

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

Karol Buuron da Silva

**PROPAGAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. E ANÁLISE DA
ESTRUTURA GENÉTICA DE FRAGMENTOS NATURAIS COM
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Santa Maria, RS
2020

Karol Buuron da Silva

**PROPAGAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. E ANÁLISE DA
ESTRUTURA GENÉTICA DE FRAGMENTOS NATURAIS COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 a obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Silva, Karol Buuron da
PROPAGAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. E
ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DE FRAGMENTOS NATURAIS COM
MARCADORES MICROSSATÉLITES / Karol Buuron da Silva.- 2020.
128 p.; 30 cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Coorientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2020

1. Sementes florestais 2. Micropropagação 3.
Miniestaquia 4. Conservação de germoplasma 5.
Variabilidade genética I. Reiniger, Lia Rejane Silveira
II. Muniz, Marlove Fátima Brião III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

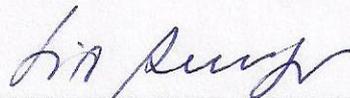
Declaro, KAROL BUURON DA SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Karol Buuron da Silva

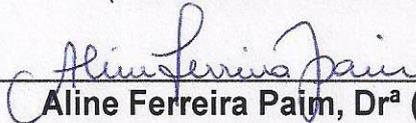
**PROPAGAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. E ANÁLISE DA
ESTRUTURA GENÉTICA DE FRAGMENTOS NATURAIS COM
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 a obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

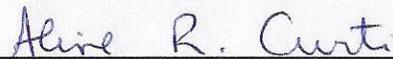
Aprovado em 21 de fevereiro de 2020:



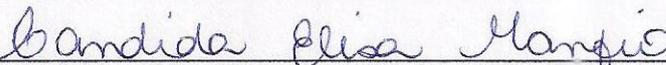
Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



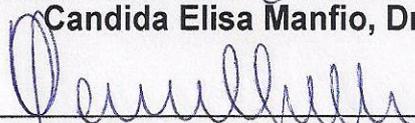
Aline Ferreira Paim, Dr^a (UFSM)



Aline Ritter Curti, Prof^a Dr^a (UFPel)



Candida Elisa Manfio, Dr^a (Epagri)



Diego Pascoal Golle, Prof. Dr (Unicruz)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conduzir com saúde até aqui e permitir a conclusão de mais esta etapa importante na minha vida.

À minha mãe, Sandra, e ao meu pai, Gedi, por todo amor, carinho, dedicação e confiança, não terei palavras para agradecer todo o esforço feito por vocês para a realização desta conquista, muito obrigada!

À minha irmã, Carina, e minha sobrinha Gabriela, pelo carinho e apoio durante toda a minha trajetória.

Ao meu noivo Andrei, pelo amor, carinho e amizade, por toda paciência, companheirismo, por compartilhar alegrias e tristezas, e sempre me incentivar em todos os momentos.

À minha orientadora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, por todo apoio e todas as oportunidades oferecidas, que contribuíram muito para minha formação profissional e crescimento pessoal. Muito obrigada pela orientação desde a graduação até o doutorado, pela paciência, pela ajuda, e principalmente pela amizade.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela minha formação e por todas as oportunidades de aprendizado que tive.

À CAPES, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

Aos demais colegas do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, pela amizade e auxílio constante na execução e condução dos experimentos.

Às minhas queridas amigas que contribuíram com sua amizade, dando incentivo e apoio em todas as horas.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para mais esta conquista em minha vida, a obtenção do título de doutora.

Muito obrigada!

RESUMO

PROPAGAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. E ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DE FRAGMENTOS NATURAIS COM MARCADORES MICROSSATÉLITES

Autora: Karol Buuron da Silva
Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger

Luehea divaricata Mart. & Zucc. é uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica, conhecida popularmente como açoita-cavalo e integrante da família Malvaceae. As populações naturais de *Luehea divaricata* e de tantas outras espécies nativas foram reduzidas drasticamente devido a intensa exploração da Mata Atlântica, dificultando cada vez mais a busca por exemplares adequados ao uso comercial e ecológico. Frente a isso, são encontradas muitas dificuldades para a obtenção de sementes viáveis, com boas características fisiológicas e sanitárias, dificultando a produção de mudas por meio de sementes. Por esse motivo, é de extrema importância avaliar a qualidade de lotes de sementes, e frente às dificuldades na reprodução da espécie via seminal, a micropropagação e a miniestaquia podem constituir alternativas para superar as dificuldades na sua propagação. Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar metodologias relacionadas à propagação vegetativa de *Luehea divaricata*, de maneira a subsidiar, simultaneamente, a produção de mudas e a conservação de recursos genéticos dessa espécie florestal nativa brasileira. No que diz respeito à qualidade das sementes, os resultados corroboram seu comportamento fisiológico ortodoxo no armazenamento e indicam que é possível manter sua viabilidade mesmo após longos períodos de conservação em refrigerador, no caso específico, por quatro anos. Em relação à micropropagação, 10 ou 20 μM de AIB são eficientes em formar raízes em brotações aos 60 dias de cultivo *in vitro*. No experimento relacionado ao crescimento mínimo e subsequente retomada do crescimento, 10 g L⁻¹ de sorbitol é eficiente para realizar a conservação *in vitro*, que pode ser realizada por um período de até 120 dias. Contudo, a subsequente retomada de crescimento das brotações é limitada a um período de 90 dias de conservação na presença de sorbitol. Na miniestaquia, aos 30 dias de cultivo, 1000 mg L⁻¹ de AIB em tratamento “pulse” já produz resultados satisfatórios no que diz respeito à formação e ao número de raízes, propiciando economia de tempo e custos. A produtividade das minicepas é superior no verão, quando as mudas se desenvolvem e enraízam melhor, porém, podem ser efetuadas coletas nas demais estações, indicando que o processo de miniestaquia pode ter continuidade ao longo do ano, nas condições avaliadas. A variabilidade genética é maior dentro (77%) dos três fragmentos naturais, o que é esperado ocorrer em espécies que se reproduzem predominantemente por cruzamentos. Os resultados obtidos são fundamentais para a adequada escolha de estratégias de manejo e conservação genética desses recursos florestais.

Palavras-chave: Sementes florestais. Micropropagação. Miniestaquia. Conservação de germoplasma. Variabilidade genética.

ABSTRACT

PROPAGATION OF *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. AND ANALYSIS OF THE GENETIC STRUCTURE OF NATURAL FRAGMENTS WITH MICROSSATELLITE MARKERS

Author: Karol Buuron da Silva
Advisor: Lia Rejane Silveira Reiniger

Luehea divaricata Mart. & Zucc. is a native forest species of the Atlantic Forest, popularly known as açoita-cavalo and member of the Malvaceae family. The natural populations of *Luehea divaricata* and many other native species have been drastically reduced due to intense exploration of the Atlantic Forest, making it increasingly difficult to find suitable specimens for commercial and ecological use. By the way, many difficulties are found to obtain viable seeds, with appropriate physiological and sanitary characteristics, making it difficult to produce seedlings by sexual via. For this reason, is extremely important to evaluate the quality of seed lots, and seeing the difficulties in reproducing the species via seminal, micropropagation and minicutting may be alternatives to overcome the difficulties in its multiplication. The present work aimed to evaluate methodologies related to the vegetative propagation of *Luehea divaricata*, in order to simultaneously support the production of seedlings and the conservation of genetic resources of this native Brazilian forest species. With regard to seed quality, the results corroborate their orthodox physiological behavior in storage, and indicate that it is possible to maintain their viability even after long periods of storage in the refrigerator, in the specific case, for four years. For micropropagation, 10 or 20 μM IBA are efficient to root shoots at 60 days of *in vitro* cultivation. In the experiment related to minimal growth and subsequent growth resumption, 10 g L^{-1} sorbitol is efficient for *in vitro* conservation, which can be performed for up to 120 days. However, the subsequent resumption of shoot growth is limited to a 90 days storage period in the presence of sorbitol. In the minicutting, at 30 days of cultivation, 1000 mg L^{-1} of IBA in "pulse" treatment produces satisfactory results regarding the formation and number of roots, saving time and costs. The productivity of the miniceps is higher in summer, when the seedlings develop and root better, but can be collected in other seasons, indicating that the minicutting process can continue throughout the year, under the conditions evaluated. Genetic variability is greater within (77%) of the three natural fragments, which is expected to occur in species that reproduce predominantly by crosses. The results obtained are fundamental for the proper choice of management strategies and genetic conservation of these forest resources.

Key-words: Forest seeds. Micropropagation. Minicutting. Germoplasm conservation. Genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

MICROPROPAGAÇÃO

Figure 1- Means of primary root (%), secondary root (%) and callus (%) formation in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the different concentrations of IBA (0, 10, 20, 30 or 40 μM) in WPM/2 nutritive medium, regardless the *in vitro* culture period (30 or 60 days).....39

Figure 2 - Illustrative representation of plants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. cultivated in WPM/2 nutritive medium after 60 days of *in vitro* culture depending of the different concentrations of IBA: A - 0 μM ; B-10 μM ; C-20; D-30 μM ; or E-40 μM43

Figura 1- Representação ilustrativa das culturas *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo MS em função dos períodos de cultivo: A) 40; B) 56; C) 70; D) 84; E) 102; F) 116; G) 130; H) 154, I) 186 ou J) 200 dias.....53

Figura 1 - Representação ilustrativa das plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo MS/2 após 120 dias de cultivo *in vitro* em função da (A) ausência ou (B) presença de 10 g L⁻¹ de sorbitol.....69

Figura 2 - Representação ilustrativa das plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo MS/2 após 120 dias de cultivo *in vitro* na retomada de crescimento, em função dos tratamentos na (A) ausência ou (B) presença de 10 g L⁻¹ de sorbitol durante o crescimento mínimo.....72

MINIESTAQUIA

Figure 1 - Illustrative representation of the minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. which were subjected to “pulse” treatment for 10s in hydroethanolic solution (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) of indolebutyric acid - IBA (0; 1000; 2000 or 4000 mg L⁻¹), after 60 days. A) 0 mg L⁻¹; B) 1000 mg L⁻¹; C) 2000 mg L⁻¹ and D) 4000 mg L⁻¹. Source: Authors (2017).....87

Figura 1 - Representação ilustrativa das miniestacas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função da estação do ano em que foram avaliadas (verão, outono, inverno ou primavera) e do período de avaliação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....100

LISTA DE TABELAS

QUALIDADE DE SEMENTES

- Tabela 1 - Localização das árvores em que foram coletadas as sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), avaliadas no presente estudo, na microrregião de Ijuí-RS.....19
- Tabela 2 – Médias de germinação (%) em sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos de avaliação (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.....24
- Tabela 3 – Médias de sementes mortas (%) de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.....26
- Tabela 4 – Médias de sementes duras (%) de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.....27
- Tabela 5 – Médias de Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.....28
- Tabela 6 – Médias de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes coletadas em cinco árvores de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento (1) ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos (2)). Santa Maria, UFSM, 2020.....30
- Tabela 7 – Médias de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes coletadas em cinco árvores de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) na microrregião de Ijuí-RS (1, 2, 3, 4 ou 5), independentemente do período em que foram avaliadas (logo após o beneficiamento das

sementes ou acondicionadas em embalagens de papel e em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.....32

Tabela 8 – Médias de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) na microrregião de Ijuí-RS, em função do período em que foram avaliadas, logo após o beneficiamento das sementes (1) ou acondicionadas em embalagens de papel e em refrigerador pelo período de 4 anos (2), independentemente das cinco árvores em que as sementes foram coletadas (1, 2, 3, 4 ou 5). Santa Maria, UFSM, 2020.....32

MICROPROPAGAÇÃO

Table 1 – Means of secondary root (%) and callus formation in plants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the *in vitro* culture period (30 or 60 days), regardless of the different concentrations of IBA (0, 10, 20, 30 or 40 μM).....41

Tabela 1 - Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), contaminação (%), número de folhas, folhas com sinal de senescência, raízes primárias (%) e raízes secundárias (%) em culturas *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função dos diferentes períodos de cultivo avaliados.....53

Tabela 1 - Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de folhas, formação de raiz primária (%) e raiz secundária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹), independentemente do período de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 ou 120 dias).....67

Tabela 2 - Médias de formação de raiz primária (%), raiz secundária (%), número de folhas e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 ou 120 dias), independentemente da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹).....68

Tabela 3 - Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de folhas e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹), independentemente do período de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 ou 120 dias) na etapa de retomada de crescimento.....70

Tabela 4 - Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%) e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função período de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 ou 120 dias), independentemente da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹) na etapa de retomada de crescimento.....71

MINIESTAQUIA

Table 1 - Root formation (%) and number of roots in <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. minicuttings as a function of the interaction between concentrations of Indolbutiric acid - IBA (0, 1000, 2000 or 4000 mg L ⁻¹) of hydroethanolic solutions (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) where they were previously immersed for 10s, and the cultivation period (30 or 60 days). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....	85
Table 2 - Average root length (cm), presence of secondary roots (%) and presence of callus (%) in minicuttings of <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. as a function of concentrations of Indolbutiric acid - IBA (0, 1000, 2000 or 4000 mg L ⁻¹) of hydroethanolic solutions (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) in which they were previously immersed for 10s regardless of the cultivation period (30 or 60 days). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....	88
Table 3 – Averages of root length (cm), presence of secondary roots (%) and number of leaves in minicuttings of <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. depending on the cultivation period (30 or 60 days), regardless of the concentration of the hydroethanolic solution (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) of Indolbutiric acid - IBA (0, 1000, 2000 or 4000 mg L ⁻¹), in which they were previously immersed for 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....	89
Tabela 1 - Produtividade (nº médio de miniestacas coletadas por minicepa) de minicepas de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) mantidas em casa de vegetação, em função das diferentes datas de coletas, estação do ano e intervalo entre as coletas. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....	97
Tabela 2 – Médias de número de raízes e formação de calos (%) em miniestacas de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função da estação do ano em que foram avaliadas (verão, outono, inverno ou primavera), independentemente do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....	100
Tabela 3 – Comprimento médio de raízes (cm), raízes secundárias (%) e número de folhas em miniestacas de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função da interação entre o período de cultivo (30 ou 60 dias) e a estação do ano em que foram avaliadas (verão, outono, inverno ou primavera). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....	101

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Tabela 1 - Estimativas de parâmetros relacionados à variabilidade genética de três fragmentos naturais de <i>Luehea divaricata</i> (açoita-cavalo) com base na análise de quatro locos microssatélites. Santa Maria, RS, UFSM, 2019.....	120
--	-----

Tabela 2 – Estimativas de parâmetros relacionados à estruturação genética entre os pares de fragmentos naturais estudados. Santa Maria, RS, UFSM, 2019.....	121
---	-----

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	16
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	16
3 QUALIDADE DE SEMENTES	17
3.1 <i>Introdução</i>	17
3.2 <i>Material e Métodos.....</i>	18
3.2.1 Teste de germinação.....	19
3.2.2 Teste de sanidade	20
3.2.3 Grau de umidade	21
3.3 <i>Resultados e Discussão.....</i>	22
3.3.1 Teste de germinação.....	22
3.3.2 Teste de sanidade	29
3.3.3 Grau de umidade	33
3.4 <i>Conclusões.....</i>	34
4 MICROPROPAGAÇÃO	35
4.1 <i>Rizogênese in vitro de Luehea divaricata: o efeito do ácido indolbutírico e período de cultivo</i>	35
4.2 <i>Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de Luehea divaricata.....</i>	47
4.3 <i>Crescimento mínimo e retomada de crescimento em brotações de Luehea divaricata</i>	60
5 MINIESTAQUIA	81
5.1 <i>Indolebutyric acid in “pulse” treatment on the rooting of Luehea divaricata minicuttings</i>	81
5.2 <i>Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de Luehea divaricata Mart. & Zucc. nas diferentes estações do ano</i>	92
6 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA	106
6.1 <i>Variabilidade genética de fragmentos naturais de Luehea divaricata no bioma Mata Atlântica com marcadores microsatélites</i>	106
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

APRESENTAÇÃO

O presente estudo é composto pela apresentação e discussão dos resultados dos experimentos que compõem a Tese de Doutorado em Engenharia Florestal. Inicialmente é apresentada uma introdução sobre o tema, fornecendo informações gerais da espécie e a importância dos estudos desenvolvidos, juntamente com os objetivos gerais e específicos do trabalho.

Na sequência são apresentados os resultados sobre a qualidade fisiológica, sanitária e física dos lotes de sementes de *Luehea divaricata* que foram utilizadas nos experimentos de micropropagação e de formação do minijardim clonal da miniestaquia. Os resultados da micropropagação, miniestaquia e análise da variabilidade genética são apresentados em seguida, e organizados na forma de artigos científicos e manuscritos com formatação específica de cada revista, sendo que os dois artigos da miniestaquia foram publicados nas revistas Ciência Rural e Scientia Forestalis, e os demais submetidos para publicação em revistas específicas da área.

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é o bioma que abriga uma das maiores biodiversidades do mundo, com cerca de 20 mil espécies vegetais, das quais 8 mil são endêmicas. É considerado o bioma mais rico do mundo em diversidade de árvores, sendo contabilizadas cerca de 454 espécies distintas em um só hectare. Além disso, a floresta regula o fluxo dos mananciais hídricos, assegura a fertilidade do solo, controla o clima, além de preservar um patrimônio natural e cultural incalculável. No entanto, pelo fato de aproximadamente 70% da população brasileira viver nessa região, é um dos biomas que mais sofreu os impactos ambientais dos ciclos econômicos da história do país e, hoje, está reduzido a cerca de 7% de sua área original (BRASIL, 2017; CAMPANILI; SCHAFFER, 2010).

Uma espécie florestal nativa deste bioma rico e biodiverso é *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., conhecida popularmente como açoita-cavalo e integrante da família Malvaceae. As populações naturais de *Luehea divaricata* e de tantas outras espécies nativas foram reduzidas drasticamente devido a essa intensa exploração da Mata Atlântica, dificultando cada vez mais a busca por exemplares adequados ao uso comercial e ecológico (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008). Frente a isso, são encontradas muitas dificuldades para a obtenção de sementes viáveis, com boas características fisiológicas e sanitárias, dificultando a produção de mudas por meio de sementes e sua perpetuação. Outro fato que dificulta a propagação seminal de *Luehea divaricata* é a porcentagem de germinação das sementes coletadas, que varia entre 20% e 75% (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008). Sendo assim, avaliar a qualidade das sementes de *Luehea divaricata* é de extrema importância e, diante das dificuldades na reprodução da espécie por meio de sementes, a micropropagação e a miniestaquia podem constituir alternativas para superar essas entraves na propagação desta espécie florestal nativa.

Alguns estudos com *Luehea divaricata* vem sendo realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa visando avaliar a propagação vegetativa e, mais especificamente, desenvolver um protocolo de micropropagação para a obtenção de mudas de qualidade sob os pontos de vista fisiológico e sanitário (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010; FLÔRES et al., 2011; LEÓN, 2014; SILVA, 2016; SILVA et al., 2019), o que possibilitará o estabelecimento de um sistema racional de cultivo visando minimizar as consequências do extrativismo predatório. O presente trabalho

pretende avaliar metodologias relacionadas à propagação vegetativa (micropropagação e miniestaquia) de maneira a subsidiar a produção de mudas e analisar a variabilidade genética de fragmentos naturais de *Luehea divaricata* visando auxiliar nas escolhas das estratégias de manejo e conservação dos recursos genéticos de *Luehea divaricata*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade das sementes de *Luehea divaricata*, desenvolver protocolos de propagação vegetativa e conservação *in vitro* da espécie, e analisar a variabilidade genética existente em fragmentos naturais desta espécie nativa brasileira através da utilização de marcadores microssatélites.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar, comparativamente, a qualidade fisiológica, sanitária e o grau de umidade de lotes de sementes de *Luehea divaricata* ao longo de um período de armazenamento de quatro anos.
- Estudar o efeito da auxina Ácido Indolbutírico e do período de cultivo sobre a rizogênese *in vitro* das brotações de *Luehea divaricata*.
- Avaliar o efeito do regulador osmótico sorbitol sobre a conservação *in vitro* de germoplasma de *Luehea divaricata* por meio de crescimento mínimo, bem como a subsequente retomada de crescimento.
- Analisar a aplicação da técnica de miniestaquia em *Luehea divaricata* e a produtividade de minicepas.
- Estudar a variabilidade genética de fragmentos naturais de *Luehea divaricata* em desenvolvimento no bioma Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul, por meio de marcadores microssatélites.

