pestalotiopsis* sp. *Phialophora* sp.) apresentaram, cada um, média de incidência inferior a 5% (Tabela 2).

Os fungos *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. também foram observados em outro trabalho que analisou três lotes de sementes de *P. dubium* (OLIVEIRA et al., 2003). Já Lazarotto et al. (2013) também analisando sementes da espécie, verificaram maior incidência dos gêneros fúngicos *Aspergillus* sp. (26%) e *Rhizopus* sp. (21%), que não foram identificados no presente trabalho, além de *Curvularia* sp. (13%), *Penicillium* sp. (12%) e *Fusarium* sp. (8%), sendo que os dois últimos foram aqueles de maior associação ao lote de sementes estudado neste trabalho.

Os gêneros *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. podem se comportar como fitopatogênicos, sendo comprovadamente causadores de doenças em sementes de muitas espécies de plantas e podendo ser responsáveis pelas variações existentes na germinação de sementes (CARVALHO; MUCHOVEJ, 1991; MACHADO, 1988). Em sementes de cedro (*Cedrella fissilis*), família Meliaceae, em que três isolados de *Fusarium* sp. provenientes de outras sementes foram inoculados, foi observado decréscimo de 30% na emergência das plântulas (BENETTI, 2009). Em sementes de

sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*), família Fabaceae, foi verificado que *F. solani*, quando inoculado por pulverização na parte aérea de plântulas, causou murcha em 10% dos indivíduos e, também, que *Pestalotiopsis* sp. causou manchas foliares diminutas de coloração branco acinzentada em 6% das plântulas. Em *P. dubium*, em particular, foram verificadas lesões no caule de plântulas provocadas por *Colletotrichum* sp. (SANTOS et al., 2001).

Da mesma maneira, em estudos sobre a micobiota associada às sementes de 18 gêneros de espécies florestais provenientes do Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, foi observada maior frequência do gênero *Fusarium*, que ocorreu em 52,3 % das amostras analisadas e, na maioria das vezes, colonizando as sementes internamente. O trabalho relatou ainda que fungos do gênero *Pestalotiopsis* sp., tidos como patógenos fracos, também estavam associados às sementes da maioria das espécies estudadas (CARNEIRO, 1986).

Tabela 2 – Média de incidência (%) dos gêneros fúngicos identificados no lote de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert do ano de 2012.

-----Gênero fúngico-----					
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Illosporium</i> sp.	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
Média	51,00	32,00	8,00	4,00	3,00
IV	22,27	26,02	35,36	0,00	47,14
-----Gênero fúngico-----					
	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Cercospora</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phialophora</i> sp.
Média	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00
IV	47,14	0,00	0,00	0,00	0,00

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

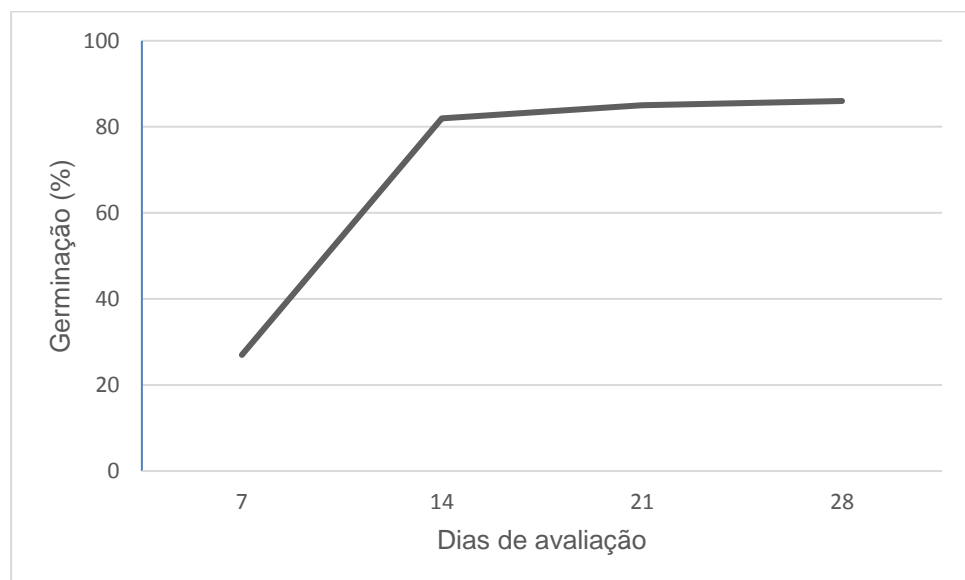
A contaminação de sementes por espécies do gênero *Penicillium* ocorre após a colheita das sementes, no armazenamento, o que pode favorecer a sua deterioração (MACHADO, 1988), enquanto as contaminações por *Fusarium* ocorrem durante a formação ou a maturação do fruto (DHINGRA et al.,1980; MACHADO, 1988). Em

estudo realizado com sementes de cinco espécies florestais (*Cassia macranthera*, *Cedrela odorata*, *Ligustrum japonicum*, *Pinus insulares*, *Tabebuia serratifolia*) fungos do gênero *Penicillium* sp. foram observados em todas as espécies analisadas e com a maior porcentagem de incidência (CARVALHO; MUCHOVEJ, 1991).

5.1.5 Germinação

A germinação das sementes do lote de *P. dubium*, ao final do período de avaliação (28 dias), resultou em uma média elevada (86 %) de sementes germinadas. As análises realizadas aos sete, 14 e 21 dias conferiram médias de 27; 82 e 85% de germinação respectivamente (Figura 2). Aos sete dias, o processo de emissão de radícula já havia iniciado. A baixa diferença entre os valores obtidos aos 14, 21 e 28 dias de avaliação apontam uma estabilização germinação nesse período, indicando que 14 dias são suficientes para as sementes expressarem seu potencial germinativo.