3 QUALIDADE DE SEMENTES

3.1 Introdução

A qualidade das sementes pode ser definida como os atributos que determinam seu potencial germinativo e suas características de crescimento. Esses atributos podem ser de natureza fisiológica, sanitária e física, os quais influenciam o potencial de armazenamento e qualidade na produção de mudas e, também, a capacidade de gerar plantas de alta produtividade (POPINIGIS, 1977; MBORA et al., 2009).

Existem diversos testes que podem ser utilizados para analisar a qualidade de sementes, os quais são baseados em técnicas padronizadas pelas Regras para Análise de Sementes – RAS e pelas Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (BRASIL, 2009). A escolha do teste dependerá do objetivo a que se destina a análise, que fornecerá os parâmetros que expressam as qualidades fisiológicas, sanitárias e físicas do lote de sementes em estudo. Tais informações serão úteis tanto para a semeadura quanto para o armazenamento das sementes, sendo possível também a comparação entre lotes diferentes e condições de armazenamento diversas (AGUIAR et al., 1993).

A qualidade fisiológica das sementes reúne atributos que demonstram sua capacidade de desempenhar funções vitais, como a germinação, o vigor e a longevidade (POPINIGIS, 1977). A qualidade sanitária é estabelecida de acordo com a associação de micro-organismos patogênicos nas sementes, o que poderá acarretar na disseminação de doenças e pragas à planta resultante (POPINIGIS, 1977; FERREIRA; BORGUETTI, 2004; CHEROBINI, 2006). Já a qualidade física das sementes é determinada pelas características de tamanho, cor, idade e grau de umidade que possam afetar negativamente a germinação (MBORA et al., 2009).

Muitas espécies florestais nativas possuem sementes com germinação muito variável e baixa viabilidade, como é o caso de *Luehea divaricata*, uma espécie florestal integrante da família Malvaceae, nativa dos biomas Pampa e Mata Atlântica, conhecida popularmente como açoita-cavalo. As sementes da espécie apresentam uma germinação muito variável, entre 20% e 75% (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008), o que dificulta a sua propagação seminal. Em um teste de germinação realizado sobre papel mata-borrão, por exemplo, a porcentagem de germinação de

um lote de sementes coletado em 2010 e armazenado por 7 meses foi de apenas 27% (DUTRA et al., 2016), o que ratifica as informações registradas na literatura e ressalta a importância dos estudos sobre a qualidade das sementes utilizadas na produção de mudas florestais. Outro fato que deve ser considerado é a viabilidade das sementes após longos períodos de armazenamento, uma vez que a literatura registra que a germinação das sementes após 60 dias da colheita foi 50% menos do que a germinação de sementes que foram semeadas imediatamente após a coleta (CARVALHO, 2008).

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a germinação, a qualidade sanitária e o grau de umidade em lotes de sementes de *Luehea divaricata* logo após o beneficiamento e armazenadas por um período de quatro anos.

3.2 Material e Métodos

Para avaliar a qualidade das sementes de *Luehea divaricata* coletadas no ano de 2012 na microrregião de Ijuí, Rio Grande do Sul (Tabela 1), foram desenvolvidos testes no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Defesa Fitossanitária, e no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, ambos localizados na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As sementes foram coletadas de todas as árvores que foram encontradas no local, e passaram pelo processo de beneficiamento, logo após a coleta (agosto de 2012), constituído pela secagem dos frutos por, aproximadamente, uma semana em casa de vegetação e posterior extração. Uma vez seco, o fruto seco foi pressionado com alicate na região oposta à abertura, fazendo com que se abra facilitando o processo de extração das sementes. Após o beneficiamento, as sementes permaneceram armazenadas, em sacos de papel 'kraft' dentro de refrigerador, à temperatura aproximada de $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, pelo período de quatro anos.

Tabela 1 - Localização das árvores em que foram coletadas as sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), avaliadas no presente estudo, na microrregião de Ijuí-RS.

Município/Bairro	Código da Árvore	Coordenadas geográficas
Ijuí – Boca da Picada	1	21J 0791998 UTM6850383
Ijuí – Bozano	2	22J 0220102 UTM6858771
Ijuí – Bairro Modelo	3	22J 0216362 UTM6857510
Ijuí – Entre Ijuís	4	21J 0783059 UTM6858327
Ijuí – Coronel Barros	5	22J 0206758 UTM6850474

Fonte: Autor (2020).

3.2.1 Teste de germinação

O teste de germinação das sementes foi realizado seguindo as recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). No presente estudo, os tratamentos consistiram das sementes coletadas nas cinco árvores analisadas logo após a coleta e decorrido o período de quatro anos de armazenamento, empregando-se delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x2. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, compostas, cada uma, por 25 sementes.

Primeiramente, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial, com imersão em etanol a 70% (v/v) durante 30 s, e na sequência, por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) durante 10 min, efetuando-se triplo enxágue com água estéril após cada procedimento. Todo o material utilizado para a realização do teste também passou por desinfestação, que foi realizada mediante limpeza com algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (v/v) e, a seguir, em etanol a 70% (v/v).

Foram distribuídas duas folhas de papel filtro, previamente esterilizadas, em caixas plásticas tipo *Gerbox*, com dimensões de 11cm x 11cm x 3cm, as quais foram, previamente, umedecidas com água ésteril. Em seguida, as sementes foram acondicionadas nas caixas que, posteriormente, foram inseridas dentro de sacos plásticos, para a manutenção da umidade e acondicionadas em sala de cultivo, com

temperatura de 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 16h sob intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A umidade no interior das caixas foi observada diariamente e, quando necessário, foi borrifada água estéril sobre as sementes.

Foram realizadas quatro avaliações com intervalos de sete dias cada, sendo consideradas germinadas as sementes que romperam o tegumento e emitiram radícula. As variáveis analisadas foram expressas em porcentagem e estão descritas a seguir, de acordo com as RAS (BRASIL, 2009):

Sementes mortas: aquelas que, no final do teste, não germinaram, mas não estavam duras, nem dormentes, apresentavam-se amolecidas ou continham micro-organismos e não apresentaram nenhum sinal de início de germinação;

Sementes duras: aquelas que permaneceram sem absorver água por um período mais longo que o normal, e apresentaram-se, no final do teste, com aspecto de sementes recém colocadas no substrato, isto é, não intumescidas;

Plântulas normais: aquelas que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento dando origem a plantas normais, quando desenvolvidas sob condições favoráveis.

Índice de velocidade de germinação: para a avaliação do IVG foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$\text{IVG} = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$

Em que IVG = índice velocidade de emergência; G_1, G_2, \dots, G_n = número de plântulas normais germinadas a cada dia e N_1, N_2, \dots, N_n = número de dias decorridos da semeadura da primeira até a última contagem.

3.2.2 Teste de sanidade

Para a avaliação da qualidade sanitária de sementes foi utilizado o método “blotter test” ou teste do papel filtro, conduzido em delineamento inteiramente casualizado, conforme dispõe as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Os tratamentos consistiram das sementes coletadas nas cinco árvores analisadas logo após a coleta e decorrido o período de quatro anos de armazenamento, empregando-se delineamento inteiramente casualizado, em arranjo

fatorial 5x2. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, compostas, cada uma, por 25 sementes.

Primeiramente, foi realizada a desinfestação das caixas plásticas tipo *Gerbox*, com dimensões de 11cm x 11cm x 3cm, com o auxílio de algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, as sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água estéril. A inoculação das sementes foi realizada com o auxílio de pinças desinfestadas com algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Após a inoculação das sementes, as caixas foram fechadas e inseridas dentro de sacos plásticos, com a finalidade de conservar melhor a umidade, e então foram acondicionadas em sala a uma temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h sob intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Sete dias após a instalação do experimento foi realizada a avaliação da sanidade das sementes, sendo identificados os gêneros fúngicos que foram observados em cada caixa, dados que foram utilizados para determinar a porcentagem de incidência de cada gênero fúngico. Os gêneros foram identificados através de microscópio estereoscópio e ótico; sendo que aqueles com as estruturas de reprodução bem desenvolvidas, foram identificados apenas com o microscópio estereoscópio. Nos demais gêneros, em que houve dificuldades de identificação por meio da visualização neste equipamento, foram retiradas amostras do micélio com estruturas de reprodução, e com o auxílio de agulhas, fita adesiva e pinça foram confeccionadas lâminas, as quais a partir da sua observação em microscópio ótico, e mediante o auxílio de literatura especializada, possibilitaram a adequada identificação.

3.2.3 Grau de umidade

O grau de umidade das sementes foi avaliado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C por 24h, conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), sendo efetuadas algumas modificações devido ao número reduzido de sementes disponíveis. Ao contrário dos testes de germinação e sanidade, este foi realizado em apenas um período, ou seja, decorridos quatro anos de armazenamento das sementes das cinco árvores em refrigerador a 8 ± 2 °C. Utilizou-

se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições de 300 mg de sementes para cada árvore doadora de sementes. Como recipiente foi utilizado papel alumínio, medindo 10cm x 9cm e com massa de 250 mg.

A porcentagem de umidade, para as sementes provenientes das cinco árvores, 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.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Teste de germinação

Para a variável germinação (IV=6,23), sementes mortas (IV = 7,86), sementes duras (IV= 9,97) e IVG (IV=2,62), houve efeito significativo da árvore doadora de sementes ($p=0,0027$; $p=0,0001$; $p=0,0002$; $p=0,0027$ respectivamente), dos períodos avaliados ($p=0,0000$; $p=0,0001$; $p=0,0001$; $p=0,0000$ respectivamente) e da interação entre as árvores doadoras de sementes e os dois períodos avaliados ($p=0,0001$; $p=0,0013$; $p=0,0005$; $p=0,0001$ respectivamente).

As sementes das árvores estudadas demonstraram variabilidade em relação à germinação (Tabela 2) no primeiro período de avaliação, realizada logo após a coleta/beneficiamento, formando um grupo com médias maiores, composto pelos indivíduos 4 e 5, e um segundo agrupamento com valores inferiores, constituído pelos demais. No segundo período de avaliação, efetuada 4 anos após, as árvores doadoras de sementes 2, 4 e 5 mantiveram inalterada a viabilidade das sementes em relação ao primeiro período, mas os indivíduos 1 e 3 tiveram sua germinação melhorada, provavelmente em decorrência da superação de dormência que, talvez,

tenha sido a responsável pelos baixos valores observados logo após a coleta/beneficiamento. Além disso, neste segundo período, observou-se grande homogeneidade nos resultados de germinação, uma vez que não houve diferenças significativas entre as árvores no que diz respeito à germinação.

Autores relataram que, em espécies pioneiras, como é o caso de *Luehea divaricata*, geralmente suas sementes ortodoxas apresentam dormência irregular, e, em geral, produzem uma enorme quantidade de sementes que germinam estrategicamente durante um período de tempo mais ou menos longo, variável de espécie para espécie, podendo chegar a vários anos (SMITH et al., 2003; HONG; ELLIS, 2003; NAPPO et al., 2001), como foi o caso no presente trabalho, em que a germinação ocorreu mesmo após passarem-se quatro anos de armazenamento. Essa dormência endógena pode ser atribuída à presença de substâncias inibidoras, pela imaturidade do embrião, pela dormência do próprio embrião ou ainda a combinação de dois ou mais destes fatores (KRAMER; KOSLOWSKI, 1972; VIEIRA; FERNANDES, 1997), ou seja, é possível que tenha ocorrido dormência morfofisiológica nas sementes de *Luehea divaricata*, que é a dormência morfológica e fisiológica manifestando-se na mesma semente. Nesse caso, para a germinação ocorrer talvez tenha sido necessário o embrião atingir um determinado período crítico, variável conforme requerimentos da espécie, e/ou que a dormência fisiológica tenha sido superada por estratificação ou outro tratamento. Além disso, deve-se considerar que a pós-maturação do embrião e a superação de dormência fisiológica podem ou não requerer as mesmas condições ambientais e ocorrer ou não ao mesmo tempo, dependendo da espécie (CARDOSO, 2004).

Tabela 2 – Médias de germinação (%) em sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos de avaliação (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.

Árvore	Germinação		Média
	Após o beneficiamento (%)	4 anos de armazenamento (%)	
1	16,0 B b*	52,0 A a	34,0
2	34,0 A b	47,0 A a	40,5
3	22,0 B b	62,0 A a	42,0
4	58,0 A a	44,0 A a	51,0
5	50,0 A a	60,0 A a	55,0
Média	36,0	53,0	
IV**	6,23		

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N). Fonte: Autor (2020).

As árvores doadoras de sementes 2, 4 e 5 mantiveram a viabilidade das sementes nos dois períodos avaliados (Tabela 2), sugerindo que a dormência observada nos indivíduos 1 e 3 pode ter, além de componentes genéticos, natureza ambiental, os quais eventualmente, ao longo do período de armazenamento, desapareceram. A ocorrência de fatores desfavoráveis (época da colheita das sementes, temperatura, fotoperíodo, umidade relativa do ar e precipitação), nos sítios onde estão se desenvolvendo, podem atuar direta ou indiretamente na qualidade física, fisiológica e sanitária das sementes produzidas em cada região (DAVIDE; SILVA, 2008). Essas diferenças no comportamento das sementes dessas árvores podem estar associadas a fatores edafoclimáticos, relacionados a sua distribuição geográfica, e, nesse sentido, o estabelecimento de zonas de coleta seria uma estratégia interessante para garantir a qualidade das sementes obtidas (CUNNINGHAM, 1975).

Outro aspecto que igualmente deve ser considerado é a maturidade fisiológica das sementes (MARCOS FILHO, 2005); no presente trabalho, provavelmente, em algum momento no interregno compreendido entre a coleta e o armazenamento por

4 anos, as sementes atingiram a sua maturidade fisiológica, o que permitiu otimizar o processo germinativo comparado ao primeiro período de avaliação, logo após o beneficiamento. Adicionalmente, apesar de Lorenzi (1992) classificar as sementes de *Luehea divaricata* como recalcitrantes em relação ao armazenamento, outros autores sugerem que a espécie é considerada ortodoxa (FOWLER, 2000; MEDEIROS, 2006), fato que se confirmou no presente trabalho com uma porcentagem de germinação satisfatória após os quatro anos de armazenamento. Sementes dessa classe toleram a perda de água e, em condições de baixa umidade relativa do ar e temperatura, as sementes podem ficar armazenadas por muitos anos sem que ocorra perda significativa de viabilidade (ROBERTS, 1973).

Da mesma maneira, alguns autores indicam que a viabilidade das sementes de *Luehea divaricata* é muito variável, geralmente não superior a 60 dias depois da coleta (LORENZI, 2008; CARVALHO, 2008), no entanto, no presente trabalho a viabilidade se prolongou muito além desse período. O período de quatro anos de armazenamento em refrigerador não prejudicou a viabilidade das sementes, certamente essas condições influenciaram a obtenção desses resultados positivos, pois isso garantiu a viabilidade e longevidade das mesmas, provavelmente preservando sua qualidade física, fisiológica e sanitária, o que acarretou no desenvolvimento de plantas saudáveis após as sementes germinarem, conforme pode ser observado nos experimentos de propagação vegetativa que foram realizados com elas e que estão descritos neste trabalho.

Em outro trabalho com *Luehea divaricata*, a porcentagem de germinação em um teste, realizado sobre papel mata-borrão, de um lote de sementes coletado em 2010 e armazenado por apenas 7 meses foi de somente 27% (DUTRA et al., 2016), valor bem inferior ao observado no presente trabalho após um período bem mais extenso, 4 anos. Contudo, não há informações nesse trabalho a respeito da germinação inicial, de maneira a permitir inferências a respeito da ocorrência ou não de dormência no lote estudado, composto por sementes de oito árvores. Entretanto, servem para, juntamente com aqueles observados no presente estudo, ratificar as informações registradas na literatura de que a germinação de sementes de *Luehea divaricata* é muito variável, entre 20% e 75% (LORENZI, 2008; CARVALHO, 2003; DURIGAN, 1997). Porém, deve ser ressaltado que esses dados, provavelmente, não consideram a época (se logo após a coleta ou em que período de armazenamento) em que foram realizadas as avaliações.

Em relação às sementes mortas (Tabela 3), as médias das árvores doadoras de sementes nos dois períodos se mantiveram em torno de 20%, com exceção da árvore 1 que apresentou uma leve diminuição após os quatro anos de armazenamento, igualando-se às demais. Esse fato pode ser atribuído à amostragem das sementes para a realização do experimento. Devido à reduzida quantidade de sementes disponíveis para a realização dos testes, a amostragem efetuada foi simples (BRASIL, 2009), sendo retirada uma pequena porção de sementes de um ponto do lote. No entanto, considerados os resultados obtidos, a amostragem composta, que é formada pela combinação e mistura de todas as amostras simples retiradas do lote (BRASIL, 2009), provavelmente seria a mais adequada nessa situação, e não ocasionaria esse resultado - a diminuição de sementes mortas observada na árvore 1.

Tabela 3 – Médias de sementes mortas (%) de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.

Árvore	Sementes mortas		Média
	Após o beneficiamento (%)	4 anos de armazenamento (%)	
1	41,0 B c*	21,0 A a	31,0
2	20,0 A b	29,0 A a	24,5
3	7,0 A a	15,0 A a	11,0
4	21,0 A b	26,0 A a	23,5
5	32,0 A c	25,0 A a	28,5
Média	24,0	23,2	
IV**	7,86		

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N). Fonte: Autor (2020).

Para as sementes duras (Tabela 4), as médias das árvores doadoras de sementes 1, 4 e 5 se mantiveram inalteradas nos dois períodos e os indivíduos 2 e 3 tiveram suas médias melhoradas após os quatro anos de armazenamento, provavelmente pela superação da dormência, conforme discutido anteriormente em relação à germinação. Esses resultados ratificam as observações anteriores em relação ao comportamento ortodoxo das sementes, à existência de dormência e demonstram que o armazenamento em refrigerador é adequado, mantendo a viabilidade e a longevidade das sementes de *Luehea divaricata*.

Tabela 4 – Médias de sementes duras (%) de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.

Árvore	Sementes duras		
	Após o beneficiamento (%)	4 anos de armazenamento (%)	Média
1	43,0 A b*	27,0 A a	35,0
2	46,0 B b	24,0 A a	35,0
3	71,0 B c	23,0 A a	47,0
4	21,0 A a	30,0 A a	25,5
5	18,0 A a	15,0 A a	16,5
Média	39,8	23,8	
IV**	9,9		

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N). Fonte: Autor (2020).

Em relação ao IVG (Tabela 5), o comportamento é igual àquele registrado para a germinação (Tabela 2), em que decorridos quatro anos de armazenamento as árvores 2, 4 e 5 mantiveram seu índice inalterado, enquanto as sementes dos indivíduos 1 e 3 melhoraram sua qualidade. Isso indica que as sementes das árvores

2, 4 e 5 são vigorosas tanto imediatamente após o beneficiamento quanto após quatro anos de armazenamento. Porém, ao longo do tempo, a qualidade de todas se iguala.

No que diz respeito às análises efetuadas para o cálculo do IVG, que foram realizadas a cada 7 dias, ao longo de 28 dias, logo após o beneficiamento a árvore doadora de sementes 5 apresentou nos primeiros 7 dias, 18% de germinação, aumentando para 28% aos 14 dias e 48% aos 21 dias, valor que se manteve aos 28 dias (dados não apresentados). A árvore 4 apresentou comportamento semelhante à 5, em que aos 21 dias somou 56% de germinação, sendo que este valor se manteve aos 28 dias. As demais árvores (1, 2 e 3), apresentaram sua maior germinação apenas aos 28 dias após a instalação do teste (16%, 34% e 22% respectivamente). Já no período de quatro anos de armazenamento, a árvore doadora de sementes 5, apresentou nos primeiros 7 dias, 7% de sementes germinadas, e aos 14 dias, 60%, valor que se manteve nas demais análises (dados não apresentados). As demais árvores apresentaram elevados valores de germinação somente a partir dos 21 dias, o que está de acordo com o que é indicado para o teste de germinação de *Luehea divaricata* nas Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (MAPA, 2013), e que corresponde à última contagem aos 28 dias.

Tabela 5 – Médias de Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), coletadas em cinco árvores doadoras de sementes na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.

Árvore	IVG		Média
	Após o beneficiamento (%)	4 anos de armazenamento (%)	
1	0,14 B b*	0,46 A a	0,30
2	0,30 A b	0,41 A a	0,35
3	0,19 B b	0,55 A a	0,37
4	0,51 A a	0,39 A a	0,45
5	0,44 A a	0,53 A a	0,48
Média	0,31	0,46	
IV**	2,62		

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N). Fonte: Autor (2020).

3.3.2 Teste de sanidade

As sementes avaliadas apresentaram associação com 11 gêneros fúngicos diferentes nos dois períodos avaliados. Para *Alternaria* sp. (IV=7,84), *Curvularia* sp. (IV=18,05), *Phoma* sp. (IV=15,56) e *Rhizoctonia* sp. (IV=8,62) houve efeito significativo das árvores doadoras de sementes ($p=0,0000$; $p=0,0053$; $p=0,0000$; $p=0,0000$ respectivamente), dos períodos avaliados ($p=0,0016$; $p=0,0000$; $p=0,0000$; $p=0,0000$ respectivamente) e da interação entre os dois fatores ($p=0,0001$; $p=0,0061$; $p=0,0000$; $p=0,0002$ respectivamente). Já para *Aspergillus* sp. (IV=17,53) houve efeito significativo das árvores doadoras de sementes ($p=0,0000$) e da interação entre as árvores e os períodos ($p=0,0057$), mas não do período ($p=0,0639$).

Em relação à *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia* sp., que, de uma maneira geral, apresentaram as maiores médias de contaminação das sementes em todas as árvores nos dois períodos (Tabela 6), observou-se, para o primeiro gênero uma redução na sua incidência ao longo do armazenamento em duas árvores, mantendo-se inalterado nas demais, enquanto para o segundo gênero ocorreu o inverso, um aumento na associação com as sementes, piorando sua qualidade. No entanto, mesmo na presença desses elevados níveis de contaminação fúngica, nem a germinação nem o IVG das sementes foram prejudicados, conforme apresentado anteriormente (Tabela 2 e Tabela 5 respectivamente).

Igualmente se destacaram pelo aumento na incidência média no decorrer do armazenamento os fungos *Curvularia* sp. e *Aspergillus* sp., o primeiro em três das cinco árvores e o segundo, apenas na árvore 2, contudo, provavelmente por serem médias baixas não acarretaram em prejuízos para a sua germinação (Tabela 2). O fungo *Aspergillus* sp. pode ser muito prejudicial às sementes durante o armazenamento, podendo causar a perda do poder germinativo pela colonização do

embrião (o que não foi verificado no presente estudo), além de descoloração e apodrecimento, com conseqüente aumento na deterioração das sementes. Além disso, esses micro-organismos podem consumir ou causar alterações na constituição das reservas e produzir micotoxinas, inibidoras da síntese de proteínas e ácidos nucléicos (MACHADO, 1988; MARCOS FILHO, 2005).

Tabela 6 – Médias de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes coletadas em cinco árvores de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) na microrregião de Ijuí-RS, em função da interação entre as árvores (1, 2, 3, 4 ou 5) e os períodos (logo após o beneficiamento (1) ou acondicionados em embalagens de papel em refrigerador pelo período de 4 anos (2)). Santa Maria, UFSM, 2020.

Árvore	<i>Alternaria</i> sp.			<i>Aspergillus</i> sp.			<i>Curvularia</i> sp.		
	Período								
	1	2	Média	1	2	Média	1	2	Média
1	30 A a*	11 A a	20	5 A a	17 A a	11	0 A a	20 B a	10
2	48 B b	22 A a	35	6 A a	26 B b	16	4 A a	42 B b	22
3	84 B c	33 A a	58	50 B b	30 A b	40	16 A b	24 A a	20
4	50 A b	55 A b	52	3 A a	14 A a	8	5 A a	13 A a	9
5	58 A b	77 A c	67	1 A a	9 A a	5	2 A a	23 B a	12
Média	54,0	39,6		13,0	19,2		5,4	24,4	
IV**	7,84			17,53			18,05		
Árvore	<i>Phoma</i> sp.			<i>Rhizoctonia</i> sp.					
	Período								
	1	2	Média	1	2	Média			
1	51 B d*	2 A a	26	0 A a	47 B a	23			
2	41 B c	6 A a	23	10 A a	74 B b	42			
3	7 A a	1 A a	4	28 A b	71 B b	49			
4	18 B b	2 A a	10	61 A c	55 A a	58			
5	10 A a	11 A a	10	64 A c	68 A b	66			
Média	25,4	4,4		32,6	63,0				
IV**	15,56			8,62					

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N). 1 – Logo após o beneficiamento. 2 – Após quatro anos de armazenamento. Fonte: Autor (2020).

Da mesma maneira, em sementes de *Cybistax antisiphilitica* (ipê-verde), foi observado que houve aumento na incidência de *Aspergillus* sp. no transcorrer do armazenamento das sementes em câmara fria e em embalagens de plástico, tornando-se a contaminação mais acentuada aos 435 dias (48%) comparada à incidência aos 61 dias (26%) (MELO, 2009).

Em relação aos gêneros fúngicos *Botrytis* sp. (IV=16,9) e *Fusarium* sp. (IV=7,38), houve efeito significativo das árvores doadoras de sementes ($p=0,0004$; $p=0,0316$ respectivamente) e dos períodos avaliados ($p=0,0170$; $p=0,0000$ respectivamente), mas não da interação entre os fatores ($p=0,9126$; $p=0,3018$ respectivamente). Em relação ao primeiro, as árvores 2 e 3 foram as de maior incidência, enquanto para *Fusarium* sp., isso ocorreu nas de número 1, 2 e 4 (Tabela 7). Contudo, a incidência foi maior em relação a *Fusarium* sp., que apresentou uma média geral elevada de 48,9% de sementes contaminadas. *Fusarium* sp. é um fungo que pode se comportar como fitopatogênico, sendo comprovadamente causador de doenças em sementes de muitas espécies de plantas e podendo ser responsável pelas variações existentes na germinação de sementes (CARVALHO; MUCHOVEJ, 1991; MACHADO, 1988). Contudo, a diminuição das sementes contaminadas por *Fusarium* sp. do primeiro período para o segundo (72,60% para 25,40%) (Tabela 8), provavelmente, contribuiu para que a germinação das sementes, após esse tempo de armazenamento, não fosse comprometida pela sua presença.

Tabela 7 – Médias de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes coletadas em cinco árvores de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) na microrregião de Ijuí-RS (1, 2, 3, 4 ou 5), independentemente do período em que foram avaliadas (logo após o beneficiamento das sementes ou acondicionadas em embalagens de papel e em refrigerador pelo período de 4 anos). Santa Maria, UFSM, 2020.

Árvore	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	Média
1	13,5 a*	55,0 b	34,2
2	28,0 b	52,0 b	40,0
3	26,0 b	40,0 a	33,0
4	8,5 a	55,0 b	31,7
5	7,5 a	42,5 a	25,0
Média	16,7	48,9	
IV**	16,9	7,38	

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N). Fonte: Autor (2020).

Tabela 8 – Médias de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) na microrregião de Ijuí-RS, em função do período em que foram avaliadas, logo após o beneficiamento das sementes (1) ou acondicionadas em embalagens de papel e em refrigerador pelo período de 4 anos (2), independentemente das cinco árvores em que as sementes foram coletadas (1, 2, 3, 4 ou 5). Santa Maria, UFSM, 2020.

Período	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	Média
1	12,6 a*	4,4 b	72,60 b	2,0 b	22,9
2	20,8 b	0,0 a	25,40 a	0,2 a	11,6
Média	16,7	2,2	49,0	1,1	
IV**	16,9	38,8	7,38	31,4	

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N). 1 – Logo após o beneficiamento. 2 – Após quatro anos de armazenamento. Fonte: Autor (2020).

Para *Penicillium* sp. (IV=38,8) e *Rhizopus* sp. (IV=31,4), houve efeito significativo apenas dos períodos avaliados ($p=0,0097$; $p=0,0156$ respectivamente), mas não das árvores doadoras de sementes ($p=0,2973$; $p=0,2934$ respectivamente) e nem da interação entre os fatores ($p=0,2973$; $p=0,4809$ respectivamente). Em relação a ambos houve uma diminuição da incidência ao longo do armazenamento. Já para *Botrytis* sp. houve um aumento na contaminação, sendo, inclusive, o único fungo associado às sementes de *Luehea divaricata* em que esse comportamento foi observado, provavelmente porque não contava com organismos que controlassem sua multiplicação, como parece ter acontecido em relação aos outros fungos verificados nas sementes em estudo.

Em relação ao *Cladosporium* sp. (IV=21,7) e *Eppicoccum* sp. (IV=12,63) não houve efeito significativo das árvores doadoras de sementes ($p=0,0672$; $p=0,4499$ respectivamente), dos períodos avaliados ($p=0,1277$; $p=0,7465$ respectivamente) e tampouco da interação entre os fatores ($p=0,0672$; $p=0,1741$ respectivamente), observando-se uma média muito baixa para o primeiro gênero e moderado para o segundo (0,3% e 28,3% respectivamente) de sementes contaminadas.

Alguns dos gêneros fúngicos identificados no presente estudo, também foram observados por Maciel et. al (2013) em outro estudo com sementes de *Luehea divaricata* coletadas em Santa Maria e Restinga Seca, a saber: *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phoma* sp. e *Cladosporium* sp. Igualmente ao verificado no presente trabalho, o gênero *Fusarium* sp. foi aquele de maior incidência, alcançando 44% no teste papel filtro em um dos lotes avaliados pelos autores.

Além do trabalho anterior, dentre os poucos estudos que relataram a qualidade sanitária de sementes de *Luehea divaricata*, que eram pertencentes a Bolsa de Sementes do Programa Verde é Vida da AFUBRA, Mieth et al. (2007) também apontaram a incidência de gêneros comuns àqueles observados no presente trabalho, como *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp. e *Rhizoctonia* sp., os quais são frequentemente encontrados em sementes e podem se comportar como saprófitos externos na maioria dos testes de sanidade, seja em árvores ou em espécies agrícolas (MEDEIROS et al., 1992).

3.3.3 Grau de umidade

O grau de umidade das sementes de *Luehea divaricata* após quatro anos de armazenamento não foi afetado significativamente pelas árvores doadoras (IV=16,02; p=0,4087), obtendo-se uma média geral muito baixa (2,12%), o que confirma seu comportamento ortodoxo em relação ao armazenamento. As sementes ortodoxas têm tolerância de até 5% de desidratação (FARRANT et al., 1993), nível que diminui a disponibilidade de água e dificulta o ataque de fungos de armazenamento, ao mesmo tempo que eleva a longevidade das sementes (HARRINGTON, 1972; NKANG, 2002), conforme foi observado no presente trabalho. Espécies que possuem sementes ortodoxas podem ficar armazenadas com baixo teor de umidade por maiores períodos de tempo, sem que sofram danos em seu metabolismo e percam sua viabilidade (MARCOS FILHO, 2005). De maneira semelhante, sementes de *Peltophorum dubium* (canafístula) apresentaram 5,13% de umidade decorridos três anos de armazenamento em refrigerador (GOMES, 2017).

Em um outro estudo realizado também com um lote de sementes de *Luehea divaricata*, coletado no município de Santa Maria em 2010 e armazenado no interior de câmara fria (8° C e 80% de umidade relativa do ar) acondicionado em saco de papel kraft pelo período de sete meses o teor de água foi de 15,61% (DUTRA et al., 2016), bem superior ao verificado no presente trabalho, possivelmente devido à diferença no período de armazenamento já que as condições ambientais de armazenamento foram similares. Já em sementes recalcitrantes de *Eugenia involucrata*, o grau médio de umidade foi de 48,7%, após 10 dias de armazenamento em refrigerador (STEFANEL, 2016).

3.4 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que é possível manter a viabilidade das sementes mesmo após longos períodos de conservação, no caso específico, quatro anos, em refrigerador. A variação observada na incidência de alguns gêneros fúngicos ao longo do armazenamento pode ser resultante da atuação isolada ou combinada de fatores ambientais e genéticos, os quais podem ter implicações na qualidade fisiológica e sanitária das sementes. Considerando-se o grau de umidade determinado nos lotes de sementes de *Luehea divaricata*, é possível confirmar sua classificação como ortodoxa durante o armazenamento.

4 MICROPROPAGAÇÃO

4.1 Rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*: o efeito do ácido indolbutírico e período de cultivo

Manuscrito em fase final de revisão para submissão

IN VITRO RHIZOGENESIS OF *Luehea divaricata*: THE EFFECT OF INDOLEBUTYRIC ACID AND CULTIVATION PERIOD

ABSTRACT

The demand for seeds and seedlings of native forest species for use in recovery projects has increased considerably, and tissue culture, through the micropropagation technique, could be an important alternative for propagation of species, such as *Luehea divaricata*, which presents few individuals to collect enough seeds for the production of seedlings. The objective of this work was to evaluate the effect of indolebutyric acid on the *in vitro* rhizogenesis, as well as to optimize the period of *in vitro* culture of this species. The addition of IBA in the range of 10 to 20 μM provided the best results for rhizogenesis, with averages between 80.50% and 94.33%. The concentration 10 μM again stood out, with 52.67% for formation of secondary roots. The concentrations of 10 or 20 μM IBA are efficient to root formation in shoots of *Luehea diva ricata* at 60 days of *in vitro* culture.

Key-words: Micropropagation; Forest species; Auxin.

INTRODUCTION

Luehea divaricata Martius et Zuccarini is a native forest species of the Brazilian Pampa and Atlantic Forest biomes, belonging to the Malvaceae family, popularly known as açoita-cavalo (LORENZI, 2008; FLÔRES et al., 2011; SILVA et al. 2019). It is a fast-

growing pioneer plant and only 26.32 individuals/ha were verified according to the frequency records in São Martinho da Serra (transition between Mata Atlântica and Pampa biomes) (FIGUEIREDO, 2014). However, up to 46 individuals per hectare were recorded in the Mixed Ombrophilous Forest of the Atlantic Forest biome (CARVALHO, 2008), while the values observed in the municipality of Santo Ângelo (Atlantic Forest) were 76.96 individuals/ha (HÜLLER et al., 2011). These data highlight that these natural populations have suffered degradation and reduction in their reproduction numbers, which evidence the importance of the need for recovery and restoration of degraded areas and the great contribution of research with native species to the forest and environmental sector.

In view of this, the demand for seeds and seedlings of native forest species for use in recovery projects has increased considerably, and tissue culture through the micropropagation technique may be an important alternative for the propagation of species such as *Luehea divaricata*, which has few individuals to collect seeds in sufficient quantity and quality to produce seedlings. Thus, the technique enables using seeds collected from the few *Luehea divaricata* mother trees found, which will guarantee genetic variability of the explants for *in vitro* multiplication (OLIVEIRA et al., 2013) and thereby enable species perpetuation and the production of healthy seedlings for use in projects.

The technique has a number of advantages, including the possibility of large-scale multiplication in a small physical space and shorter time, and not directly dependent on climatic factors (OLIVEIRA et al., 2013). However, despite having advantages, the technique needs to be directed to the species under study, evaluating the most appropriate nutrient medium to be used, the need for the use of phytohormones, the period of *in vitro* cultivation, among other aspects which may vary from one species to another. As a result, work has been carried out with native forest species in order to make this technology accessible and economically viable (XAVIER et al., 2013).

Thus, the present work aimed to evaluate the effect of different IBA concentrations on the *in vitro* rhizogenesis of *Luehea divaricata*, as well as to optimize the *in vitro* culture period of the species.

MATERIAL AND METHODS

The test was conducted at the Tissue Culture Laboratory of the Biotechnology and Improvement Center of the Department of Plant Technology located at the Federal University of Santa Maria - UFSM, in Santa Maria, RS, Brazil.

The present experiment was conducted in a completely randomized design in a 5x2 bifactorial arrangement, with the treatments consisting of adding different IBA concentrations (0; 10; 20, 30 or 40 μ M) to the nutrient medium and the cultivation periods (30 or 60 days), totaling 10 treatments with six repetitions each. Each experimental unit consisted of a 150mL flask containing 30mL of nutrient medium and three explants. Nodal segments of *Luehea divaricata* approximately 10mm long from seedling development obtained through *in vitro* germination and cultivated in MS nutrient medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) were used as explants over a period of 60 days.

The nutrient medium used was WPM - Woody Plant Medium (LLOYD; McCOWN, 1980) reduced to half of its initial concentration (WPM/2) (SILVA et al., 2019). The nutrient medium was added with 30 g L⁻¹ sucrose, 50 mg L⁻¹ myo-inositol and 7g L⁻¹ agar, and the pH adjusted to 5.8 before inclusion of the agar and the flasks were subsequently autoclaved for 15min at 121°C and 1atm of pressure.

After inoculation of the explants in the nutrient medium, the flasks were sealed with aluminum foil and kept in a culture room in the same medium until the end of the evaluations, with a temperature of 25 \pm 3°C, photoperiod of 16h and light intensity of 20 μ mol m⁻².s⁻¹ provided by cool white daylight fluorescent lamps.

Survival (green-colored explants), establishment (explants which showed any developmental aspect), contamination with microorganisms (presence of fungal mycelia or bacterial colonies next to the explants and/or nutritive medium), primary root formation (primary adventitious roots originating from the explant base), secondary root formation (second order lateral adventitious roots originating from the primary), and calluses were evaluated at 30 and 60 days, with all being expressed as a percentage. In the last evaluation, the primary root length (cm) and plant height (cm), were measured from the stem base to the tip of the stem apex were also evaluated.

After testing, the error normality by the Kolmogorov-Smirnov was tested and the homogeneity of variances by the Bartlett test, when it was necessary the means were transformed by the $\sqrt{x+0.5}$ function, with x being the observed value. They were subsequently submitted to analysis of variance, and when the value of F was significant, the comparison of the means by the F-test was used for qualitative treatments and the polynomial regression analysis for the quantitative treatments, all at the 5% probability level of error. The precision of the tests was estimated by the variation index (VI), calculated by $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, in which the VI is equal to the coefficient of variation (CV) divided by the square root of the number of repetitions (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009). The Sisvar (Variance Analysis System) statistical package for Windows[®] version 5.1 was used (FERREIRA, 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

There was no significant effect of different IBA concentrations ($p = 0.5627$; $p = 0.5627$; $p = 0.0854$ respectively), cultivation period ($p = 0.1635$; $p = 0.1635$; $p = 0.6431$, respectively), or the interaction between the two main factors ($p = 0.5627$; $p = 0.5627$; $p = 0.9275$, respectively) for the survival (VI = 3.20), establishment (VI = 3.20) and total contamination (VI = 7.82) variables, with satisfactory overall averages of 97%, 97% and 8.3% respectively. These results are favorable to continue the micropropagation process, since the

contamination was low in addition to the seedlings surviving and establishing in the evaluated period. Survival in another study with *Luehea divaricata* seedlings grown in WPM/2 nutrient medium for 30 days with IBA “pulse” treatment was only 57.32%; much lower than that observed in the present study. In contrast, contamination was high at 24.84% (SILVA et al., 2019).

For primary root formation (VI = 5.47), there was only a significant effect of the different IBA concentrations ($p = 0.0000$), but not of the period ($p = 0.1119$) or of the interaction between the main factors ($p = 0.7017$). The values obtained in the primary root formation fit a quadratic regression, where the maximum technical efficiency (MTE) was estimated to occur at 26 μM of IBA (Figure 1).