Figura 2 – Porcentagem de germinação do lote de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert do ano de 2012 avaliada aos sete, 14, 21 e 28 dias.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Os valores obtidos corroboram com o fato de que sementes ortodoxas, como as da espécie em questão, permanecem viáveis mesmo após longos períodos de armazenamento, no caso específico, três anos. De maneira semelhante, Donadio e

Demattê (2000), ao analisar a morfologia de plântulas de *P. dubium*, verificaram que, já após cinco dias, sementes colocadas para germinar em substrato rolo de papel, em germinador tipo câmara, apresentaram protusão de radícula.

Em outro estudo com a espécie, a germinação de sementes foi maior que 90 % aos 10 dias de avaliação, em experimento realizado logo após a escarificação das sementes com lixa. Porém, quando as sementes foram armazenadas por 210 dias após o processo de escarificação, a germinação baixou para 87 % em sementes armazenadas em câmara fria a 10 °C e para 25 % naquelas em temperatura ambiente (SENEME, 2012). Tais dados confirmam a tese de que condições de baixas temperaturas são favoráveis ao armazenamento de sementes ortodoxas (DURIGAN et al., 1997).

5.2 RIZOGÊNESE *IN VITRO*

5.2.1 Efeito do pH e vermiculita

As variáveis analisadas não apresentaram efeitos significativo dos fatores principais nem, tampouco, da interação. Para a formação e comprimento de raízes, as médias gerais observadas foram muito baixas (3,99 % e 0,12 cm). A média geral de formação de raízes secundárias foi igualmente muito reduzida (0,79 %), bem como para a variável formação de calos na base (9,52 %). Assim, em brotações de *P. dubium* nas condições do presente ensaio, nem os valores de pH estudados, nem a adição de vermiculita ao meio nutritivo, tampouco as associações entre os dois fatores apresentam efeito sobre a rizogênese *in vitro*.

Contrariamente ao que foi observado no presente estudo, em outros trabalhos com diferentes espécies, houve efeito significativo dos valores de pH sobre a rizogênese. Em brotações de pau-santo (*Kielmeyera coriácea*), família Clusiaceae, enraizadas *in vitro*, os valores de pH de 5,4 e 5,7 resultaram em maior número e comprimento médio de raízes primárias, além de maior emissão de raízes secundárias. Por outro lado, com os valores extremos da faixa de pH testada, 5,1 e 6,3, as raízes observadas foram pouco desenvolvidas (PINTO et al., 1995). Da mesma maneira, para a espécie de orquídea *Miltonia flavescens*, maior enraizamento *in vitro* foi obtido em pH 5,2 (CHAPLA et al., 2009). Em ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), valores de pH próximos a 6,0 são ideais, possibilitando maior desenvolvimento do

número de raízes, do comprimento das brotações, do número de segmentos nodais e maior produção de matéria fresca e seca (NICOLOSO et al., 2008).

5.2.2 Efeito do ágar e vermiculita

A formação de raízes foi influenciada apenas pela vermiculita ($p=0,0340$), ocorrendo maior média quando da presença desse substrato (Tabela 3) adicionado ao meio nutritivo WPM/2. Já o comprimento das raízes e a formação de raízes secundárias não sofreram efeito significativo de nenhum dos fatores e nem da interação entre eles, apresentando médias muito baixas (0,80 cm e 4,76 % respectivamente). A vermiculita proporciona maior aeração ao meio, necessária ao fornecimento de oxigênio para a respiração (LEITE, 1995), fator que pode ter favorecido a formação de raízes no presente ensaio, como pode ser observado na Figura 3, que ilustra as diferenças das brotações na ausência e presença do substrato.

Tabela 3 – Porcentagem de formação de raízes e de calogênese na base em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM/2 em função da presença ou ausência do substrato vermiculita, independentemente das concentrações de ágar.

Vermiculita (cm ³)	Formação de raízes (%)	Calos na base (%)
0,0	3,17 b*	9,52 a
30,0	17,46 a	23,9 b
Média	10,32	16,71
IV	79,73	51,27

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Em outro trabalho com *P. dubium*, o melhor resultado para a formação de raízes foi obtido, igualmente, com a inclusão de vermiculita (30 cm³) e ágar (a 7,0 g L⁻¹), também após 60 dias de cultivo, porém em meio MS, contendo 10 µM de ácido 3-indol butírico (AIB). Esse resultado superior foi observado tanto sob o ponto de vista quantitativo (média de 36,78%) como pela qualidade das raízes, neste caso se referindo ao comprimento das raízes e à formação de raízes secundárias (CURTI;

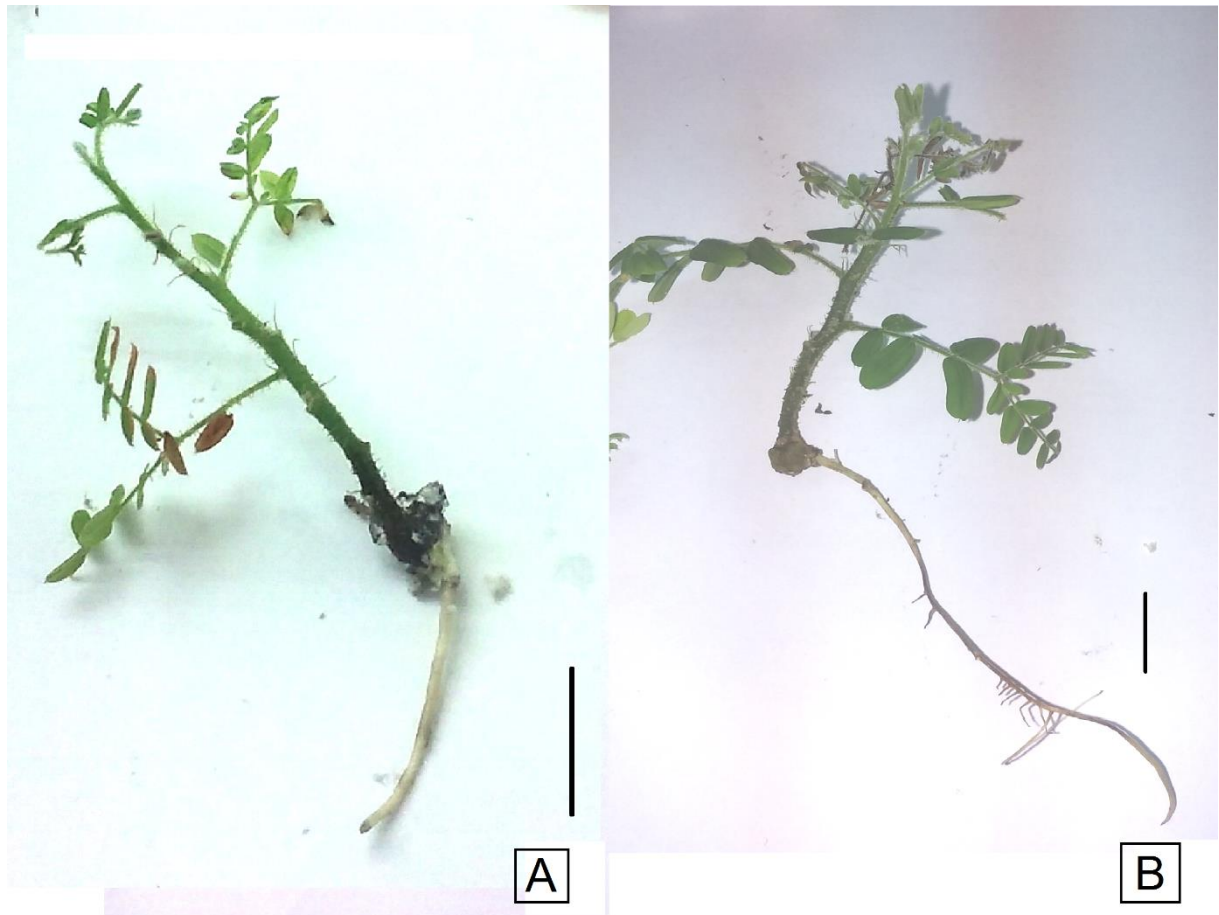
REINIGER, 2014), contrariamente ao que foi verificado no presente estudo, principalmente no que diz respeito aos aspectos qualitativos, mas, também, pela menor média de rizogênese observada, o que pode ser creditado aos diferentes meios nutritivos utilizados e à presença da auxina.

Da mesma maneira, em brotações de porta-enxerto de *Prunus cerasifera* enraizadas *in vitro*, o uso de vermiculita em meio nutritivo MS promoveu uma média superior a 90 %. O mesmo aconteceu com a utilização de ágar (7 g L^{-1}) associado a $4,92 \text{ } \mu\text{M}$ de AIB, que também proporcionou maior comprimento médio das raízes ($4,03 \text{ cm}$) (VIAGANÓ et al, 2007). Também no estudo de cultivo *in vitro* de duas ameixeiras utilizadas como porta-enxertos de *Prunus* sp., o meio $\frac{3}{4}$ MS acrescido de ágar ($5,5 \text{ g L}^{-1}$), vermiculita (10 mL), além de 10 mg L^{-1} de ácido ascórbico e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, foi o que proporcionou maior enraizamento *in vitro* (99,78 %) (TIBOLA et al., 2004).

Igualmente ao que foi observado em relação à formação de raízes, a calogênese na base das brotações apresentou efeito significativo ($p=0,0497$) apenas para a vermiculita (Tabela 3). Entretanto, ao contrário do verificado na rizogênese, a ausência de substrato no meio WPM/2 é que propiciou melhor resultado para a micropropagação, qual seja, menor formação de calos.

O mesmo padrão foi encontrado após 60 dias de cultivo *in vitro* de *P. dubium* em meio MS contendo $10 \text{ } \mu\text{M}$ de AIB, em que os tratamentos que continham vermiculita apresentaram intensa formação calogênica, bem como o tratamento testemunha, contendo ágar (7 g L^{-1}) como agente solidificante (CURTI; REINIGER, 2014). Igualmente, explantes de cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade cv. 'Delite' e *V. corymbosum* L. cv. 'Georgiagem'), família Ericaceae, enraizados em meio nutritivo WPM contendo $7 \text{ } \mu\text{M L}^{-1}$ de AIB, apresentaram intensa formação de calos na base naqueles tratamentos que continham vermiculita, comparado a outros substratos testados (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

Figura 3 – Formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM/2 em função da ausência (A) ou presença (B) de vermiculita, independentemente das concentrações de ágar.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.
Barra = 1 cm.

5.2.3 Efeito da sacarose e vermiculita

Apenas as concentrações de sacarose tiveram influência significativa ($p=0,0000$) na formação de raízes em brotações de *P. dubium*; a vermiculita e a interação entre os fatores principais não apresentaram efeitos sobre essa variável nas condições testadas. A ausência de sacarose no meio nutritivo proporcionou a maior média, diferindo estatisticamente dos tratamentos que incluem sacarose no meio, os quais não diferiram entre si (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de formação de raízes e comprimento de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM/2 em função das diferentes concentrações de sacarose, independentemente da presença ou ausência de vermiculita.