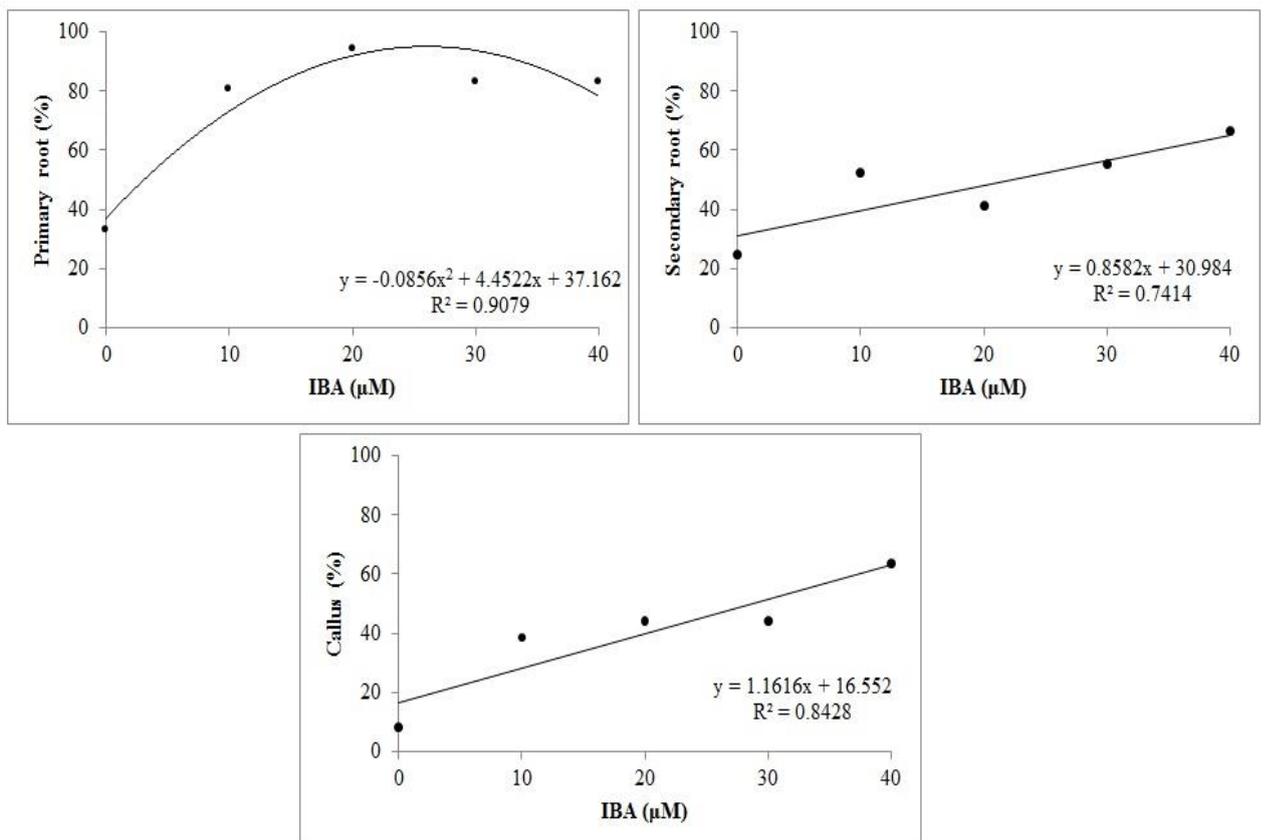


Figure 1- Means of primary root (%), secondary root (%) and callus (%) formation in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the different concentrations of IBA (0, 10,

20, 30 or 40 μM) in WPM/2 nutritive medium, regardless the *in vitro* culture period (30 or 60 days).

In Figure 1 it can be seen that the addition of IBA in the range of 10 to 20 μM provided the best results with mean rhizogenesis between 80.50% and 94.33% respectively, and a reduction in rhizogenesis thereafter. On the other hand, there was only 33% of primary root formation in the absence of auxin, showing that the phytohormone was necessary to increase rhizogenesis. These results are positive for the *Luehea divaricata* micropropagation, since the rooting stage is one of the most difficult to succeed. Some factors which influence the *in vitro* development and rooting of the species include the nutrient medium composition, where the use of auxins may help (as occurred in the present work), since this class of phytohormones is considered the only one which increases primary root formation (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

The rhizogenesis found in a previous work with *Luehea divaricata* (previously mentioned) using the same seed lot was only 25.18% (SILVA et al., 2019); a value much lower than that observed in the present study. However, it should be noted that this average was obtained by applying lower IBA concentrations in “pulse” treatment for 15 days in WPM/2 nutrient medium, and then 15 days in the absence of phytohormone (totaling 30 days of cultivation in nutrient medium). This methodology of the “pulse” treatment was therefore inefficient, since the application of auxin in the present experiment even at low concentrations in nutritive medium with the same composition provided a longer contact time with the explants, and resulted in greatly increased rhizogenesis.

Luehea divaricata demonstrates as not being recalcitrant to *in vitro* rooting, as observed in other species such as *Peltophorum dubium*, where root formation after 60 days of cultivation in MS medium supplemented with 10 μM IBA and added vermiculite was only

36.78% (CURTI; REINIGER, 2014), again much lower than the value found in the present work. However, an appropriate tissue hormonal balance should be established, which is specific for each studied species (DIAS et al., 2012). To illustrate, there was no root formation in the *in vitro* rooting of *Genipa americana* genotypes in the absence of IBA, contrary to what was recorded in the present study, and the use of 9.8 μM auxin resulted in the highest rooting percentages observed, regardless of genotype, obtaining values of 43.3% and 70% (ROCHA et al., 2008); however, values lower than those obtained in the present study using similar concentration of the phytohormone.

Regarding the secondary root (VI = 5.70) and callus formation (VI = 6.33), there was a significant effect of different IBA concentrations ($p = 0.0046$; $p = 0.0003$, respectively) and period ($p = 0.0000$; $p = 0.0000$, respectively), but there was no interaction between the two factors ($p = 0.2449$; $p = 0.3480$, respectively). Regarding concentrations, a linear equation was adjusted for both variables (Figure 1), while the means observed in both periods are presented in Table 1.

Table 1 – Means of secondary root (%) and callus formation in plants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the *in vitro* culture period (30 or 60 days), regardless of the different concentrations of IBA (0, 10, 20, 30 or 40 μM).

Period	Secondary root (%)	Callus (%)
30	19.83 b*	22.03 a
60	76.46 a	57.53 b
AVERAGE	48.15	39.78
IV**	5.70	6.33

* Means followed by the same letter in the columns do not differ significantly by the F test at the 5% error probability level. ** Index of variation (IV), calculated by CV/\sqrt{N} , where IV is

equal to coefficient of variation (CV) divided by the square root of the number of repetitions (N).

Also for secondary root formation, the presence of IBA provided the most promising results, once again highlighting the 10 μM concentration with 52.67% of secondary root formation, and then 40 μM with 66.41%. The root system formed by primary and secondary roots is more functional because in addition to ensuring the development of the produced seedling, the root system branches and the presence of absorbent hairs help the plants survive later during acclimatization, as also observed in *Peltophorum dubium* by Curti e Reiniger (2014). However, it must be considered that the phytohormone concentration may affect the quality of the roots, especially regarding the vascular connection, and the formation of normal roots mainly occurs at lower concentrations because the high ones tend to produce calluses (ASSIS; TEIXEIRA, 1998), as observed in the present work and which will be discussed below.

On the other hand, secondary root formation in *Peltophorum dubium* seedlings after 60 days of cultivation in WPM/2 nutrient medium combined with vermiculite and 10 μM IBA was only 9.43% (CURTI, 2014), while callus formation was very high (90.29%), which probably resulted in low root formation, since calogenesis at the base of seedlings can affect root quality (ERIG; SCHUCH, 2004).

Callus formation (Figure 1) was high in all treatments in the presence of IBA, however this fact did not prevent rhizogenesis in the species, as can be seen in Figure 2. Also, higher callus formation was also observed in the presence of auxin concentrations above 5 μM in *in vitro* rooting of *Cydonia oblonga*, whereas callus formation did not occur in the absence of phytohormones (ERIG; SCHUCH, 2004). Conversely, 96% callus formation in *Peltophorum dubium* seedlings at 35 days of cultivation in MS nutrient medium plus vermiculite regardless

of the tested IBA concentrations (0, 5, 10 or 20 μM) (CURTI, 2014), apparently compromised root formation, which was only 9.9% in this case. This result was probably due to the hormonal balance that was established with the endogenous levels of seedling hormones and the addition or not of phytohormones in the nutrient medium, favoring the callus formation, and not the roots.



Figure 2 - Illustrative representation of plants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. cultivated in WPM/2 nutritive medium after 60 days of *in vitro* culture depending of the different concentrations of IBA: A - 0 μM ; B-10 μM ; C-20 μM ; D-30 μM ; or E-40 μM .

The better results regarding the effect of the cultivation period on the formation of secondary roots were obtained at 60 days. This fact emphasizes the importance of prolonging cultivation of this species until this period, not due to the rhizogenesis, but especially to promote improvement in the quality of the root system (Table 1), as previously discussed in relation to the effect of auxin concentrations on this variable.

There was no significant effect of different IBA concentrations ($p = 0.3012$; $p = 0.0844$, respectively) for the height (VI = 4.81) and root length (VI = 5.45) variables evaluated only at 60 days, obtaining averages of 2.18 cm and 4.43 cm respectively. Similarly, the root length in *Peltophorum dubium* occurred independently of the IBA concentrations added (0, 10 or 20 μM) to the WPM/2 nutrient medium combined with vermiculite, but an

average of just 1 cm was obtained in seedlings grown for 60 days (CURTI, 2014); below the value found in the present study (4.43 cm).

Against what was observed in the present study, root length in *Amburana acreana* have been significantly affected by IBA, and the highest averages occurred with low concentrations of the growth regulator. However, *in vitro* formation of adventitious roots occurred in all treatments, regardless of the presence or absence of IBA (FERMINO JUNIOR et al, 2012), similarly to what was observed in this case. These contrasting results may be justified by the evidence that root formation is genetically controlled, generating wide variation among species, cultivars and clones with respect to greater or lesser ability to form roots (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

As the micropropagation process always aims at optimizing time and costs, it would be advisable to use 10 μ M auxin to obtain satisfactory results in the rhizogenesis step of *Luehea divaricata*.

CONCLUSION

Concentrations of 10 or 20 μ M IBA are efficient to form rhizogenesis in *Luehea divaricata* seedlings at 60 days of *in vitro* cultivation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assis, TF, Teixeira SL. Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres A, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa CNPH; 1998. v.1, p.261-296.

Carvalho PER. Espécies Arbóreas Brasileiras. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008. 1039p.

Curti AR. Rizogênese *in vitro* e *ex vitro* em *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT. 2014. 136f. Tese de Doutorado - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria.

Curti AR, Reiniger LRS. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. *Ciência Rural*, 2014; 44(2): 314-320.

Dias PC, Oliveira LS de, Xavier A, Wendling I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 2012; 32(72): 453-462.

Erig AC, Schuch MW. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. *Ciência Rural*, 2004; 34 (5): 1443-1449.

Fermino Junior PCP, Scherwinski-Pereira JE. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). *Ciência Florestal*, 2012; 22(1): 1-9.

Ferreira, DF. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e agrotecnologia*, 2014; 38(2): 109-112.

Figueiredo MCS. Florística de mata ciliar em São Martinho da Serra, RS, Brasil. 2014. 65f. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria.

Flôres AV, Reiniger LRS, Curti AR, Cunha ACMCM, Golle DP, Bassan JS. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. *Ciência Florestal*, 2011; 21(1): 175-182.

Hüller A, Rauber A, Wolski MS, Almeida NL, Wolski SRS. Estrutura fitossociológica da vegetação arbórea do parque natural municipal de Santo Ângelo, Santo Ângelo, RS. *Ciência Florestal*, 2011; 21(4): 629-639.

Lloyd G, Mccown B. Commercially feasible micropropagation of montains laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. International Plant Propagation Soc.*, 1980; 30: 327-421.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1. Nova Odessa: Plantarum. 2008. 384p.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962; 15: 473-497.

Oliveira LS, Dias PC, Brondani GE. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 2013; 33(76): 439-453.

Pimentel-Gomes F. Curso de estatística experimental. 15. ed. Piracicaba: Ed. Livraria Nobel S.A., 2009. 451p.

Rocha MAC, Costa MAPC, Silva AS, Ledo CAS, Moreira MJS, Bastos LP. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2008; 30(3): 769-774.

Silva KB, Reiniger LRS, Rabaiolli SMS, Stefanel CM, Silva LD. Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. *Ciência Florestal*, 2019; 29(3): 1282-1295.

Xavier A, Wendling I, Silva RL. *Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas*. Viçosa – MG: 2.Ed UFV; 2013. 279 p.

4.2 Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de *Luehea divaricata*

Manuscrito em fase final de revisão para submissão

Resumo - O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do período de cultivo na micropropagação de *Luehea divaricata*. Os tratamentos foram constituídos pelos períodos (14; 21; 28; 40; 56; 70; 84; 102; 116; 130; 154, 186 ou 200 dias) de cultivo *in vitro*, sem subcultivo ou transferência para meio nutritivo fresco. A sobrevivência e o estabelecimento ficaram em torno de 90% até os 84 dias de cultivo, a partir deste período as culturas começaram a registrar mortalidades mais acentuadas. Para as variáveis número de folhas e folhas com senescência, simultaneamente, o período de cultivo de 56 dias foi o que mostrou uma proporção mais adequada, em que para cada nove folhas formadas apenas uma está senescendo. Em relação a formação de raízes primárias, médias superiores a 50% foram observadas após 70 dias de cultivo *in vitro*, chegando aos melhores resultados (60%) aos 200 dias de cultivo. Já para raízes secundárias, as maiores médias foram observadas após 102 dias (41,5%), alcançando 45,28% aos 200 dias de cultivo *in vitro*. Consideradas as variáveis sobrevivência, estabelecimento, contaminação, formação de folhas e folhas senescentes a necessidade de subcultivo ocorre em aproximadamente 60 dias de cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: açoitá-cavalo; ciclo de cultivo *in vitro*, senescência.

Effect of different cultive periods on the micropropagation of *Luehea divaricata*

Abstract - The objective of the present study was evaluate the effect of different period on the *in vitro* culture of micropropagated *Luehea divaricata*. The treatments were constituted by the periods (14; 21; 28; 40; 56; 70; 84; 102; 116; 130; 154, 186 or 200 days) the *in vitro*

culture, without subculture or transfer to a new nutritive medium. The survive and establishment stayed around 90% up to 84 days of culture, from this period the cultures began to register more pronounced mortalities. For the number of leaves and leaves with senescence, simultaneously, the culture period of 56 days was the one that showed the most appropriate proportion, in wich for nine leaves formed one is senescence. Regarding the formation of primary roots, averages above 50% were observed after 70 days of *in vitro* culture, providing the best results (60%) at 200 days. For secondary roots, the highest averages were observed after 102 days (41.5%), reaching 45.28% at 200 days of *in vitro* culture. Considering the variables survival, establishment, contamination, formation of leaves and senescent leaves the need for subculture occurs in approximately 60 days of *in vitro* culture.

Key-words: açoita-cavalo; in vitro culture cycle; senescence.

Introdução

Luehea divaricata é uma espécie florestal nativa do Brasil, pertencente a família Malvaceae, que possui um grande potencial para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, e por esse motivo teve suas populações naturais devastadas nas últimas décadas. Embora ainda não esteja na lista oficial de espécies em vias de extinção, a conservação genética de *Luehea divaricata* é de suma importância para garantir a preservação da espécie, e a micropropagação surge como uma alternativa tanto para a multiplicação dos genótipos de interesse, quanto para a conservação de recursos genéticos (Moritz et al, 2009; Flôres et al, 2011).

A micropropagação de espécies florestais nativas do Brasil apresenta grande potencial na multiplicação de genótipos de interesse e conservação de germoplasma. Essa técnica da cultura de tecidos permite obter, simultaneamente, avanços no melhoramento de plantas por

meio da propagação clonal de genótipos superiores, livres de doenças e independente de fatores sazonais (Oliveira et al., 2013), e, também, na conservação de recursos genéticos florestais realizando-se a micropropagação de explantes isolados a partir da germinação *in vitro* de sementes.

Através da germinação *in vitro* das sementes, é possível manter a variabilidade genética das populações remanescentes, pois as sementes são originadas de células que passaram por meiose, e apresentam a recombinação entre segmentos cromossômicos, implicando na formação de gametas com diferentes constituições genótípicas, o que garante a diversidade genética das plantas de origem seminal (Araujo et al, 2018). Com isso, a micropropagação de *Luehea divaricata* utilizando propágulos seminais permite que determinadas características fenotípicas de interesse sejam herdadas para a próxima geração, ao mesmo tempo em que a variabilidade genética esteja presente, o que possibilita ganhos ao passar de uma geração para outra (Araujo et al, 2018).

No entanto, o sucesso da micropropagação em espécies florestais nativas envolve uma série de fatores, dentre eles estão os componentes nutricionais do meio, fitorreguladores empregados, fatores genéticos, e também, variáveis relacionadas à contaminação por microrganismos, a oxidação fenólica, a senescência foliar e ao período de cultivo *in vitro* (Oliveira et al., 2013; Sartor et al., 2013). A senescência foliar, em especial, é considerada um desarranjo metabólico que pode ser influenciado por diversos fatores, entretanto, é um processo natural relacionado ao ciclo de vida dos tecidos. Pode ser estimulada pela liberação de etileno pelos tecidos vegetais cultivados *in vitro* e, de modo geral, está associada à perda de clorofila, perda de coloração e aumento da respiração (Taiz & Zeiger, 2004; Barria, 2005).

Poucos estudos relatam o monitoramento da senescência foliar em tecidos cultivados *in vitro*. Em brotações de *Annona glabra* L. (ariticum), nas quais foram testadas as citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), Thidiazuron (TDZ), Cinetina (CIN) e Zeatina (ZEA) na

concentração de 1 mg L^{-1} , adicionadas ao meio nutritivo WPM, após 45 dias de cultivo *in vitro*, foi observado que esses fitorreguladores foram eficientes no retardo da degradação de clorofilas, reduzindo, assim, a senescência foliar durante o cultivo *in vitro* desta espécie (Oliveira et al., 2007). Já em *Moringa oleifera* L. (bastão-de-tambor), outra espécie arbórea, os sinais de senescência, os quais dificultaram a micropropagação da espécie, foram desencadeados em torno dos 40 dias de cultivo *in vitro* na ausência de reguladores de crescimento (Cysne, 2006).

Os resultados obtidos com esse tipo de estudo podem auxiliar no planejamento da micropropagação, indicando as necessidades de subcultivos, tanto para otimizar a multiplicação como para viabilizar a conservação *in vitro* de germoplasma. A necessidade de subcultivos pode comprometer o sucesso da micropropagação, sendo extremamente importante determinar o período de cultivo *in vitro* que a espécie consegue permanecer no mesmo meio nutritivo, estendendo ao máximo esse tempo para assim reduzir a mão-de-obra, espaço necessário e custos. O período de cultivo *in vitro* está relacionado ao comportamento e desenvolvimento da espécie nas determinadas condições do ensaio, algumas espécies podem permanecer meses em um mesmo meio nutritivo sem a adição de fitorreguladores, ao passo que outras conseguem sobreviver apenas algumas semanas (Sá et al, 2012; Xavier, 2013). Frente ao exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do período de cultivo na micropropagação de *Luehea divaricata*.

Material e métodos

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, sendo que os tratamentos foram constituídos dos períodos (14; 21; 28; 40; 56; 70; 84; 102; 116; 130; 154, 186 ou 200 dias) de cultivo *in vitro*, sem subcultivo ou transferência para meio nutritivo fresco, totalizando 13 tratamentos. As unidades experimentais foram

compostas por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo, e dois explantes. Foram utilizados, no total, 106 explantes distribuídos em 53 frascos.

Utilizaram-se como explantes segmentos nodais de *Luehea divaricata* com aproximadamente 10mm de comprimento, provenientes do desenvolvimento de plântulas obtidas via germinação *in vitro*, com cultivo em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) durante um período de 60 dias, conforme metodologia desenvolvida por Flôres (2007) e León (2010). O meio nutritivo utilizado neste ensaio foi o MS, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, e o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15min a 121°C e 1atm de pressão.

Após a inoculação dos explantes no meio, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20μmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas ao final de cada período de cultivo e as variáveis analisadas foram: sobrevivência (explantes com coloração verde) (%), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento) (%), contaminação (presença de micélios fúngicos ou colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo) (%), número total de folhas, número de folhas com sinal de senescência (%) (folhas com perda da cloração verde ou com manchas escurecidas), plantas com raízes primárias (raízes adventícias primárias originadas da base do explante) (%) e raízes secundárias (raízes adventícias laterais de segunda ordem originadas a partir das primárias) (%).

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov- Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as médias foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. A seguir, foram submetidas

à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se para a comparação das médias o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. 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). Empregou-se o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (Ferreira, 2014).

Resultados

Houve efeito significativo dos diferentes períodos avaliados sobre todas as variáveis avaliadas: sobrevivência (p=0,0000; IV=1,94), estabelecimento (p=0,0000; IV=2,10), contaminação microbiana (p=0,0136; IV=2,77), número de folhas (p=0,0000; IV=3,99), folhas com sinais de senescência (p=0,0000; IV=4,49), raiz primária (p=0,0000; IV=2,64) e raiz secundária (p=0,0000; IV=2,73).

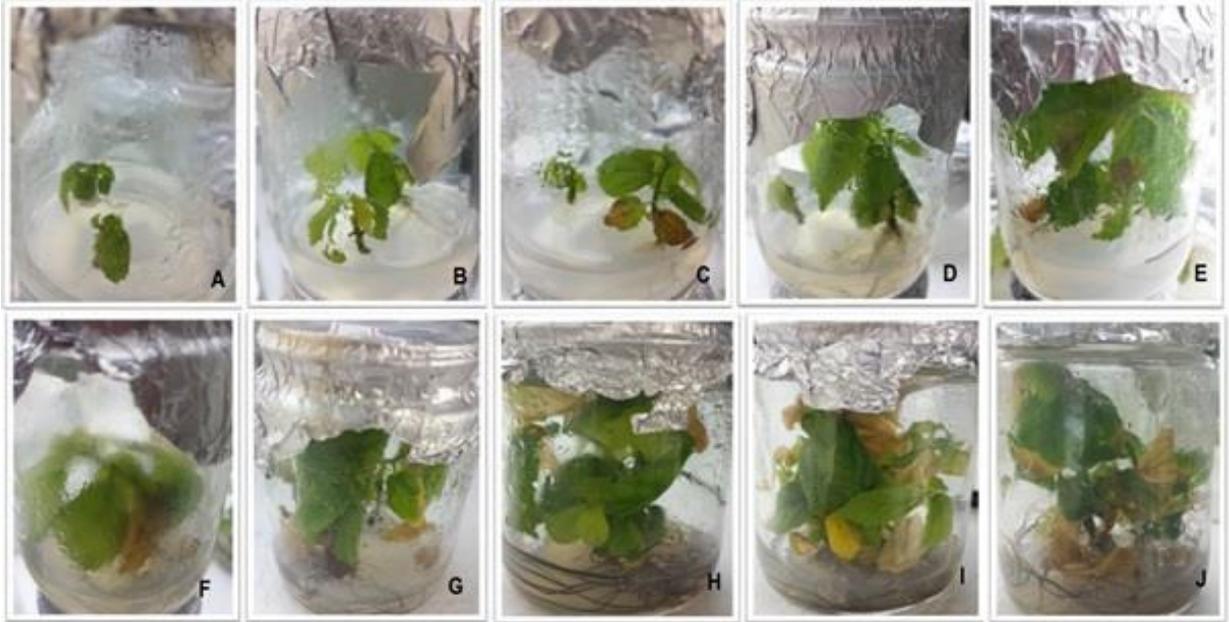


Figura 1. Representação ilustrativa das culturas *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em meio nutritivo MS em função dos períodos de cultivo: A) 40; B) 56; C) 70; D) 84; E) 102; F) 116; G) 130; H) 154, I) 186 ou J) 200 dias.

Figure 1. Illustrative representation of *in vitro* cultures of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. in MS nutritive medium depending on the culture period: A) 40; B) 56; C) 70; D) 84; E) 102; F) 116; G) 130; H) 154, I) 186 or J) 200 days.

Tabela 1. Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), contaminação (%), número de folhas, folhas com sinal de senescência, raízes primárias (%) e raízes secundárias (%) em culturas *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função dos diferentes períodos de cultivo avaliados.

Table 1. Average of survival (%), establishment (%), contamination (%), number of leaves, leaves with signal of senescence, primary roots (%) and secondary roots (%) on *in vitro* cultures of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the culture period evaluated.

Período	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Contaminação (%)	Número de folhas	Folhas com sinal de senescência	Raiz primária (%)	Raiz secundária (%)
14	100,00 a	89,62 a	3,77 a	3,10 d	0,00 a	5,60 d	0,00 d
21	96,22 a	90,56 a	3,77 a	4,49 d	0,11 a	16,00 d	0,00 d
28	96,22 a	91,50 a	3,77 a	5,67 c	0,33 a	29,24 c	1,80 d
40	96,22 a	92,45 a	3,77 a	6,86 c	0,69 a	39,62 b	8,40 c
56	96,22 a	92,45 a	5,66 a	9,30 b	1,41 a	46,22 b	16,98 c
70	94,33 a	90,56 a	7,54 a	10,49 b	2,39 b	54,71 a	26,41 b
84	90,56 a	89,62 a	7,54 a	11,28 b	3,15 b	55,66 a	33,96 b
102	85,84 b	84,90 a	11,32 b	11,90 b	4,16 c	57,54 a	41,50 a
116	83,01 b	82,07 a	11,32 b	12,37 b	4,66 c	58,49 a	45,28 a
130	80,18 b	83,01 a	15,09 b	12,84 a	5,69 d	58,49 a	44,33 a
154	67,92 c	67,92 b	16,98 b	14,71 a	7,94 e	62,26 a	47,16 a
186	48,11 d	48,11 c	18,86 b	14,05 a	9,92 f	60,37 a	44,33 a
200	33,96 e	33,96 d	18,86 b	14,45 a	11,43 g	60,37 a	45,28 a
MÉDIA	82,21	79,74	9,86	10,11	3,99	45,35	27,34
IV**	1,94	2,10	2,77	3,99	4,49	2,64	2,73

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

Discussão

A sobrevivência e o estabelecimento *in vitro* ficaram em torno de 90% até os 84 dias de cultivo, a partir deste período as culturas começaram a registrar mortalidades mais acentuadas (Tabela 1). Esse período de sobrevivência permite que as culturas permaneçam no mesmo meio de cultivo, não sendo necessários subcultivos do material vegetal, tornando o processo de micropropagação mais econômico e ao mesmo tempo mais seguro em função da

menor probabilidade de perda das culturas pela manipulação. Da mesma maneira, a contaminação microbiana até os 84 dias foi de apenas 7,54%, valor considerado baixo para o cultivo *in vitro*, e, ainda mais, considerando-se que o maior valor (18,86%) observado para essa variável ocorreu após 200 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 1). A contaminação por microorganismos é um problema frequentemente relatado na micropropagação, principalmente por inviabilizar a técnica caso seja muito elevada (Oliveira et al., 2013; Torres et al., 2016), no entanto esse não foi um problema enfrentado no cultivo *in vitro* de *Luehea divaricata*.

Para as variáveis número de folhas e folhas com sinais de senescência, simultaneamente, observa-se que, apesar das plantas continuarem a desenvolver um número significativo de folhas (14,05) até cerca de 180 dias de cultivo *in vitro* sem a troca do meio nutritivo por meio fresco, o número de folhas com senescência (9,92) nesse período foi muito elevada também, indicando que a relação folhas novas versus folhas com sinais de senescência não é positiva. O período de cultivo que mostra uma proporção mais adequada parecer ser de 56 dias, no qual para cada nove folhas formadas apenas uma está senescendo (Tabela 1).

Assim, mesmo com as culturas *in vitro* permanecendo no meio nutritivo original, com a disponibilidade de nutrientes reduzindo-se cada vez mais, a espécie manteve a capacidade morfogenética dos tecidos, pois novas folhas se desenvolveram ao mesmo tempo que já havia sinais de senescência, incluindo-se abscisão foliar. Isso ocorreu provavelmente porque as culturas redirecionaram os nutrientes para folhas novas, em decorrência de um aumento gradual na síntese de etileno, que, por sua vez, ativa várias enzimas de degradação celular e potencializa a remobilização de estruturas altamente energéticas contidas principalmente nos cloroplastos (Srivastava, 2002). Essa liberação de etileno pelos tecidos vegetais cultivados *in vitro* está associada à perda de clorofila, perda de coloração e aumento na respiração (Taiz & Zeiger, 2004; Barria, 2005).

Os sinais de senescência foliar nas culturas de *Luehea divaricata* iniciaram aos 40 dias, mas em níveis muito reduzidos, sendo que apenas aos 56 dias foi possível obter média superior a uma folha com sinal de senescência por explante (Tabela 1; Figura 1). De maneira similar, em *Handroanthus chrysotrichus* (ipê-amarelo), a senescência foliar foi observada aos 40 dias de cultivo *in vitro*, com a média superior a uma folha senescente por planta (Paim, 2014). Já em *Moringa oleifera* L. (bastão-de-tambor), os sinais de senescência foram desencadeados em torno dos 30 dias de cultivo *in vitro*, fato que dificultou a micropropagação da espécie (Cysne, 2006).

Em relação à formação de raízes primárias, médias superiores a 50% foram observadas após 70 dias de cultivo *in vitro*, chegando aos melhores resultados (60%) observados aos 200 dias de cultivo. Em relação as raízes secundárias, as maiores médias foram observadas somente após 102 dias (41,5%), alcançando aos 200 dias de cultivo *in vitro* médias de 45,28% (Tabela 1; Figura 1). Considerando-se as dificuldades de enraizamento *in vitro* das espécies lenhosas, e analisando-se que no presente trabalho não foram adicionados fitorreguladores ao meio nutritivo, a formação *in vitro* de raízes observada está relacionada à biossíntese de auxinas pelas plantas, haja vista que, muitas vezes, o nível de auxinas endógenas pode ser suficiente para promover a indução de raízes (Souza & Pereira, 2007). No entanto, o período para a formação de raízes primárias e secundárias foi de aproximadamente três meses - o que torna o processo de micropropagação lento – sendo que a partir dos 70 dias o processo de senescência se intensificou.

A suplementação do meio nutritivo com auxinas face a esse comportamento seria justificada, promovendo a rizogênese de forma mais rápida e eficaz, como foi verificado em outro trabalho realizado com essa espécie pelo nosso Grupo de Pesquisa, em que o emprego de 10 μM de AIB propiciou médias de formação de raízes primárias e secundárias de cerca de 80% e 50%, respectivamente, já aos 60 dias de cultivo *in vitro* (dados não publicados).

Conclusão

Consideradas as variáveis sobrevivência, estabelecimento, contaminação, número de folhas e folhas com sinal de senescência a necessidade de subcultivo ocorre em aproximadamente 60 dias de cultivo *in vitro*. A partir desse período, são registradas altas mortalidades e senescência foliar.

Referências

- Araujo, M. M.; Navroski, M. C.; Schorn, L. A. **Produção de sementes e mudas: um enfoque à Silvicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2018. 448p.
- Barria, M. J. Etileno em plantas superiores: Síntese e propriedades fisiológicas. In: Barrueto Cid, L. P. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 01, 102-125, 2005.
- Cysne, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e agrotecnologia*, v. 38, n 2, p 109-112, 2014. DOI: 10.1590/S1413-70542014000200001
- Flôres, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). 2007. 73 f. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Flôres, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011. DOI: 10.5902/198050982760

- León, E. A. B. **Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese *in vitro* em explantes de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Moritz, A.; Degenhardt, J.; Dutra, L. F.; Hansel, F. A.; Lima, B. H. de; Franceschi, C. do R. B.; Franciscon, L. Estabelecimento *in vitro* de *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 59, p. 37-44, 2009. DOI: 10.4336/2009.pfb.59.37
- Murashige, T & Skoog, F. K. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- Oliveira, L. M. et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 25-30, 2007. DOI: 10.1590/S0100-29452007000100008
- Oliveira, L.S.; Dias, P.C.; Brondani, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 445-460, 2013. DOI: 10.4336/2013.pfb.33.76.481
- Paim, A. F. **Micropropagação e análise da anatomia foliar de *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.) J. MATTOS**. 2014. 188 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Pimentel-Gomes, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: Ed. Livraria Nobel S.A., 2009. 451p.
- Sá, A. J.; Lédo, A. S.; Lédo, C. A. S.; Pasqual, M.; Silva, A. V. C.; Junior, J. F. S.; Sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 406-414, 2012. DOI: 10.1590/S1413-70542012000400004

- Sartor, F. R.; Zanotti, R. F.; Pôssa, K. F.; Pilon, A. M.; Fukushima, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.
- Souza, A. V. & Pereira, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.
- Srivastava, L. M. Vegetative storage protein, tuberization, senescence and abscission. In: Plant growth and development: hormones and environment. Oxford: **Academic Press**, v. 20, p. 473 – 520, 2002.
- Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- Torres, G. R. C., Houllou, L. M., De Souza, R. A. Control of contaminants during introduction and establishment of *Bambusa vulgaris in vitro*. **Research in Biotechnology**, v. 7, p 58-67, 2016. DOI: 10.19071/rib.2016.v7.3056
- Xavier, A.; Wendling, I.; Silva, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 279 p.

4.3 Crescimento mínimo e retomada de crescimento em brotações de *Luehea divaricata*

Manuscrito em fase final de revisão para submissão

Resumo - A conservação dos recursos genéticos de *Luehea divaricata* é de suma importância para garantir a perpetuação da espécie. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do sorbitol e do período de cultivo sobre o crescimento mínimo e a subsequente retomada do crescimento de brotações de *Luehea divaricata*. Foram realizados dois ensaios, um de crescimento mínimo e o outro de retomada de crescimento. No crescimento mínimo, observou-se redução nas médias de sobrevivência, estabelecimento, número de folhas, raiz primária e secundária na presença de sorbitol. Quando se considerou o período, observou-se redução aos 30 dias nas médias de raiz primária e secundária, número de folhas e brotos, seguida de aumento e estabilização. Na retomada de crescimento, para a sobrevivência, estabelecimento, número de folhas e brotos, a presença de sorbitol promoveu uma redução significativa nas médias. Em relação ao período, somente a partir dos 120 dias observou-se um decréscimo das médias na sobrevivência e estabelecimento. A presença de sorbitol é importante para realizar a conservação *in vitro* de *Luehea divaricata* via crescimento mínimo, o qual pode ser realizado por um período de até 120 dias. A subsequente retomada de crescimento das brotações conservadas na presença de sorbitol é limitada a 90 dias.

Palavras-chave: conservação *in vitro*; germoplasma; cultura de tecidos.

Minimum growth and resumed growth in *Luehea divaricata* shoots

Abstract - The conservation of genetic resources of *Luehea divaricata* is important to ensure the perpetuation of the species. The objective of this work was evaluate the effect of sorbitol and the effect of the cultivate period on minimum growth and subsequent resumed growth of *Luehea divaricata* shoots. Two tests were performed, one of minimal growth and other of resumed growth. For minimum growth, there was a reduction in averages of survival, establishment, number of leaves, primary and secondary roots in the presence of sorbitol. When the period was considered, it was observed a reduction at 30 days in averages of primary and secondary root, number of leaves and shoots, followed by increase and stabilization. In the resumed growth, for survival, establishment, number of leaves and shoots, the presence of sorbitol promoted a significant reduction in averages. In relation to period, only after 120 days a decrease of averages in survival and establishment was observed. The presence of sorbitol is important to carry out the *in vitro* conservation of *Luehea divaricata* via minimum growth, which can be carried out for up to 120 days. The subsequent resumed growth of the shoots preserved in presence of sorbitol is limited to 90 days.

Key-words: *in vitro* conservation; germoplasm; tissue culture.

Introdução

A conservação de germoplasma é uma das tarefas mais importantes dentro dos programas de melhoramento de plantas. Dentre as alternativas possíveis de conservação, a estratégia *in vitro* possibilita a manutenção de um grande número de acessos em um pequeno espaço físico, livre das intempéries e riscos que existem no campo, reduzindo os custos e

facilitando a disponibilidade de material para emprego direto no melhoramento genético. Assim, os denominados bancos de germoplasma *in vitro* são coleções mantidas em laboratório em condições de crescimento reduzido das amostras vegetais a partir de meristemas ou outros tecidos das plantas (Matsumoto et. al, 2010). No Brasil, são estimados existir cerca de 250 Bancos Ativos de Germoplasma de plantas, incluindo espécies florestais nativas, frutíferas e agrícolas (Costa et al., 2012).

Particularmente, no caso de espécies florestais nativas, a conservação em Bancos de Germoplasma é estratégica devido a vulnerabilidade desses recursos genéticos na natureza, que pode ser decorrente da intensa degradação ambiental nas últimas décadas, o que vem reduzindo drasticamente as populações naturais. Dentre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica é o que apresenta a maior diversidade de espécies arbóreas por unidade de área (454 espécies/ha) (Stehmann et al., 2009), no entanto, a erosão genética registrada neste bioma têm aumentado gradativamente nas quatro últimas décadas (Silva & Perelló, 2010). *Luehea divaricata* (Malvaceae) é uma espécie florestal nativa do bioma Mata Atlântica, que tem sido submetida a essa pressão antrópica, com suas populações naturais sendo devastadas ao longo dos anos em decorrência de sua madeira possuir um grande potencial para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas (Flôres et al., 2011). Sendo assim, o desenvolvimento de alternativas tecnológicas para garantir a perpetuação dessa espécie é essencial. Neste contexto, no presente trabalho, foi investigada a conservação *in vitro* de germoplasma de *Luehea divaricata* através da cultura de tecidos, mais especificamente pela metodologia de crescimento mínimo.

O crescimento mínimo é utilizado com sucesso para conservar germoplasma, e consiste em reduzir o máximo possível o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade. Esta diminuição na atividade metabólica pode ocorrer pela redução na intensidade de luz, temperatura, concentração dos componentes salinos e orgânicos ou pelo acréscimo de

reguladores de crescimento ao meio nutritivo (Withers & Williams, 1998), entre outras. Igualmente, o crescimento mais lento da cultura pode ser obtido com o emprego de alguns agentes osmóticos, como o manitol, sorbitol e a sacarose (Dumet et al., 1993).

Os agentes osmóticos adicionados ao meio nutritivo tem como principal objetivo desacelerar ou suprir totalmente o crescimento do material vegetal que se objetiva preservar, durante o maior tempo possível, sem, contudo, influenciar negativamente na estabilidade genética e viabilidade das plantas. Assim, esses agentes osmóticos promovem a remoção do excesso de água intracelular, por gradiente osmótico, e com isso a planta tem uma redução da capacidade de absorção de água e de nutrientes do meio nutritivo, o que resulta no crescimento mais lento da espécie (Barrueto Cid, 2010). No entanto, a eficiência da metodologia de crescimento mínimo deve ser comprovada com a subsequente retomada do crescimento das plantas, sob condições normais de cultivo, após um determinado período de conservação *in vitro*.

Trabalhos de conservação *in vitro* utilizando técnicas de crescimento mínimo têm mostrado resultados promissores em espécies florestais de importância econômica e ambiental, como por exemplo em *Eucalyptus grandis* (Watt et al., 2000), *Cedrela fissilis* Vell. (Nunes et al., 2003), *Hancornia speciosa* (Santos, et al., 2011), *Populus alba* (Hwida, 2012), entre outros. Entretanto, embora existam resultados promissores nestes estudos, seus protocolos não podem ser padronizados, já que as respostas podem variar em função da espécie, população, genótipo e idade da planta que se deseja conservar *in vitro*, entre outros fatores, que são característicos para cada caso. Frente a isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do sorbitol e do período de cultivo sobre o crescimento mínimo e a subsequente retomada do crescimento de brotações de *Luehea divaricata*.

Material e Métodos

Os dois ensaios, sendo um deles dedicado ao crescimento mínimo e o outro, à retomada do crescimento, foram realizados no laboratório do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, em Santa Maria, RS.

Os experimentos, que serão detalhados a seguir, foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo bifatorial 2x4, em que os tratamentos consistiram da adição do sorbitol (0 ou 10g L⁻¹) ao meio nutritivo, e os diferentes períodos de cultivo (30, 60, 90 ou 120 dias), totalizando oito tratamentos com oito repetições. Cada repetição foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes. Utilizaram-se como explantes segmentos nodais de *Luehea divaricata* com aproximadamente 7mm de comprimento, provenientes do isolamento de plântulas obtidas via germinação *in vitro*, com cultivo em meio nutritivo MS (Murashige; Skoog, 1962) durante um período de 60 dias. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Aos 30, 60, 90 e 120 dias, avaliaram-se, em cada ensaio, a sobrevivência (explantes com coloração verde) (%), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento) (%), formação de raiz primária (%) e de raiz secundária (%), número de folhas e número de brotos (%).

Crescimento mínimo

O meio nutritivo utilizado no ensaio de crescimento mínimo foi o MS reduzido à metade da concentração de sais (MS/2), acrescido de 15g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol, 7g L⁻¹ de ágar e sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão

do ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15min a 121°C e 1atm de pressão.

Retomada de crescimento

Após a realização do experimento de crescimento mínimo, as culturas foram expostas novamente às condições de desenvolvimento padrão para a espécie, que são usualmente utilizadas em nosso Grupo de Pesquisa, descritas a seguir. Nesse ensaio os tratamentos foram constituídos pela combinação do sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹) e dos períodos de cultivo (30, 60, 90 ou 120 dias) empregadas no experimento anterior (de crescimento mínimo).

Ao final dos 120 dias de cultivo do experimento de crescimento mínimo, foram retiradas as folhas e as raízes das culturas *in vitro* de cada tratamento, sendo assim obtidos os explantes (segmentos nodais), com aproximadamente 7mm, para o ensaio de retomada do crescimento, os quais foram inoculados em meio MS desta feita na ausência de sorbitol. Ao meio nutritivo foram acrescentados 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, e pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar. Posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15min a 121°C e 1atm de pressão.