Sacarose (gL⁻¹)	Formação de raízes (%)	Comprimento de raízes (cm)
0	57,14 a*	2,79 a
15	19,05 b	1,47 ab
30	2,38 b	0,05 b
Média	26,19	1,44
IV	28,18	67,22

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Uma possível explicação para os resultados obtidos é que a supressão de sacarose no meio nutritivo estimulou as brotações a desenvolverem seu sistema radicular para buscar uma forma autotrófica de capturar energia, o que é desejável nessa fase do cultivo *in vitro*. Os carboidratos são considerados essenciais no meio nutritivo por fornecerem a energia metabólica necessária durante a respiração. Durante o cultivo *in vitro* os tecidos são capazes de fotossintetizar a taxas muito baixas, precisando estabelecer níveis ótimos de carboidratos externos ao meio para cada tipo de planta (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Além disso, a aclimatização das plantas é um processo delicado, que depende do êxito nas fases anteriores para que haja maior possibilidade de sucesso (CALVETE et al., 2002). A transição do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* pode gerar estresse para a planta, pois há a necessidade de sua adaptação, de um meio heterotrófico, em que a fonte de energia é disponibilizada de forma exógena, para um meio autotrófico, no qual precisa desenvolver o processo de fotossíntese para poder sobreviver, se estabelecer e crescer. Assim, sugere-se adotar na última fase da cultura *in vitro* a diminuição da concentração de sacarose, com o intuito de promover a fotossíntese e habituar a planta à nutrição autotrófica (GRIBAUDO; FRONDA, 1993).

Esse resultado corrobora com estudo anterior realizado pelo Grupo, em que a melhor combinação obtida para a rizogênese *in vitro* de *P. dubium* foi aquela que dispensou o uso da sacarose, e também da auxina ácido 3-indolbutírico – AIB, no meio nutritivo WPM/2, sendo alcançada uma média considerada elevada, até então, para a espécie (44,43 %) (REINIGER et al., 2016). Contudo, deve-se ressaltar que, no presente experimento, a média de rizogênese *in vitro*, até então observada, foi superada, atingindo valores próximos a 60%. A provável explicação para esse melhor resultado na rizogênese *in vitro* reside nos diferentes lotes utilizados nos dois trabalhos, indicando que os efeitos genéticos têm influência na menor ou maior formação de raízes.

Igualmente, em mirtilo (*Vaccinium ashei*, Ericaceae), após 60 dias de cultivo em meio de enraizamento *in vitro* WPM contendo 9 μM de AIB, foi observado que a ausência de sacarose promoveu um aumento na porcentagem de formação de raízes (DAMIANI; SCHUCH, 2009). Por outro lado, em explantes de mamoeiro (*Carica papaya*, família Caricaceae) ‘Tainung 01’ cultivados *in vitro* em meio nutritivo MS suplementado com 0,2 mgL^{-1} de AIB, aqueles tratamentos contendo concentrações de sacarose entre 15 e 30 gL^{-1} , obtiveram maior promoção de enraizamento, com média de 44,7% (SCHMILDT et al., 2007).

O mesmo padrão da formação de raízes foi observado no comprimento das raízes, em que o meio sem sacarose foi o tratamento com melhor resultado, e àquele com 30 gL^{-1} de sacarose, o pior (Tabela 4); a média obtida na concentração intermediária não diferiu de nenhum dos dois. Da mesma maneira ao que foi observado em relação à formação de raízes, para o comprimento, a supressão de sacarose no meio nutritivo estimulou as brotações a desenvolver seu sistema radicular.

Contrariamente ao observado no presente estudo, o comprimento de raízes de porta-enxerto de pereira (*Pyrus communis*) OH x F97, família Rosaceae, enraizado *in vitro* em meio MS reduzido a 1/3 da concentração de sais, em que foram testadas concentrações de sacarose no meio, a média foi máxima (1,70 cm) com o emprego 30 gL^{-1} e, mínima (1,05 cm) na ausência de sacarose no meio (LEITE et al., 2000). Em estudo analisando concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, uma espécie de orquídea, cultivada em meio MS por 90 dias, o comprimento médio das raízes não apresentou diferença significativa entre as concentrações de sacarose 0; 15 e 30 gL^{-1} (DIGNARTS et al., 2009).

A vermiculita, de forma isolada, também apresentou efeito significativo ($p=0,0099$, $p=0,0316$ e $p=0,0011$) sobre as variáveis comprimento de raízes, formação de raízes secundárias e calogênese na base dos explantes, mostrando-se prejudicial aos aspectos qualitativos das raízes analisados, mas favorecendo a micropropagação por reduzir a calogênese, quando presente no meio (Tabela 5).

Tabela 5 – Comprimento de raízes, porcentagem de formação de raízes secundárias e de calos na base em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM/2 em função da presença ou ausência do substrato vermiculita, independentemente das concentrações de sacarose.

Vermiculita (cm ³)	Comprimento de raízes (cm)	Raízes secundárias (%)	Calos na base (%)
0	2,41 a*	9,51 a	33,33 b
30	0,46 b	1,59 b	7,93 a
Média	1,44	5,55	20,63
IV	68,00	82,06	42,98

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Os resultados observados para a estrutura rizogênica da espécie, indicam que as brotações micropropagadas de *P. dubium* apresentaram melhor qualidade do sistema radicular na ausência de vermiculita no meio de cultivo, como pode ser observado na Figura 4. É possível que a presença do ágar, em relação à vermiculita, tenha proporcionado maior contato das brotações com o meio nutritivo, aumentando a absorção dos sais e produzindo um melhor desenvolvimento das raízes.

Igualmente, em um porta-enxerto de macieira (*Malus domestica*), família Rosaceae, o comprimento das raízes foi significativamente maior na presença de ágar (6 gL⁻¹) quando comparado à utilização de vermiculita (12 gL⁻¹), com médias de 4,10 e 0,32 cm, respectivamente, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS (SOUZA, 2007). Contrariamente, em estudo testando ágar ou vermiculita como substratos para o enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.), foi observado que somente

na presença de vermiculita os explantes originaram sistema radicular ramificado e com presença de pelos absorventes (LEITE, 1995).