Análises estatísticas

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as médias foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. A seguir, foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se para a comparação das médias o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. 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). Empregou-se o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (Ferreira, 2014).

Resultados

Crescimento mínimo

Para as variáveis sobrevivência (IV=4,35) e estabelecimento (IV=4,37), houve efeito significativo do sorbitol ($p=0,0041$; $p=0,0018$ respectivamente), mas não do período ($p=0,3929$; $p=0,5010$ respectivamente) e nem da interação entre os fatores principais ($p=0,3929$; $p=0,5010$ respectivamente). Observou-se que a presença de sorbitol no meio nutritivo afetou significativamente a sobrevivência e o estabelecimento das brotações (Tabela 1).

Já para as variáveis raiz primária (IV=5,73) e raiz secundária (IV=5,41), houve efeito significativo do sorbitol ($p=0,0001$; $p=0,0018$ respectivamente) e também do período ($p=0,0339$; $p=0,0000$ respectivamente), mas não da interação entre os dois fatores ($p=0,9835$; $p=0,7869$ respectivamente). Para o fator principal sorbitol, observou-se um desempenho semelhante aquele obtido para a sobrevivência e estabelecimento, em que há uma redução nas médias de formação de raízes primárias na presença do carboidrato (Tabela 1). Já para o período de cultivo (Tabela 2), verificou-se, inicialmente aos 30 dias, uma média de 47,65% de formação de raízes primárias, a qual a partir dos 60 dias aumentou (74,87%) e se manteve constante (Tabela 2). Já em relação à raiz secundária, a presença de sorbitol reduziu em cerca de 30% as médias (Tabela 1). No que diz respeito ao período de cultivo, a partir dos 60 dias as médias que sofreram um aumento inicial, estabilizaram-se, semelhante ao que foi observado para a raiz primária.

Tabela 1. Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de folhas, formação de raiz primária (%) e raiz secundária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹), independentemente do período de cultivo *in vitro*.

Table 1. Average of survival (%), establishment (%), number of leaves, primary (%) and secondary root formation (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the absence or presence of sorbitol (0 or 10 g L⁻¹), regardless of the *in vitro* culture period.

Sorbitol (g L ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Número de folhas	Raiz primária (%)	Raiz secundária (%)
0	100,00 a*	100,00 a	23,03 a	88,43 a	70,65 a
10	79,12 b	77,00 b	16,09 b	51,93 b	45,71 b
MÉDIA	89,56	88,50	19,56	70,18	58,18
IV**	4,35	4,37	10,46	5,73	5,41

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

Tabela 2. Médias de formação de raiz primária (%), raiz secundária (%), número de folhas e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 ou 120 dias), independentemente da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹).

Table 2. Average of root formation (%), secondary root (%), number of leaves and number of shoots in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the *in vitro* culture period (30, 60, 90 or 120 days), regardless of the absence or presence of sorbitol (0 or 10 g L⁻¹).

Período (dias)	Raiz primária (%)	Raiz secundária (%)	Número de folhas	Número de brotos
30	47,65 b	10,31 b	11,93 b	1,10 b
60	74,87 a	66,43 a	19,93 a	1,9 a
90	79,06 a	76,93 a	22,81 a	2,4 a
120	79,06 a	79,06 a	23,56 a	2,5 a
MÉDIA	70,16	58,18	19,55	1,97
IV**	5,73	5,41	10,46	7,85

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

Para a variável número de folhas (IV=10,46) houve efeito significativo do sorbitol ($p=0,0008$) e do período de cultivo ($p=0,0003$), mas não da interação entre os fatores ($p=0,3466$). Em relação ao sorbitol, o número de folhas reduziu suas médias na presença do regulador (Tabela 1; Figura 1). Já em relação ao período de cultivo, observou-se o mesmo desempenho já relatado para raiz primária e secundária, em que aos 60 dias, ocorreu um

aumento e estabilização nas médias. Por outro lado, no que tange ao número de brotos (IV=7,85), não houve efeito significativo do sorbitol ($p=0,1497$), e da interação entre o sorbitol e o período ($p=0,2725$). Para o período, houve efeito significativo ($p=0,0072$) e observou-se o mesmo desempenho registrado em relação as variáveis raiz primária, raiz secundária e número de folhas (Tabela 2).

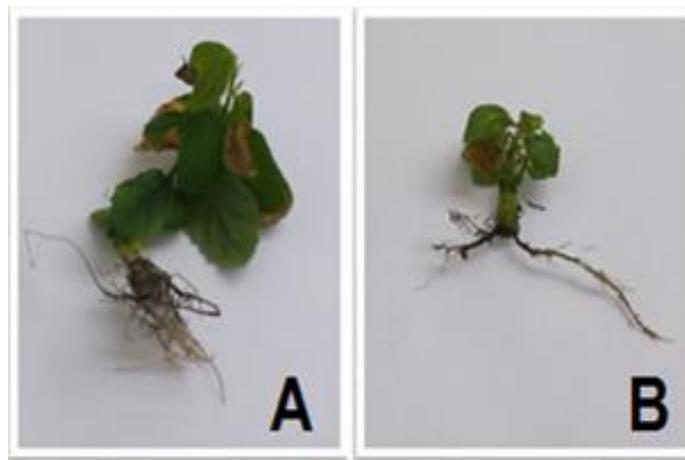


Figura 1. Representação ilustrativa das plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açaita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo MS/2 após 120 dias de cultivo *in vitro* em função da (A) ausência ou (B) presença de 10 g L^{-1} de sorbitol.

Figure 1. Illustrative representation of plants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. cultured in nutritive medium MS/2 after 120 days of *in vitro* culture depending of (A) absence or (B) presence of 10 g L^{-1} sorbitol.

Retomada de crescimento

Para a variável sobrevivência (IV= 5,98) e estabelecimento (IV= 5,96), houve efeito significativo do sorbitol na retomada de crescimento ($p=0,0000$; $p=0,0000$ respectivamente) (Tabela 3) e do período ($p=0,0002$; $p=0,0012$ respectivamente) (Tabela 4), mas não da interação entre os dois fatores principais ($p=0,4171$; $p=0,4157$ respectivamente). As médias de sobrevivência e estabelecimento ficaram em torno de 40%, uma redução de

aproximadamente 50% quando comparadas com as médias na ausência do carboidrato no meio nutritivo (Tabela 3). Em relação ao período, a sobrevivência e o estabelecimento se mantiveram estáveis até os 90 dias, ocorrendo uma redução aos 120 dias.

Em relação a raiz primária (IV=7,36) e raiz secundária (IV=6,18), não houve efeito significativo do sorbitol ($p=0,6805$; $p=0,3941$ respectivamente), dos períodos de cultivo ($p=0,8533$; $p=0,6322$ respectivamente) e tampouco da interação entre os fatores principais ($p=0,8533$; $p=0,6322$ respectivamente), com médias baixas de 19,09% de formação de raiz primária e 10,84% de raiz secundária.

Tabela 3. Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de folhas e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹), independentemente do período de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 ou 120 dias) na etapa de retomada de crescimento.

Table 3. Average of survival (%), establishment (%), number of leaves and number of shoots in plants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the absence or presence of sorbitol (0 or 10 g L⁻¹), regardless of the *in vitro* culture period (30, 60, 90 or 120 days) in the resumed growth stage.

Sorbitol (g L ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Número de folhas	Número de brotos
0	79,03 a*	77,96 a	12,21 a	1,43 a
10	41,46 b	38,31 b	5,03 b	0,71 b
MÉDIA	60,24	58,13	8,62	1,07
IV**	5,98	5,96	12,62	9,92

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV),

calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

Tabela 4. Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%) e número de brotos em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função período de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 ou 120 dias), independentemente da ausência ou presença de sorbitol (0 ou 10 g L⁻¹) na etapa de retomada de crescimento.

Table 4. Average of survival (%), establishment (%) and number of shoots in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the *in vitro* culture period (30, 60, 90 or 120 days), regardless of the absence or presence of sorbitol (0 or 10 g L⁻¹) in the resumed growth stage.

Período (dias)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Número de brotos
30	83,25 a*	74,81 a	2,06 a
60	68,50 a	68,50 a	1,50 a
90	60,18 a	60,18 a	0,65 b
120	29,06 b	29,06 b	0,12 b
MÉDIA	60,24	58,13	1,07
IV**	5,98	5,96	9,92

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

Em relação ao número de folhas (IV=12,62), houve efeito significativo apenas do sorbitol ($p=0,0000$) na retomada de crescimento (Tabela 3), mas não do período de cultivo ($p=0,8704$) e tampouco da interação entre os dois fatores ($p=0,3930$). A presença do sorbitol no meio nutritivo durante o crescimento mínimo influenciou nesta etapa de retomada de crescimento, e as médias reduziram em torno de 60% quando comparadas a ausência do regulador no meio nutritivo (Figura 2).

Para a variável número de brotos (IV=9,92) houve efeito significativo do sorbitol ($p=0,0010$) (Tabela 3) e do período de cultivo ($p=0,0000$) (Tabela 4), mas não da interação entre os dois fatores principais ($p=0,3987$). Novamente a presença de 10 g L^{-1} de sorbitol reduziu as médias de número de brotos nesta etapa de retomada de crescimento. Para o período de cultivo, até os 60 dias a formação de novos brotos apresentou bons resultados, decaindo significativamente após os 90 dias.

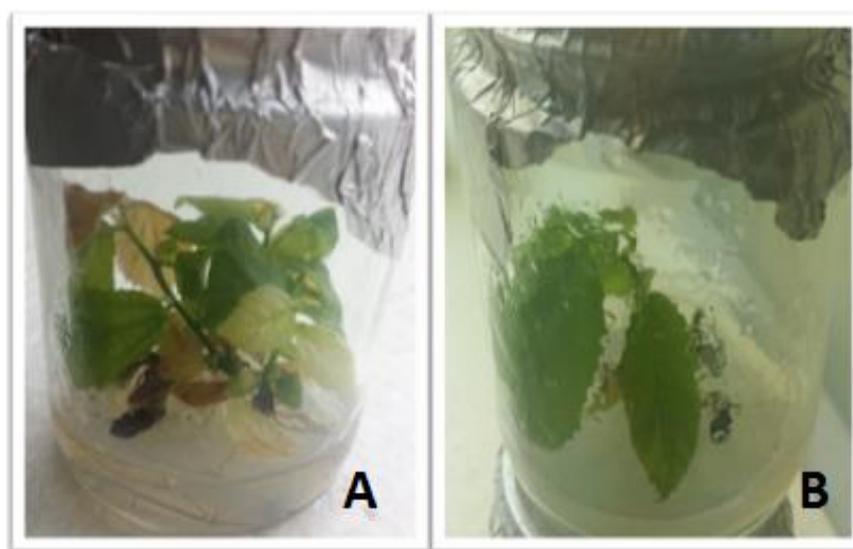


Figura 2. Representação ilustrativa das plantas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açóitacaval) cultivadas em meio nutritivo MS/2 após 120 dias de cultivo *in vitro* na retomada de crescimento, em função dos tratamentos na (A) ausência ou (B) presença de 10 g L^{-1} de sorbitol durante o crescimento mínimo.

Figure 2. Illustrative representation of plants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. cultured in nutritive medium MS/2 after 120 days of *in vitro* culture in the resumed growth stage, depending of (A) absence or (B) presence of 10 g L^{-1} sorbitol during the minimum growth.

Discussão

Crescimento mínimo

Na presença de sorbitol, observou-se redução nas médias de sobrevivência, estabelecimento, número de folhas, raiz primária e secundária (Tabela 1), resposta que é considerada positiva, uma vez que para fins de conservação *in vitro* o objetivo principal é reduzir ao máximo a formação de novos órgãos no material sujeito ao processo, procurando aumentar o intervalo entre os subcultivos (Olorode, 2004).

Em relação à sobrevivência das brotações na presença do regulador a redução observada provavelmente decorreu da remoção do excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, o que fez, também, com que o crescimento ocorresse de forma mais lenta (Dumet et al., 1993), reduzindo, simultaneamente, o seu subsequente estabelecimento e formação de folhas. Contudo, há que se destacar que, mesmo assim, a média de sobrevivência observada é adequada para a conservação *in vitro* de germoplasma, o que se constitui em uma característica importante a ser considerada no desenvolvimento de um eventual protocolo de crescimento mínimo para *Luehea divaricata* visando uma subsequente retomada de crescimento, conforme apontaram Lima-Brito et al. (2011).

Já no que diz respeito às folhas, a redução em torno de 30% nas médias na presença de sorbitol foi significativa, porém seu efeito parece ter sido menor que aquele observado em brotações de *Passiflora giberti* (maracujá-do-mato), nas quais foram obtidas apenas 2,31 unidades (Faria et al., 2006), na presença de 10 g L^{-1} do regulador. Esses resultados salientam

a importância do estudo de crescimento mínimo para cada espécie, sendo que, em alguns casos, até mesmo cada genótipo irá responder de uma maneira diferenciada.

Em relação à formação de raiz primária e secundária (Tabela 1), a presença de sorbitol promoveu uma redução proporcionalmente maior nas médias observadas, comparadas às variáveis sobrevivência e estabelecimento. Provavelmente o processo de rediferenciação dos explantes iniciais em tecidos radiculares foi mais prejudicado pela remoção do excesso de água e nutrientes dos tecidos promovido pelo regulador, o que reduziu o número de elementos disponíveis para o seu desenvolvimento, e conseqüentemente, causou este retardo no crescimento (Wilches et al., 2013).

Por outro lado, quando se considerou o período de cultivo, observou-se médias inferiores aos 30 dias para formação de raiz primária e secundária, número de folhas e número de brotos, seguida de aumento e estabilização nas médias dessas variáveis (Tabela 2). Para raiz primária e raiz secundária, apesar da rizogênese ter alcançado valores em torno de 70%, deve-se mencionar que a presença do regulador osmótico limitou a iniciação e o desenvolvimento radicular, haja vista que já ter sido demonstrada a possibilidade de obtenção de médias de cerca de 90% de rizogênese *in vitro* aos 60 dias de cultivo em plantas de *Luehea divaricata* na ausência de sorbitol (dados não publicados).

Igualmente, para as variáveis número de folhas e número de brotos, no período entre 60 e 120 dias as médias se estabilizaram em torno de 20 e 2 respectivamente (Tabela 2), o que demonstra que, a partir dos 60 dias, os explantes cultivados em condições de crescimento mínimo tiveram seu desenvolvimento limitado, mas permaneceram vivos, o que poderá possibilitar posteriormente a eventual retomada de crescimento. Já em trabalho (Faria et al., 2006) realizado com brotações de *Passiflora giberti* (maracujá-do-mato) em que foi testado o efeito do sorbitol na conservação *in vitro*, a formação de folhas aos 120 dias foi bem inferior

(apenas 3,2) à observada no presente trabalho, ratificando que as respostas podem variar em função da espécie e do genótipo.

Os resultados relatados demonstram que a presença do sorbitol a 10 g L⁻¹ propiciou uma redução no desempenho *in vitro* das culturas, podendo-se realizar sua conservação *in vitro* por um período de 120 dias (Figura 1). Esse protocolo de crescimento mínimo aparentemente reduziu o metabolismo das plantas, aumentando os intervalos de subcultivos sem afetar a sua viabilidade, além de permitir redução nos custos com a manutenção do banco ativo de germoplasma e, simultaneamente, minimizar os riscos de contaminação e perdas de acessos (Villalobos et al., 1991; Lemos et al., 2002).

Retomada de crescimento

Para a sobrevivência e estabelecimento, a presença de sorbitol nesta fase de retomada de crescimento promoveu uma redução significativa nas médias (Tabela 3), conforme era esperado, uma vez que o regulador osmótico promoveu um estresse que resultou na mortalidade de brotações, mas pode-se observar que praticamente todos os sobreviventes se estabeleceram. Já em relação ao período de cultivo, após a retomada de crescimento, somente a partir dos 120 dias (Tabela 4) observou-se um decréscimo das médias em ambas as variáveis, decorrente, provavelmente, da depleção de nutrientes do meio nutritivo que não foi renovado ao longo deste período de cultivo. Assim, a redução observada nas médias destas variáveis não está relacionada ao efeito do regulador osmótico que foi aplicado na etapa de crescimento mínimo, e sim, decorre da ausência de nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas.

Essa diminuição da sobrevivência e estabelecimento após esse longo período pode ser considerado normal, uma vez que as brotações já vieram de uma etapa de crescimento mínimo (120 dias), que contabilizado com essa etapa de retomada de crescimento somam 240 dias de

cultivo *in vitro*, em que houve apenas uma transferência para meio nutritivo fresco. Além disso, pelo fato das plantas permanecerem no mesmo meio de cultivo por 120 dias, o acúmulo de gases no interior dos frascos, como o etileno, pode ter ocasionado danos as plantas, e em alguns casos esse acúmulo pode dificultar ou impossibilitar que plantas normais sejam regeneradas na retomada de crescimento (Barrueto Cid, 2010), fato que pode ter ocorrido no presente ensaio. O etileno, mesmo em pequenas concentrações, pode ser fisiologicamente ativo e desencadear vários processos (Kerbaudy, 2004), afetando a diferenciação, desenvolvimento, morfologia e crescimento, diminuindo a expansão foliar e o comprimento dos brotos, e inibindo a regeneração de novos brotos (Erig & Schuch, 2005).

Existem poucos trabalhos na literatura sobre o comportamento das plantas na etapa de retomada de crescimento após submetidas a conservação *in vitro* via crescimento mínimo. Dentre estes, destacamos o estudo de conservação *in vitro* de segmentos nodais de *Hancornia speciosa* (mangabeira), em que, semelhante ao que ocorreu no presente trabalho, na etapa de retomada de crescimento, os explantes mantidos na ausência de sacarose ou na presença de 10 g L⁻¹ de sorbitol durante o crescimento mínimo apresentaram maior viabilidade na retomada de crescimento até os 60 dias de cultivo (Santos et al., 2011).

Em relação ao número de folhas e número de brotos (Tabela 3), no presente trabalho, a presença do sorbitol novamente reduziu as médias nesta retomada do crescimento. Isso pode decorrer do fato que algumas concentrações de reguladores osmóticos causam efeitos tóxicos nas plantas, conforme foi relatado em *Hancornia speciosa* (mangabeira) (Sá et al., 2011; Santos et al., 2011). O sorbitol geralmente não é metabolizado por tecidos vegetais, visto que, grande quantidade de espécies não possui uma via natural para a biossíntese de álcoois açúcares (Thorpe et al., 2008), e esse fato pode ter inibido o crescimento das plantas. Para o número de brotos, em particular, no que diz respeito ao período de cultivo (Tabela 4), observou-se que a redução na média foi mais precoce, ocorrendo 30 dias antes do que a

observada no estabelecimento, talvez por necessitar de recursos que aos 90 dias de cultivo já não estavam mais disponíveis.

Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, em brotações de *Pfaffia tuberosa* (corango-de-batata) conservadas em meio MS na ausência de sacarose e com 10 g L⁻¹ de sorbitol, o crescimento mínimo foi satisfatório, e as plantas continuaram a se desenvolver até 120 dias, quando se reestabeleceram as condições normais de cultivo *in vitro* (Flores et al., 2013).

A partir do conjunto de resultados obtidos no presente trabalho e em outros semelhantes aqui relatados é possível observar que os protocolos de conservação *in vitro* necessitam ser avaliados realizando-se os ajustes necessários para cada espécie e genótipos, tanto durante a etapa de crescimento mínimo, como na subsequente retomada, com a finalidade de adequar as estratégias e alcançar uma conservação máxima da diversidade genética (Keller et al., 2013). Inobstante, os resultados obtidos no presente trabalho podem subsidiar estudos adicionais sobre o crescimento mínimo e a retomada de crescimento de *Luehea divaricata*, bem como de outras espécies florestais nativas.

Conclusão

A presença de sorbitol é importante para realizar a conservação *in vitro* de *Luehea divaricata* via crescimento mínimo, o qual pode ser realizado por um período de até 120 dias. A subsequente retomada de crescimento das brotações conservadas na presença de sorbitol é limitada a 90 dias.

Referências Bibliográficas

Barrueto Cid, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

Costa, A. M.; Spehar, C. R.; Sereno, J. R. B. **Conservação de Recursos Genéticos no Brasil.**

Brasília, DF: Embrapa, 2012, 628p.

Dumet, D. et al. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, London, n. 14, p. 243-250, 1993.