Figura 4 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM/2: na ausência de sacarose e na ausência (A) e na presença (B) do substrato vermiculita (30 cm³); na presença de sacarose a 30 gL⁻¹ e na ausência do substrato vermiculita (C).



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.
Barra= 1cm.

Em relação à calogênese na base das brotações, o resultado foi oposto àquele observado no experimento anterior, que testou as concentrações de ágar (4; 5,5 ou 7 gL⁻¹) e vermiculita no meio, em que a maior formação calogênica ocorreu na presença de vermiculita, independentemente da concentração de ágar. No presente experimento, que avaliou as concentrações de sacarose e vermiculita no meio, a concentração de ágar foi fixa (7 gL⁻¹) e, portanto, neste caso o meio apresentou consistência mais firme que no ensaio prévio, sendo que em relação à vermiculita, a maior formação de calos ocorreu na sua ausência, o que pode justificar as diferenças observadas em relação à calogênese. Entretanto, como nos dois experimentos foram

avaliados fatores diferentes (água no experimento 2 e sacarose no 3) combinados ou não com vermiculita, seria necessária a realização de um experimento adicional testando os três fatores simultaneamente, o que poderia elucidar o efeito de eventuais interações entre os fatores principais e, assim, esse resultado aparentemente contrário.

5.2.4 Efeito do meio nutritivo e do período de cultivo

O fator principal meio nutritivo e a interação entre os fatores analisados não foram significativos para nenhuma das variáveis avaliadas. O período de cultivo, entretanto, foi significativo sobre a formação e o comprimento de raízes, e, também, sobre a formação de raízes secundárias ($p=0,0178$; $p=0,0001$ e $p=0,0004$ respectivamente). Já a formação de calos na base das brotações não foi significativamente afetada por nenhum dos fatores analisados, nem, tampouco, por sua interação, apresentando média moderada de 16,65% de calogênese. Os resultados observados em relação ao período de cultivo (Tabela 6) ratificam a necessidade de estender por, pelo menos, 60 dias o cultivo *in vitro* para a obtenção de um melhor sistema radicular em brotações de *P. dubium*, tanto sob o ponto de vista quantitativo quanto qualitativo, conforme relatado por Curti; Reiniger (2014).

Tabela 6 – Porcentagem de formação de raízes, comprimento de raízes e de formação de raízes secundárias em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert em função do período de cultivo *in vitro*, independentemente dos meios nutritivos utilizados.

Período (dias)	Formação de raízes (%)	Comprimento de raízes (cm)	Raízes secundárias (%)
30	34,16 b*	0,82 b	4,16 b
60	59,16 a	2,00 a	19,16 a
Média	46,66	1,41	9,66
IV	19,14	28,00	48,16

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Deve-se destacar que a formação média de raízes aos 60 dias de cultivo *in vitro*, independentemente do meio nutritivo utilizado, foi a maior observada no presente estudo, e, também, quando comparada aos trabalhos anteriores do Grupo de Pesquisa, alcançando 59,16% de brotações com raízes formadas (Tabela 6). Esse resultado, possivelmente foi obtido pelo emprego de uma associação, denominada meio de cultivo, entre meio nutritivo (MS ou WPM, na concentração integral ou reduzida à metade de sais), vermiculita (30 cm³) e ágar (7 gL⁻¹), na ausência de sacarose e de auxina, desenvolvida a partir dos trabalhos de Curti (2011), que maximizou a rizogênese em *P. dubium*, e, também, pelo emprego de um lote de sementes doadoras de explantes com maior potencial genético para formação de raízes adventícias.

Da mesma maneira, no estudo sobre a rizogênese *in vitro* em bromélia (*Neoregelia concêntrica*, Bromeliaceae), brotações cultivadas em meio nutritivo MS acrescido de 1 µM de AIB obtiveram enraizamento de 68,3% aos 30 dias de cultivo, o qual, quando duplicado, resultou em enraizamento total (MARTINS, 2013). A maior permanência das plantas em meio nutritivo pode auxiliar na formação e desenvolvimento do sistema radicular, pois a transferência das brotações para meio fresco após 30 dias de cultivo *in vitro* forneceu os nutrientes necessários que já haviam se esgotado no meio. Observando a Figura 5 é possível notar o crescimento das raízes e o desenvolvimento do sistema radicular após a duplicação do período de cultivo *in vitro*.

Contrariamente ao observado no presente trabalho, em estudo analisando o desenvolvimento *in vitro* de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*), família Bignoniaceae, foi observada vantagem do meio WPM em relação ao número de raízes (7,17) em comparação ao meio MS (BASSEGIO, 2015). Da mesma maneira, na micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) e framboeseira (*Rubus ideaus*), família Rosaceae, a utilização do meio WPM após 30 dias de cultivo *in vitro* ocasionou maior formação, número e comprimento de raízes (81,5%; 3,39 e 1,47 cm, respectivamente) em comparação ao meio MS (52%, 1,63 e 0,85 cm respectivamente), ambos na composição original de sais (LEITZKE *et al.*, 2009).

Figura 5 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após 30 (A) e 60 (B) dias de cultivo, independentemente dos meios nutritivos utilizados.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.
Barra = 1cm.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As características físicas do lote de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert avaliado se encontram dentro do padrão registrado na literatura para a espécie. O grau médio de umidade observado nas sementes, no presente trabalho, confirma sua classificação quanto ao comportamento fisiológico durante o armazenamento. O peso médio de mil sementes observado permite sua classificação como espécie florestal portadora de sementes pequenas. As dimensões avaliadas (comprimento, largura e espessura) do lote de sementes bem como a pequena amplitude de variação observada atestam uma grande homogeneidade.

- Os fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. estão associados em maiores porcentagens às sementes do lote avaliado, mas também são observados outros oito gêneros, em sua maioria com incidência inferior a 5 %, sendo recomendada, portanto, a realização da desinfestação superficial das sementes previamente a sua utilização.

- A germinação das sementes de *P. dubium* do lote avaliado é elevada, mesmo após cerca de três anos de armazenamento em refrigerador, confirmando sua classificação como ortodoxas, e mostra uma estabilização após 14 dias, sugerindo que esse período possa ser o adequado para a realização dos testes de germinação da espécie.

- Nem os valores de pH do meio nutritivo, nem a presença de vermiculita tampouco a interação entre os dois fatores, influenciam a formação *in vitro* de raízes de *P. dubium* em meio WPM/2 contendo sacarose (30 gL⁻¹) e ágar (7 gL⁻¹). Assim, recomenda-se ajustar o meio WPM/2, contendo sacarose e ágar, ao pH entre 5,6 a 5,8, geralmente empregado nos laboratórios de micropropagação.

- Apenas a vermiculita apresenta efeito sobre a formação *in vitro* de raízes em meio WPM/2 contendo sacarose (30 gL⁻¹), cuja média é maior quando o substrato está presente. Não há efeito do ágar sobre a rizogênese, nem tampouco da interação entre os dois fatores, nessas condições. Dessa maneira, é indicado o emprego da concentração usual de 7 gL⁻¹ de ágar, adicionados ao meio nutritivo WPM/2 contendo sacarose, na concentração usual, e vermiculita (30 cm³).

- A ausência de sacarose no meio nutritivo WPM/2 promove maior formação *in vitro* de raízes do que sua presença, independentemente da concentração utilizada, além disso, raízes com maior comprimento são formadas também na ausência do carboidrato. A vermiculita não promove aumento na formação de raízes, nas

condições em que foi desenvolvido o experimento, mas sua presença desfavorece o comprimento das raízes e a formação de raízes secundárias. Não há interação significativa, ao nível de 5% de probabilidade de erro, entre os dois fatores estudados, mas recomenda-se a realização de estudos adicionais, testando um número maior de unidades experimentais, para avaliar o efeito de uma eventual interação entre a sacarose e a vermiculita, haja vista que, no experimento em questão, em que restaram ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* apenas sete repetições (equivalentes a 21 unidades amostrais), observou-se uma média de 71,44 % de rizogênese na ausência de sacarose e presença de vermiculita, porém com valor de “p” igual a 5,41 %.

- Resultados observados para a formação de calos na base dos explantes indicam que a presença de vermiculita no meio de cultivo é controversa, variando de acordo com a composição do meio nutritivo utilizado, no que diz respeito ao ágar e sacarose. Apesar da presença do substrato promover maior formação de raízes, também foi responsável pela diminuição no seu comprimento e na formação de raízes secundárias, mostrando que seu emprego deve ser melhor investigado, haja vista que o efeito da vermiculita parece depender de outros componentes do meio nutritivo. Assim, sugere-se a realização de um experimento avaliando, simultaneamente, o efeito do ágar, da vermiculita e da sacarose adicionados ao meio nutritivo WPM/2.

- O meio nutritivo não tem efeito sobre a rizogênese *in vitro*, tampouco a interação entre o meio e o período de cultivo, nas condições avaliadas. Recomenda-se o emprego do meio WPM/2 pela redução de custos que pode proporcionar à micropropagação.

- O período de cultivo *in vitro* é fundamental para a formação de raízes em brotações de *P. dubium*, bem como para o seu desenvolvimento, em termos de comprimento e formação de raízes secundárias. O período de 60 dias de cultivo, independentemente do meio nutritivo utilizado, sem sacarose e com vermiculita, resulta na melhor média de rizogênese já observada (59,16%) em nosso Grupo de Pesquisa.

- Esse resultado sugere a realização de estudos adicionais, que avaliem e selecionem genótipos superiores em relação à rizogênese, haja vista ser este o aspecto diferencial entre experimentos realizados pelo Grupo de Pesquisa Desenvolvimento de Germoplasma, e que vem gerando um incremento gradativo e substancial na formação *in vitro* de raízes em *P. dubium*.

- Os resultados do presente estudo colaboraram para a otimização da técnica de micropropagação de *P. dubium*, incrementando significativamente a rizogênese *in vitro*, e podem contribuir para o aprimoramento da fase de enraizamento *in vitro* nessa espécie, sendo indicada a continuidade dos trabalhos a fim de se obter resultados ainda mais satisfatórios.

REFERÊNCIAS

- ALOUFA, M.A.I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: Congresso Brasileiro De Floricultura E Plantas Ornamentais, 14., Congresso Brasileiro De Cultura De Tecidos De Plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais**. p.3-5.
- ANDRADE, L. F. D. **Características biométricas das sementes e descrição da resposta germinativa pelo modelo do tempo térmico em diferentes populações de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.** 65 p. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.
- ARAÚJO, A. V. **Determinação do teor de água em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.** XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX 2013 – EFRPE: Recife, 2013.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa CNPH, v. 1, p. 261-296, 1998.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Ecology of seed dormancy and germination in greases. In: CHEPLICK, G. P. (Eds.). **Population biology of grasses**, Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 30-83.
- BASSAN, J. S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)].** 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.
- BASSEGIO, C. et al. Desenvolvimento de *Handroanthus impetiginosus* em diferentes meios de cultura e concentrações de bap (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. In: Seminário de Iniciação Científica - SEMIC, 23., 2015, Curitiba. **Anais**. Curitiba: PUCPR.
- BASTOS, L.P. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2,p.1122-1124, 2007.
- BENETTI, C. S. et al. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 81-85, jan./jun. 2009.
- BENNETT, M.A. Determination and standardization challenges of vigor tests of vegetable seeds. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.11, n.3, p.58-62, 2001.
- BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 4, p. 91-99, 1982.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 365p.