Erig, A. C.; Schuch, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>

Faria, G.A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452006000200025>

Ferreira, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n 2, p 109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

Flôres, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência. Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011. <http://dx.doi.org/10.5902/198050982760>

Flores, R. et al. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.3, p.192-199, 2013.

Hwida, M.F. *In vitro* conservation of *Populus alba* and *Melaleuca ercifolia* germplasm. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 3, p.1373-1382, 2012.

Keller, E. R. J. et al. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.60, n.3, p.913-926, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9888-5>

Kerbaury, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

- Lemos, E.E.P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002001000002>
- Lima-Brito, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000800010>
- Matsumoto, K.; Cardoso, L.D.; Santos, I.R.I. **Manual de curadores de germoplasma vegetal: caracterização *in vitro***. Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2010, 11p.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nunes, E.D.C. et al. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, n. 12, p. 837 – 848, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1022492226341>
- Olorode, O. Conservation of plant genetic resources. **African Journal Traditional Complementary and Alternative medicines**, n. 1, p. 4-14, 2004.
- Pimentel-Gomes, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: Ed. Livraria Nobel S.A., 2009. 451p.
- Sá, A. de J.; Lédo, A. da S.; Lédo, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000100010>
- Santos, M.C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902011000300020>

- Silva, J.G.; Perelló, L.F.C. Conservação de espécies ameaçadas do Rio Grande do Sul através de seu uso no paisagismo. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, Piracicaba, v.5, n.4, p.01-21, 2010. <http://dx.doi.org/10.5380/revsbau.v5i4.66314>
- Stehmann, J.R. et al. **Plantas da Floresta Atlântica**. 1ª ed. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009, 516p.
- Thorpe, T. et al. **The components of plant culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems**. In: George E.F.; Hall M.A.; Klerk G.J. (eds). *Plant propagation by tissue culture*, v. 1, New York: Springer, 2008, p. 115-173.
- Villalobos, V.M. et al. The use of biotechnology in the conservation of tropical germoplasm. **Biotechnology Advances**, v.9, p.197-215, 1991. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90004-F](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90004-F)
- Watt, M.P. et al. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 161–164, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1006447506869>
- Wilches, O. E. C.; Narváez, L. C. D.; Herrera, J. D. B. Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservacion *in vitro* de *Dioscorea alata*, *d. bulbifera*, *d. rotundata* y *d. trifida* por el método de crecimiento mínimo. **Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas**, v. 25, p. 41-51, 2013.
- Withers, L. A.; Williams, J. T. **Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas**. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. p. 297-330.

5 MINIESTAQUIA

5.1 Indolebutyric acid in “pulse” treatment on the rooting of *Luehea divaricata* minicuttings

Publicado na revista *Ciência Rural*

Ciência Rural, Santa Maria, v.49:12, e2020180288, 2019

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180288>



ISSNe 1678-4596 FORESTRY SCIENCE

Indolebutyric acid in “pulse” treatment on the rooting of *Luehea divaricata* minicuttings

Karol Buuron da Silva¹ Lia Rejane Silveira Reiniger^{1*} Silvia Machado dos Santos Rabaiolli¹ Charlene Moro Stefanel¹ Leandro Dutra da Silva²

¹Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: liarsr@ufsm.br. *Corresponding author.

²Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT: *The objective of the present research was to evaluate the effect of different concentrations of indolebutyric acid (IBA) on the rooting of Luehea divaricata minicuttings under two different cultivation periods in a greenhouse environment. The minicuttings were immersed in a hydroethanolic solution containing IBA. All minicuttings survived after 30 and 60 days of cultivation. Root formation at 30 days of cultivation with 1000 mg L⁻¹ of IBA was 91.7%, the same rate as that observed with 4000 mg L⁻¹. At the 1000 mg L⁻¹ concentration, the number of roots was the greatest among all treatments, with 8.42 roots per minicutting after 30 days of cultivation. After 30 days of cultivation, the formation and number of roots with the use of 1000 mg L⁻¹ of IBA in the “pulse” treatment produced the best outcome results, allowing the plants to spend less time in a greenhouse at a reduced concentration of auxin when compared with other treatments. However, to obtain higher averages of secondary root formation, root length, and number of leaves, it is necessary to increase the cultivation period to 60 days.*

Key words: *minicutting technique, IBA, auxin, vegetative propagation.*

Ácido indolbutírico em tratamento “pulse” sobre o enraizamento de miniestacas de *Luehea divaricata*

RESUMO: *O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) em dois períodos de cultivo em casa de vegetação sobre o enraizamento de miniestacas de Luehea divaricata. As miniestacas foram imersas por 10s em solução hidroetanólica contendo AIB. Todas as miniestacas sobreviveram tanto após 30 como*

60 dias de cultivo. A formação de raízes aos 30 dias com 1000 mg L⁻¹ de AIB foi de 91,7%, mesma média observada com 4000 mg L⁻¹. Em relação ao número de raízes, novamente a concentração 1000 mg L⁻¹ destacou-se em relação às demais concentrações, e já aos 30 dias de cultivo houve 8,42 raízes por miniestaca. Aos 30 dias de cultivo, a formação e o número de raízes na presença de 1000 mg L⁻¹ de AIB em tratamento “pulse” já produz resultados satisfatórios, permitindo que as plantas permaneçam menor tempo em casa de vegetação utilizando-se uma concentração reduzida de auxina, comparativamente àquelas que foram testadas. No entanto, para obter maiores médias de formação de raízes secundárias, comprimento das raízes e número de folhas é necessário prolongar o cultivo pelo período de 60 dias.

Palavras-chave: *miniestaquia, AIB, auxina, propagação vegetativa.*

INTRODUCTION

The Atlantic Forest is one of the most biodiverse biomes in the world, with about 20,000 plant species, of which 8,000 are endemic. It is considered the richest biome in the world in tree diversity, with 454 distinct species in a single hectare. In addition, the forest regulates the flow of freshwater, ensures soil fertility, controls the climate, and preserves invaluable natural and cultural heritage. However, because approximately 70% of the Brazilian population lives in this region, it is one of the biomes that has suffered the most from environmental impacts of the country's economic cycles. Today this biome has been reduced to about 7% of its original area (BRASIL, 2015; CAMPANILI; SCHAFFER, 2010).

One native forest species of this rich and biodiverse biome is the *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., more commonly known as the “açoita-cavalo,” a member of the Malvaceae family. The natural population of *Luehea divaricata* and many other native species have drastically decreased owing to the intense exploitation of the Atlantic Forest, making it increasingly difficult to search for specimens suitable for commercial and ecological use (LORENZI, 2008). In view of this, many difficulties are encountered in obtaining viable seeds with good sanitary and phenotypic characteristics, hindering the seminal propagation and perpetuation of species. Another issue that hinders the propagation of the *Luehea divaricata* is the germination rate of collected seeds. In a germination test performed on blotting paper, the germination rate of a seed lot collected in 2010 and stored for 7 months was only 27% (DUTRA et al., 2016), which confirmed results of previous studies that reported that the seed germination of *Luehea divaricata* is very variable, ranging between 20% and 75% (LORENZI, 2008).

Thus, the minicutting technique may be away to overcome difficulties in propagating native species, especially species with seeds that are difficult to obtain and germinate, such as *Luehea divaricata*.

Minicutting consists of using plant sprouts propagated by cuttings or seeds. This method requires a smaller area to make a clonal mini garden, which facilitates ease of management in terms of irrigation, and pest and disease control, there by producing minicuttings of higher quality more quickly, with a higher rooting percentage (XAVIER et al.; 2003). One of the most common ways to induce adequate rooting in the minicuttings is via the exogenous application of growth regulators in the base, increasing the auxin content in the tissue. The most used auxin for inducing rooting in minicuttings is indolebutyric acid (IBA), because it is a photostable substance with a localized reaction, and is less sensitive to biological degradation when compared to other types of auxins. The use of appropriate IBA concentrations is of utmost importance in minicutting, and the optimal dose varies with the species (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

For these reasons, the objective of the present research was to compare the effect of different concentrations of IBA and the cultivation period on the rooting of seminal minicuttings of *Luehea divaricata*.

MATERIALS AND METHODS

The test was conducted at the Tissue Culture Laboratory of the Biotechnology and Breeding Center, Department of Crop Production, and at the Silviculture and Forest Nursery Laboratory, Department of Forest Sciences, both located at the Federal University of Santa Maria - UFSM, in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

The experimental design was set in a completely randomized 4×2 factorial array, in which the first factor consisted of different concentrations of IBA (0, 1000, 2000, or 4000 mg L⁻¹) while the second factor consisted of two periods of cultivation (30 or 60 days), totaling 8 treatments with 12 repetitions, each one using a minicutting of *Luehea divaricata*. The minicuttings prepared were approximately 7 to 10 cm in length, containing a pair of leaves cut in half, using the stem of sprouts from the ministrains of seminal origin, with approximately 3 years of development in a greenhouse. In

the time between collecting the minicuttings and placing them in the substrate, the minicuttings were kept in a thermal box that contained water to prevent dehydration.

The minicuttings were then immersed for 10s in a hydroethanolic solution (50% ethanol and 50% distilled water by volume) containing IBA concentrations that vary according to the treatment. The minicuttings were placed in plastic cups of 300 mL, filled with 250 cm³ of the commercial substrate mixture Mecplant[®] and vermiculite in a 1:1 ratio by volume. The minicuttings were placed in trays and kept in the greenhouse under controlled temperature (25 ±3°C) and humidity (RH=80%).

After 30 and 60 days, the minicuttings were evaluated for survival (%) (green-colored minicuttings), root formation (%) (primary adventitious roots originating from the minicut base), number of primary roots, average length of primary roots (cm), presence of secondary roots (%) (lateral adventitious roots of second order originating from the primary roots), callus formation at the base of the minicuttings (%), and number of leaves.

After testing for normality of the errors using the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variances using the Bartlett test, the averages were transformed where necessary by the function $\sqrt{x+0.5}$, where x is the observed value. Subsequently, they were analyzed using the analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's post hoc test with a 5% probability of error. The accuracy of the tests was measured using the variation index (IV) (PIMENTEL-GOMES, 2009). The software used was the Sisvar (System for Analysis of Variance) statistical package for Windows[®] version 5.1 (FERREIRA, 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

All minicuttings survived in both cultivation periods. Thus, there was no mortality due to the high auxin concentrations, as has been reported for other species, such as for *Sapium glandulatum*, which showed an increase in minicutting mortality with an increase in the concentration of IBA or NAA (naphthaleneacetic acid) (FERREIRA et al., 2010).

There was a significant effect of IBA application (P=0.0002), cultivation period (P=0.0000), and the interaction between the two factors (P=0.0004) on root formation (IV=3.95). There was also a significant effect of IBA application (P=0.0013) and the interaction between the cultivation period and

the IBA application ($P=0.0126$), but not of the cultivation period ($P=0.9031$) on the number of roots ($IV = 11.40$).

The root formation at 30 days of cultivation in the absence of auxin was only 25%, while with the use of 1000 mg L^{-1} and 4000 mg L^{-1} of IBA there was an increase to 91.7% (Table 1). At a concentration of 2000 mg L^{-1} of IBA, the average rhizogenesis differed significantly and was middle between these two values (Table 1).

Several factors are involved in the minicut rooting process, including the presence or absence of phytohormones such as IBA that can increase the rooting speed and uniformity (HARTMANN et al., 2002), which was observed in the present study. A rate of over 90% of rhizogenesis particularly excellent, considering that they were obtained in just 30 days of cultivation. At 60 days of cultivation, minicuttings that presented a low rate of rhizogenesis at 30 days (treatments of 0 mg L^{-1} and 2000 mg L^{-1} of auxin) showed root growth, presenting between 90 and 100% root formation. These results allowed us to infer that, even at the lowest auxin concentration, after 30 days of cultivation, it is possible to obtain rooted minicuttings of this species for use, accelerating the production of seedlings in the nursery while simultaneously reducing production time and costs. In *Ficus carica*, when comparing the effect of the absence of auxin with that of the presence of 2000 mg L^{-1} of IBA, the largest root formation (70%) occurred after 60 days of cultivation with auxin (OHLAND et al., 2009).

Table 1 - Root formation (%) and number of roots in *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. minicuttings as a function of the interaction between concentrations of Indolbutyric acid - IBA (0, 1000, 2000 or 4000 mg L^{-1}) of hydroethanolic solutions (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) where they were previously immersed for 10s, and the cultivation period (30 or 60 days). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

IBA (mg L^{-1})	-----Root formation (%)-----		-----Number of roots-----	
	30 days	60 days	30 days	60 days
0	25.00 B c	100.00 A a	2.33 A b	6.10 A a
1000	91.70 A a	100.00 A a	8.42 A a	10.58 A a
2000	58.34 B b	91.70 A a	6.34 A a	6.34 A a
4000	91.70 A a	100.00 A a	6.16 B a	11.58 A a
AVERAGE	66.68	97.92	5.81	8.65
IV**	3.95		11.40	

*Averages followed by the same lowercase letter in the columns, and uppercase in lines, do not differ significantly by the Tukey test at the 5% error probability level. ** Index of variation (IV), calculated by CV/\sqrt{N} , where IV is equal to coefficient of variation (CV) divided by the square root of the number of repetitions (N). Source: Authors (2017).

Regarding the number of roots, while the outcome for the 1000 mg L⁻¹ treatment did not differ significantly from those of 2000 mg L⁻¹ and 4000 mg L⁻¹ treatments, it stood out as despite the use of a lower concentration of auxin, and presented 8.42 roots per minicut after 30 days of cultivation (Table 1). Having a larger number of roots enhances the absorption of nutrients and accelerates the growth of clonal seedlings, and after 60 days, the effect of increasing this treatment was small and not significant (8.42 against 10.58), showing that 30 days of cultivation at 1000 mg L⁻¹ of IBA is sufficient to produce seedlings with high quality and good economic return. On the contrary, in minicuttings of *Handroanthus heptaphyllus*, the largest number of roots formed after 30 days of cultivation with the application of a much higher concentration (8000 mg L⁻¹) of IBA was 5.7, a value lower than the value observed in the present research (OLIVEIRA et al., 2016).

For root length (IV=9.24) and secondary root (IV=5.36), there was a significant effect of IBA application (P=0.0068; P=0.0153, respectively) and cultivation period (P=0.0000; P=0.0000, respectively), but not of the interaction between them (P=0.1459; P=0.5219, respectively). However, for callus formation (IV=4.61), there was a significant effect only of the IBA treatment (P=0.0001); neither the cultivation period (P=0.3834) nor the interaction between the main factors (P=0.3991) were significant.

All treatments resulted in minicuttings with satisfactory root length, as shown in Figure 1. However, the greatest average lengths (11.66 cm and 11.12 cm) were obtained from the “pulse” treatment with 1000 mg L⁻¹ and 4000 mg L⁻¹, which did not differ from each other, but from the other treatments (Table 2). Thus, as previously mentioned, the concentration of 4000 mg L⁻¹ produced significantly improved results for the number and length of the roots; however, since the lower concentration (1000 mg L⁻¹) did not yield significantly different results from those with the highest concentration, it is more economically viable to apply a smaller amount of phytohormone to the base of the minicuttings of *Luehea divaricata*. A similar result to the one obtained in the present study was observed with *Melaleuca alternifolia*, which presented an average root length of 10.47 cm with the use of a higher concentration of IBA at 2000 mg L⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2012). In the minicuttings of *Handroanthus heptaphyllus*, a shorter average root length than that observed in this study was

obtained (4.47 cm) by applying a much higher concentration (8000 mg L⁻¹) of IBA (OLIVEIRA, et al., 2016).



Figure 1 - Illustrative representation of the minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. which were subjected to "pulse" treatment for 10s in hydroethanolic solution (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) of indolebutyric acid - IBA (0; 1000; 2000 or 4000 mg L⁻¹), after 60 days. A) 0 mg L⁻¹; B) 1000 mg L⁻¹; C) 2000 mg L⁻¹ and D) 4000 mg L⁻¹. Source: Authors (2017).

For the secondary root (Table 2), the concentration of 4000 mg L⁻¹ stood out once more, as observed previously in the root formation (Table 1), but it did not differ from the averages obtained with 1000 and 2000 mg L⁻¹, and those did not differ from the ones with the absence of auxin. However, considering the outcome of the treatments discussed so far, the use of 1000 mg L⁻¹ still presents as the most efficient and effective treatment.

Callus formation (Table 2) increased with the use of most concentrations of IBA, and also in the absence of auxin. Potentially, callus formation occurred with the presence of the phytohormone owing to a hormonal balance that was established in the tissue, with the endogenous levels of the hormones in contact with the exogenous auxin application. In the absence of IBA, the callus formation may have occurred due to the mechanical injury at the base of the minicut. The mechanical injury caused by the minicut collection does not affect mortality or rooting, but may induce callus formation (LIMA et al., 2013). Calluses are unorganized and irregularly differentiated cell masses; so, their presence at the base of the minicuttings can negatively affect the rooting (SCHMILDT et al., 2010).

However, the observed callogenesis did not compromise the development of primary and secondary roots in minicuttings of *Luehea divaricata*. In *Sapium glandulatum*, for example, the callus formation was considered to impair the induction of adventitious roots. The authors reports that the rooting of the minicuttings was high because of the low callus formation rates (below 5%), independent of the season in which the minicuttings were collected and the application of up to 8000 mg L⁻¹ of IBA (FERREIRA et al., 2010).

Table 2 - Average root length (cm), presence of secondary roots (%) and presence of callus (%) in minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. as a function of concentrations of Indolbutiric acid - IBA (0, 1000, 2000 or 4000 mg L⁻¹) of hydroethanolic solutions (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) in which they were previously immersed for 10s regardless of the cultivation period (30 or 60 days). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

IBA (mg L ⁻¹)	Root length (cm)	Secondary roots (%)	Callus (%)
0	7.71 b [*]	37.50 b	95.83 a
1000	11.66 a	62.50 ab	95.83 a
2000	7.96 b	45.83 ab	54.10 b
4000	11.12 a	66.67 a	83.34 a
AVERAGE	9.61	53.12	82.27
IV ^{**}	9.24	5.36	4.61

*Averages followed by the same letter in the columns do not differ significantly by the Tukey test at the 5% error probability level. ** Index of variation (IV), calculated by CV/\sqrt{N} , where IV is equal to coefficient of variation (CV) divided by the square root of the number of repetitions (N). Source: Authors (2017).

The cultivation period of 60 days in a greenhouse is necessary for proper root and leaf development (Table 3). However, as noted earlier, minicuttings treated with 1000 mg L⁻¹ of IBA at 30 days of cultivation already had higher root formation and number of roots than did treatments involving no auxin (Table 1). Cultivation for an additional 30 days led to higher root length, higher percentage of secondary roots and number of leaves (Table 3; Figure 1). For the number of leaves (IV=12.17), whose results have not yet been presented in this paper, it was observed that there was an effect only from the cultivation period (P=0.0000), and not from IBA application (P=0.1156), nor from the interaction between these two factors (P=0.2102).

Table 3 – Averages of root length (cm), presence of secondary roots (%) and number of leaves in minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the cultivation period (30 or 60 days), regardless of the concentration of the hydroethanolic solution (50% ethanol, 50% distilled water, v/v) of Indolbutyric acid - IBA (0, 1000, 2000 or 4000 mg L⁻¹), in which they were previously immersed for 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Period (days)	Root length (cm)	Secondary roots (%)	Number of leaves
30	4.40 b	18.75 b	0.21 b
60	14.80 a	87.50 a	3.50 a
AVERAGE	9.60	53.1	1.8
IV**	9.24	5.36	12.17

*Averages followed by the same letter in the columns do not differ significantly by the Tukey test at the 5% error probability level. ** Index of variation (IV), calculated by CV/√N, where IV is equal to coefficient of variation (CV) divided by the square root of the number of repetitions (N). Source: Authors (2017).

CONCLUSION

Application of 1000 mg L⁻¹ of IBA in “pulse” treatment and a cultivation period of 30 days may promote rapid propagation of *Luehea divaricata* and has already yielded satisfactory results regarding root formation and number of roots produced. However, in order to obtain higher averages of secondary root formation, root length, and number of leaves, it is necessary to prolong the cultivation to a period of 60 days.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Brazilian National Research Council (CNPq - 312499/2018-3) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES – 88882.427782/2019-01).

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study, nor in the data collection, analyses, or interpretation of data, the writing of the manuscript, nor the decision to publish the results.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

REFERENCES

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. **Enraizamento de plantas lenhosas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. v. 1. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa – SNPH, 1998. p. 262-297.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Mapa de Vegetação Nativa na Área de Aplicação da Lei no. 11.428/2006 – Lei da Mata Atlântica (ano base 2009)**. FUNCATE. Brasília, DF. 2015. 84 p.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata Atlântica: manual de adequação ambiental**. Brasília: MMA/SBF, 2010. 96 p.