BRÜNING, F. O.; LÚCIO, A. D.; MUNIZ, M. F. B. Padrões para germinação, pureza, umidade e peso de mil sementes em análises de sementes de espécies florestais nativas do rio grande do sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 193-202, abr.-jun., 2011.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.

CANDIDO, D. F. **Cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert: Multiplicação, senescência foliar e calogênese**. 2013. 120 f. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Univ. de Coimbra, 2010.

CAPELANES, T. M. C. Quebra-de-dormência em sementes florestais, em laboratório. In: Simpósio Brasileiro sobre Tecnologia de Sementes Florestais, 2., 1991, Atibaia. **Anais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1991. p. 41.

CARNEIRO, J. S. Micoflora associada à sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.3, p.557-66, 1986.

CARVALHO, N.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. 424p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. 2000. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. FUNEP, Jaboticabal, Brasil, 588pp.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Colombo, PR: EMBRAPA FLORESTAS, 2003. 1.039p.

CARVALHO, W. L.; MUCHOVEJ, J. J. Fungos associados a sementes de essências florestais. **Revista Árvore**, Viçosa, v.15, n.2, p.173-178, 1991.

CHAPLA, P. I. et al. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.5, n.2, p. 87-93, 2009.

CHEROBINI, E. A. I. **Avaliação da qualidade de sementes e mudas de espécies florestais nativas**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. 2006.

COUVILLON, G.A. Rooting responses to different treatments. **Acta Horticulturae.**, Georgia, v.227, p.187-196, 1988.

CURTI, A. **Contribuições para a micropropagação de *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT.** 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.

CURTI, A. R. et al. Efeito de citocininas na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Anais.** VI Simpósio Brasileiro de Pós-graduação em Ciências Florestais, Rio de Janeiro, 2010.

CURTI, A. REINIGER, L. R. S. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Ciência Rural**, 44, n.2, p.314-320, 2014.

CURTI, A. **Rizogênese *in vitro* e *ex vitro* em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.** 136 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

DA CUNHA, A. C. M. C. M. et al. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p.35-47, jan./jun. 2009.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.563-566, 2009.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1012-1017, July 2009.

DHINGRA, O.D.; MUCHOVEJ, J.J.; CRUZ FILHO, J. Tratamento de sementes (Controle de patógenos). Viçosa: UFV, **Imprensa Universitária**, 1980. 121p.

DIGNART, S. L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun., 2009.

DONADIO, N. M. M.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula [*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.] e jacarandá-da-bama (*Dalbergia nigra* (ver.) fr.ar. exbentb.) - Fabaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.22, n.1, p. 64-73, 2000.

DONATO, V. M.T.S. et al. Plantas de cana -de -açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 134 - 141, 2005.

DURIGAN, G. et al. **Sementes e mudas de árvores tropicais.** Campinas: Instituto Florestal, CIMP/SMA, 1997.

EBRAHIM, M.K.H.; IBRAHIM, I.A. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. **Scientia Horticulturae**, v.86, p.211-21, 2000.

EIBL, B.I. et al. Ensayos de germinación y análisis cuantitativo em semillas de espécies forestales nativas de Misiones, R.A. **Yviaretá**, Eldorado, v.5, n.5, 1994, p.33-48.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. **Seed Science Research**, 1993. 3 (1): 1-13.

FENNER, M. Seed ecology. London: **Chapman & Hall**, 1993. 151 p.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 1998 . v. 1, p. 21 -43.

FIGLIOLIA, M. B., et al. "Controle de qualidade de sementes florestais: propostas de parâmetros técnicos." PIÑA-RODRIGUES, FCM; FREIRE, JM; LELES, PSS; BREIER, TB **Parâmetros técnicos para a produção de sementes florestais**. Seropédica: UFRRJ: 143-187. 2007.

FIGLIOLIA, M.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Considerações práticas sobre o teste de germinação. In: Manual técnico de sementes florestais. **IF Série Registros**, São Paulo, n.14, p. 45-59, 1995.

FILHO, C.F.D. **Morfologia vegetal**. Jaboticabal: FUNEP/ UNESP, 1993. 243p.

FLORES, A. V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. em função das concentrações do meio MS. **CERNE** (UFLA), v. 17, p. 549-553, 2011.

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

GOLLE, D. P. et al. Seleção de lotes de sementes de *Pinus taeda* L. para a cultura de tecidos. **CERNE**, Lavras, v. 20, n. 2, p. 259-266, Junho 2014.

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

GRAY, D.; STECKEL, J.R.A.; WARD, J.A. The effect of cultivar and cultural factors on embryo-sac volume and seed weight in carrot (*Daucus carota* L.). **Annals of Botany**, v.58, n.5, p.737-744, 1986.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. **Rivista di Frutticoltura**, [S.l.], v. 1, p. 75-79, 1993.

GUERRA, M. P. et al. Comportamento da canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) em viveiro, submetida a diferentes métodos de quebra de dormência e semeadura. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 5, p. 1-15, 1982.

GUIMARAES, C. C. et al. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Rev. bras. sementes**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. **Seed Biology**. New York: Academic Press, 1972. v.3, p.145-245.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagación de plantas; principios y practicas**. 3. ed. México, Continental, 1967. 693p.

HOFFMANN, A. et al. Substratos na indução e desenvolvimento in vitro de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1371-1379, 2001.

JAY-ALLEMAND, C. et al. Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. **Scientia Horticulturae**, n.3-4, v.51, p.335-342, 1992.

LAZAROTTO, M. et al. Tratamento de sementes de canafístula via calor úmido. **Revista Ciência Agrária**, v.56, n.3, p.268-273, 2013.

LEDO, A.S. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancorniaspeciosa* Gomes) em diferentes meios de cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.5, n.4, p.989-993, 2007.

LEITE, G. B.; FINARDI, M.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento "in vitro" do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciênc. agrotec.**, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000.

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97**. Dissertação (Mestrado em Fruticultura) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 1995.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.31, n.2, p.582-587, 2009.

LEWIS, G. P. *Peltophorum*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

LIMA JUNIOR, M. J. V. (Ed.). **Manual de procedimentos para análise de sementes florestais**. Manaus: UFAM, 2010. 146 p.

- LIMA, J.D.; MORAES, W. S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, p. 13 - 19, 2006.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 1, 161 p.
- LUCIO, A. D. et al. Relações entre variáveis nas análises de sementes de espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 697-704, mai-jun, 2007.
- MACHADO, J.C. **Patologia de sementes fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC / ESAL / FAEPE, 1988. 106p.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MARTINS, J. P. R. et al. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 43, n. 2, p. 138-146, abr./jun. 2013.
- MATTEI, V. L.; ROSENTHAL, M. D. Semeadura direta de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) no enriquecimento de capoeiras. **Revista Árvore**, v.26, n.6, p.649-654, 2002.
- MBORA, A. et al. **Tree seed quality guide**. Nairobi: World Agroforestry Centre, 2009. 28 p.
- McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diacorides, 1988. p. 289-302.
- MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da gabirobeira (*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.)**. 2000. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, MG.
- MENDES, S. S. **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit.)**: uma leguminosa de importância para os sistemas agrícolas do Nordeste. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Segipe. 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n. 1, p. 437-496, 1962.
- NAKAGAWA, J. et al. Maturação e secagem de sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert (canafístula). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n. 1, p. 49-56, 2010.

NICOLOSO, F. T.; FERRAO, G. E.; CASTRO, G. Y. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria , v. 38, n. 7, p. 2059-2062, Oct. 2008.

NIETSCHE, S. et al. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 989 - 991, 2006.

NKANG, A. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). **Journal of Plant Physiology**, 2002.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. Propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Edição 33, jul-dez 2004. p. 109-120.

OLIVEIRA et al. Caracterização morfológica de sementes e plântulas e germinação de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 643-653, jul.-set., 2012.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Rev. Árvore**, Viçosa , v. 27, n. 5, p. 597-603, 2003.

PATI, P.K. et al. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Seul, v. 24, p. 94-114, 2006.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15ª Ed. Piracicaba: FEALQ, 2009, 451p.

PINTO, J. E. B. T.; ARELLO, E. F.; BARBOSA, M. H. P. Efeito do pH, do concentrações de sais e de ágar no enraizamento *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. Gutiferae. **Revista Ceres**, 1995.

PIROLI, E.L. et al. Germinação de sementesde canafístula *Pelttophorum dubium* (Spreng.) Taub. tratadas para superação da dormência. **Coll. Agrar.**, v.1, n.1, p.13-18, 2005.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2 ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p

RAMALHO, M. A. P. **Genética na agropecuária**. 5.ed. Lavras: Editora UFLA, 2012. p.279-281.

REINIGER, L. R. S. et al. *In vitro* rhizogenesis and acclimatization of *Peltophorum dubium* shoots: effect of adding agar to a WPM/2 medium with vermiculite. **Scientia Forestalis** (IPEF), v. 44, p. 691, 2016.

SALERNO, A. R.; SCHALLENBERGER, T. C. H.; STUKER, H. Quebra da dormência em sementes de Canafístula. **Agropecuária Catarinense**, Chapecó, SC, v.9, n.1, p.9-11, 1996.

SANTOS, A.F.dos; MEDEIROS, A.C.; SANTANA, D.L.Q. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, jan./jun./2001 p. 57-70.

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B. & BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS. Pp. 415-444. 2003.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agrária**. v.8, n.1, p.25-31, 2007.

SENEME, A.M.; POSSAMAI, E.; VANZOLINI, S.; MARTINS, C.C. Germinação, qualidade sanitária e armazenamento de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium*). **Revista Árvore**, Viçosa, vol. 36, n.1, p.1-6. 2012.

SIMÕES, M. O. M. **Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra cultivadas *in vitro***. Dissertação Mestrado em Agronomia. Faculdade de Agronomia - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2000, 56 f.

SOARES, G.C.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M.W. Efeito do tempo de exposição do AIB no meio de cultura no enraizamento *in vitro* de mirtilo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 8., 2006, Pelotas. **Anais...** 2006.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Rev. Bras. de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, J. A. et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira –M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.161-164, 2007.

STOLTZ, L.P. Agar restriction of the growth of excised mature Iris embryos. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.96, p.681-684, 1971.

TIBOLA, c. s. et al. Diferentes meios de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 191-195, abr-jun, 2004.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. E BUSO, J. A. (1998). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa, Brasília-DF, p. 261-286, 1998.

VALADARES et al. Germinação, desenvolvimento de plântulas e teste de tetrazólio em *Poecilanthe parviflora* Bentham (Fabaceae - Faboideae). **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.39 - 47, 2009.

VALOIS, C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. (orgs). **Glossário de Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília : Embrapa SPI. 1996. 62p.

VIAGANÓ, R. C. et al. Enraizamento in vitro do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S.1/8: concentrações de IBA em meio de cultura acrescido de ágar ou vermiculita. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 60-65, Jul/Set, 2007.

WALKER, C. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Cordia americana* (L.) Gottschling e J. S. M. Mill**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, v.89, p.977-981, 1989.

XAVIER, A. et al. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009.