DUTRA, A. F.; ARAUJO, M. M.; RORATO, D.; MIETH, P. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc. em diferentes substratos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 411-418, 2016. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/cflo/v26n2/0103-9954-cflo-26-02-00411.pdf>> Accessed: 22/12/2018. doi: 10.5902/1980509822744.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n 2, p 109-112, 2014. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v38n2/a01v38n2.pdf>> Accessed: 22/08/2017. doi: 10.1590/S1413-70542014000200001.

FERREIRA, M. E. et al. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (vell.) pax com o uso de Ácido Indol Butírico e Ácido Naftaleno Acético. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010. Available from: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1758>> Accessed: 22/08/2017. doi: 10.5902/198050981758.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

LIMA J. D.; BOLFARINI A. C. B.; MODENESE-GORLA DA SILVA S. H.; MORAES W. S. Propagação de *Camellia sinensis*: efeito do genótipo, estaca, substrato, recipiente e ácido indolbutírico. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 74-79, 2013. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v31n1/v31n1a12.pdf>> Accessed: 23/12/2018. doi: 10.1590/S0102-05362013000100012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1**. Nova Odessa: Plantarum. 2008. 384p.

OHLAND, T. et al. Enraizamento de estacas apicais de figueira ‘Roxo de Valinhos’ em função de época de coleta e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 74-78, 2009. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542009000100010> Accessed: 02/09/2017. doi: 10.1590/S1413-70542009000100010

OLIVEIRA, Y. et al. Substratos, concentrações de ácido indolbutírico e tipos de miniestacas no enraizamento de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 611-616, 2012. Available from:

<<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v14n4/06.pdf>> Accessed: 05/09/2017. doi: 10.1590/S1516-05722012000400006.

OLIVEIRA, T. P. F.; et al. Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* Mattos. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 313-320, 2016. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/cflo/v26n1/0103-9954-cflo-26-01-00313.pdf> Accessed: 05/09/2017. doi: 10.5902/1980509821128.

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

SCHMILDT, E. R. et al. Níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/asagr/v32n1/v32n1a18>> Accessed: 09/07/2018. doi: 10.4025/actasciagron.v32i1.866.

XAVIER, A. et al. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, v.27, n.2, p.139-143, 2003. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v27n2/15932.pdf>> Accessed: 20/09/2017. doi: 10.1590/S0100-67622003000200003.

Received 04.07.2018
Approved 09.06.19
Returned by the author 10.28.19
CR-2018-0288.R3

5.2 Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. nas diferentes estações do ano

Publicado na revista Scientia Forestalis



Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. nas diferentes estações do ano

Productivity of minicepas and rooting of minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. in the different seasons of the year

Karol Buuron da Silva^{1*}, Lia Rejane Silveira Reiniger¹, Silvia Machado dos Santos Rabaiolli¹, Charlene Moro Stefanel¹ e Ana Cristina da Fonseca Ziegler¹

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil.

* Autor correspondente: karolbuuron@hotmail.com

Sci. For., Piracicaba, v. 47, n. 122, p. 294-302, jun. 2019

DOI: doi.org/10.18671/scifor.v47n122.12

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi analisar a produtividade das minicepas e o enraizamento de miniestacas de *Luehea divaricata* nas estações do ano. O primeiro ensaio avaliou a produtividade do minijardim, em que os tratamentos consistiram de oito coletas de miniestacas. O segundo ensaio avaliou as coletas de miniestacas nas diferentes estações do ano, o período de cultivo em cada uma delas e sua interação. A produtividade foi maior principalmente em duas coletas realizadas no verão e uma na primavera, que resultaram em mais de cinco miniestacas por minicepa em cada coleta; a primeira coleta realizada no verão e as duas primeiras da primavera apresentaram médias inferiores, porém todas superiores às maiores médias do inverno e do outono. A média de formação de raízes, aos 30 dias, foi de 95%, e aos 60 dias, de 100%. O maior número de raízes foi observado no verão, com média de 11,47 raízes por miniestaca. Em relação ao comprimento de raízes, número de raízes secundárias e folhas, houve maior desenvolvimento no verão e na primavera, principalmente aos 60 dias. A produtividade das minicepas foi superior no verão e essa estação também produz mudas mais desenvolvidas de *Luehea divaricata* por miniestaquia. Contudo, o processo de miniestaquia, nas condições avaliadas, pode ter continuidade ao longo do ano, com coletas também no outono, no inverno e na primavera. A miniestaquia é uma alternativa eficiente para a propagação vegetativa da espécie, obtendo-se, aos 60 dias de cultivo, mudas com maior desenvolvimento.

Palavras-chave: propagação vegetativa; miniestaquia; espécie florestal nativa; açoita-cavalo.

Abstract

The objective of this work was analyze the productivity of the minicepas and the rooting of minicuttings from seminal origin of *Luehea divaricata* in seasons. The first test evaluated the productivity of the minijardim, in which the treatments consisted of eight minicuttings collections. In the second test were evaluated the collections in seasons, the period of cultivation in each season and its interaction. The productivity was higher in two collections in the summer and one in the spring, which resulted in more than five minicuttings by minicepa in each collection; the first collection in the summer and the first two in the spring presented lower averages, but all higher than the highest winter and autumn averages. For root formation, at 30 days, the mean was 95% and at 60 days at 100%. The highest number of roots was observed in the summer, with 11.47 roots by minicut. In relation to the length of roots, numer of secondary roots and leaves, there was more development in summer and spring, mainly at 60 days. The productivity of the minicepas is higher in the summer and this season also produces more developed seedlings of *Luehea divaricata* by minicutting technique. However, the minicutting technique, under the conditions evaluated, may continue throughout the year, with collections also in autumn, winter and spring. Minicutting technique is an efficient alternative for the propagation of the species, obtaining, at 60 days of cultivation, seedlings with greater development.

Keywords: vegetative propagation; minicutting technique; native forest species.

INTRODUÇÃO

Os usos e as potencialidades da floresta nativa têm sido cada vez mais estudados nos programas de melhoramento, visando utilizar espécies bem adaptadas ao ambiente e produzir mudas de alta qualidade para formação de plantios comerciais e para repor os recursos perdidos. *Luehea divaricata* é uma espécie florestal nativa dos biomas Pampa e Mata Atlântica, conhecida popularmente como açoita-cavalo. A espécie pode atingir de 5 a 25m de altura e um diâmetro de 50 a 60 cm à altura do peito, com tronco geralmente tortuoso e nodoso de base alargada. Apresenta madeira moderadamente pesada, de cor clara, de boa trabalhabilidade e de acabamento delicado (CARVALHO, 2008; LORENZI, 2008). Sua madeira é empregada para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, coronhas de armas, caixotaria, cadeiras, entre outros usos, por ser uma madeira muito utilizada em técnicas de vergamento e de boa permeabilidade ao tratamento preservativo (REITZ et al., 1988).

Por muitas décadas a exploração de *Luehea divaricata* tem apresentado caráter predatório, reduzindo drasticamente os exemplares com características adequadas ao uso comercial e ecológico, e a busca por alternativas para reduzir esse extrativismo é essencial para garantir a conservação e a perpetuação da espécie (PACHECO; FRANCO, 2008). Sendo assim, o emprego da propagação vegetativa em espécies florestais, associada a programas de melhoramento, tem como propósito acelerar o crescimento, aumentar a produtividade e gerar produtos madeireiros de qualidade (ALFENAS et al., 2009), instalando povoamentos comerciais que irão suprir as demandas madeireiras destas espécies nativas, sem a necessidade de explorar os remanescentes florestais.

Com isso, a estaquia é um dos métodos de propagação vegetativa mais acessível e amplamente empregado para plantios de espécies de alto valor comercial e podendo também ser viável para propagar espécies nativas (DIAS et al., 2012). Na estaquia, o principal aspecto determinante do sucesso da propagação é a indução do enraizamento adventício das estacas, que, quando submetidas a condições favoráveis, originam uma nova planta completa (HARTMANN et al., 2011; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Entretanto, a estaquia não é uma técnica economicamente viável para todas as espécies, pois algumas apresentam dificuldades na obtenção de material vegetativo com grau de juvenilidade e vigor fisiológico adequados ao enraizamento de estacas. Em *Luehea divaricata*, por exemplo, a estaquia com material lenhoso de 20 cm e aplicação de 5.000 mg L⁻¹ de AIB em tratamento “pulse” teve apenas 24,9% de enraizamento aos 90 dias de cultivo (PACHECO; FRANCO, 2008). Por este motivo, outras técnicas, como a miniestaquia, em particular, foram desenvolvidas, visando à otimização do enraizamento (ALFENAS et al., 2009; BRONDANI et al., 2008).

Os resultados obtidos com a miniestaquia têm apontado diversas vantagens em relação à estaquia convencional na produção de mudas, como a redução da área necessária para a formação do minijardim clonal, a redução dos custos de transporte e coleta das brotações, a maior eficiência das atividades de manejo no minijardim clonal quanto à irrigação, nutrição e controle de pragas e doenças, além de proporcionar maior qualidade, velocidade e percentual de enraizamento dos propágulos (DIAS et al., 2012; XAVIER;

WENDLING; SILVA, 2013). Em espécies florestais, a miniestaquia vem sendo muito utilizada com o eucalipto (ALMEIDA et al., 2007), *Prunus salicina* (ameixeira) (TONIETTO et al., 2001) e, também, com espécies nativas brasileiras, como *Cedrela fissilis* (cedro-rosa) (XAVIER et al., 2003), *Erythrina falcata* (corticeira-do-mato) (WENDLING; FERRARI; DUTRA, 2005), *Ilex paraguariensis* (erva-mate) (WENDLING; DUTRA, 2008), entre outras.

Para o sucesso da técnica, alguns aspectos importantes devem ser considerados, como o número de miniestacas obtidas por minicepa, a eficiência do seu enraizamento, que varia em função da espécie/clone, o sistema de manejo do minijardim, e a época de coleta das miniestacas, considerando-se as condições ambientais e o vigor fisiológico das minicepas (HARTMANN et al., 2002). A produtividade das miniestacas por minicepa, em particular, varia de acordo com a espécie e também em relação à época de coleta, uma vez que o clima pode interferir no desenvolvimento do material vegetativo. No que diz respeito ao enraizamento, uma das formas mais comuns de favorecê-lo é a aplicação exógena de auxinas em sua base, elevando-se seu teor no tecido. Nesse sentido, a auxina mais utilizada é o ácido indolbutírico (AIB), por se tratar de uma substância fotoestável, de ação localizada e menos sensível à degradação biológica, em comparação às demais auxinas sintéticas (FACHINELLO et al., 1995). Por fim, cabe também ressaltar que a sobrevivência das minicepas ao longo das sucessivas coletas de brotações garantirá a viabilidade do sistema para a contínua obtenção de propágulos (WENDLING; FERRARI; DUTRA, 2005).

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a produtividade das minicepas e o enraizamento de miniestacas de *Luehea divaricata* nas coletas realizadas em quatro estações do ano, bem como o período necessário para produzir mudas bem desenvolvidas por miniestaquia.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, e no Laboratório de Silvicultura e Viveiro Florestal do Departamento de Ciências Florestais, ambos localizados na Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, em Santa Maria, RS.

Produtividade do minijardim clonal de *Luehea divaricata*

Este ensaio foi implantado a partir de coletas realizadas em um minijardim clonal instalado a partir de sementes em 26/09/2016. As sementes foram provenientes de uma coleta realizada em agosto de 2012, na microrregião de Ijuí, RS, as quais estavam armazenadas em sacos de papel “kraft” pelo período de quatro anos em refrigerador (8-10 °C). O minijardim clonal foi constituído por 14 vasos com três sementes em cada, totalizando 42 minicepas.

Após cerca de 70 dias da semeadura foi realizada uma poda, sendo que cada minicepa ficou com, aproximadamente, 10 cm e três pares de folhas. Na sequência, iniciaram-se as coletas das miniestacas nas estações do verão, outono, inverno e primavera de 2017. Os vasos contendo as minicepas, com capacidade para 5 L, foram preenchidos com substrato Mecplant[®] e mantidos em casa de vegetação não climatizada. A adubação começou a ser realizada após 70 dias da semeadura, com NPK (5-20-20) semanalmente (1,5 g L⁻¹) e com ureia quinzenalmente (1,0 g L⁻¹), e diariamente as minicepas receberam irrigações para manter o seu turgor hídrico.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema unifatorial, em que os tratamentos consistiram das 11 coletas de miniestacas realizadas nas quatro estações do ano, no período de 05/01/2017 a 06/12/2017. Essas coletas foram efetuadas de acordo com o crescimento das brotações, sendo realizadas de forma sucessiva, somente quando apresentavam altura suficiente para o corte, ou seja, de 7 a 10 cm. Os vasos contendo as minicepas foram numerados e o controle de produtividade foi considerado a cada coleta, sendo registrado o número de miniestacas coletadas por minicepa em cada vaso.

Enraizamento das miniestacas de *Luehea divaricata* nas quatro estações do ano

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4 x 2, em que o primeiro fator consistiu das coletas de miniestacas nas quatro estações do ano (utilizando-se as miniestacas da primeira coleta de cada estação, do experimento anterior), enquanto o segundo fator, pelo período de cultivo em cada estação (30 ou 60 dias), totalizando oito tratamentos, com 20 repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma miniestaca acondicionada em um copo plástico transparente, perfurado no fundo, com capacidade para 300 mL, previamente preenchido com 250 cm³ da mistura composta por substrato comercial Mecplant[®] e vermiculita, na proporção 1:1 (v/v).

As miniestacas de, aproximadamente, 7 a 10 cm e um par de folhas cortadas ao meio, foram preparadas tomando-se a parte caulinar de brotações de minicepas em desenvolvimento em casa de vegetação. Durante o momento da coleta, as miniestacas foram acondicionadas em caixa de isopor contendo água para evitar a perda de umidade.

Em seguida, as miniestacas foram imersas por 10 s em solução hidroalcoólica (50% etanol e 50% de água destilada, v/v) contendo 1.000 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) (tratamento “pulse”) e, imediatamente após, colocadas para enraizar em copos plásticos. Essa concentração foi considerada a mais eficiente em ensaio piloto de enraizamento de miniestacas de origem seminal (dados não apresentados), no qual foram testadas 0, 1.000, 2.000 e 4.000 mg L⁻¹ de AIB em tratamento “pulse”.

Os copos plásticos contendo as miniestacas foram alocados aleatoriamente em bandejas plásticas com dimensões de 20 x 40 x 60 cm, devidamente identificadas, e levados para casa de vegetação com nebulização e temperatura controladas (UR 80% e 25 °C). Decorridos 30 e 60 dias, as miniestacas foram avaliadas quanto à sobrevivência (%) (miniestacas com coloração verde), número de folhas, formação de raízes (%) (raízes adventícias primárias originadas da base da miniestaca), comprimento médio de raízes primárias (cm), presença de raízes secundárias (%) (raízes adventícias laterais de segunda ordem originadas a partir das primárias) e formação de calos na base das miniestacas (%).

Análises estatísticas

Após testar a normalidade do residuo por meio do teste de Kolmogorov- Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as médias foram transformadas, sempre que necessário, pela função $x\sqrt{+0,5}$ sendo x o valor observado. A seguir, foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ou Scott-Knott ao nível de 95% de probabilidade. A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por 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). Empregou-se o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 5.1 (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produtividade do minijardim clonal de *Luehea divaricata*

Para a produtividade do minijardim clonal, houve efeito significativo das 11 coletas realizadas nas diferentes estações do ano (p = 0,0000; IV = 4,05), ao longo de 12 meses, correspondendo, em média, a uma coleta a cada 30 dias. Contudo, ressalta-se que, no outono e no inverno, em virtude do menor desenvolvimento das minicepas, o período entre as coletas foi aumentado em 12 e 19 dias, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Produtividade (nº médio de miniestacas coletadas por minicepa) de minicepas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) mantidas em casa de vegetação, em função das diferentes datas de coletas, estação do ano e intervalo entre as coletas. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Table 1 - Productivity (means number of minicuttings collected by minicepa) from minicepas of *Luehea divaricata* kept in greenhouse, depending on the different dates of collection, season of the year and interval between collections. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Coleta	Data	Estação do ano	Dias entre coletas	Produtividade de (nº miniestaca/minicepa)
1	05/01/2017	Verão	29	3,80 b*
2	02/02/2017	Verão	28	5,45 a
3	02/03/2017	Verão	28	5,35 a
4	03/04/2017	Outono	32	2,50 c
5	15/05/2017	Outono	42	2,47 c
6	03/07/2017	Inverno	49	0,85 d
7	07/08/2017	Inverno	35	2,09 c
8	15/09/2017	Inverno	39	2,47 c
9	09/10/2017	Primavera	24	2,28 c

10	08/11/2017	Primavera	30	3,97 b
11	06/12/2017	Primavera	28	5,64 a
MÉDIA				3,35
IV**				4,05

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 95% de probabilidade.

**Índice de variação (IV).

As minicepas não apresentaram mortalidades no decorrer do experimento, o que indica que o manejo do minijardim clonal foi conduzido de maneira eficiente, mesmo ocorrendo em ambiente sem controle de temperatura e de umidade. O manejo do minijardim clonal é muito importante para a sobrevivência das minicepas fornecedoras de propágulos vegetativos, e constitui um dos principais fatores que afetam a propagação vegetativa (HARTMANN et al, 2011).

A produtividade foi maior principalmente em duas coletas realizadas no verão e em uma na primavera, que resultaram em mais de cinco miniestacas por minicepa em cada coleta; a primeira coleta realizada no verão e as duas primeiras da primavera apresentaram médias inferiores, porém todas superiores às maiores médias do inverno e do outono (Tabela 1). As coletas realizadas no verão e na primavera ocorreram em intervalos de, aproximadamente, 30 dias (Tabela 1), o que demonstra a potencialidade dessas duas estações para a produção de mudas por meio da miniestaquia em *Luehea divaricata*.

No outono e no inverno, a produtividade ficou em torno de duas miniestacas por minicepa, exceto naquela que correspondeu ao início do inverno, quando foram registradas temperaturas baixas (em torno de 8 °C), mas, na sequência, ocorreram temperaturas amenas, com um inverno que não foi muito rigoroso, apresentando médias em torno de 14 °C (INMET, 2017). Isso ratifica a afirmação de que o aumento na produção de miniestacas, em determinado período, possivelmente está associado à elevação na temperatura, a qual proporciona condições fisiológicas mais favoráveis ao crescimento e desenvolvimento das brotações (FERRIANI et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Por sua vez, as temperaturas mais baixas podem diminuir a produção de propágulos vegetativos em algumas espécies tropicais (ROSA, 2006), e a diferença na produtividade das minicepas pode estar relacionada à sazonalidade, como foi igualmente verificado no presente trabalho. Da mesma maneira, em *Paulownia fortunei* (quiri), com a diminuição das temperaturas médias (outono e inverno), Stuepp et al. (2015) relataram que houve uma tendência à diminuição na produção de miniestacas por minicepa, ocorrendo uma maior produção no verão e na primavera.

O número de miniestacas produzidas por minicepa indica que há potencial de rebrota na propagação por miniestaquia de *Luehea divaricata* (Tabela 1), considerando que essa capacidade é essencial para o estabelecimento do minijardim e para viabilizar a produção de mudas por miniestaquia (ALTOË et al., 2011).

Comparando-se o número de miniestacas produzidas por minicepa no presente estudo com *Luehea divaricata*, com aqueles registrados para outras espécies, pode-se afirmar que a média obtida foi elevada. Em *Piptocarpha angustifolia* (vassourão-branco) foram obtidas médias de 1,1 a 3,2 brotações por minicepas ao longo de 13 coletas, em sistema semi-hidropônico em casa de vegetação com condições controladas (25 °C; UR = 80%) (FERRIANI et al., 2011). Ferreira et al. (2010) verificaram, em *Sapium glandulatum* (leiteiro), 1,4 a 2,2 miniestacas por minicepa em sistema de tubetes, em casa de vegetação climatizada (20 a 30 °C; UR = 80%).

Em relação à quantidade de coletas que foram realizadas nas quatro estações avaliadas, os resultados também foram muito promissores, uma vez que após onze coletas

sucessivas a produtividade se manteve satisfatória, com uma média de 3,35 miniestacas por minicepa. Resultado inferior foi obtido com *Handroanthus heptaphyllus* (ipê-roxo), em que a produtividade média foi de 1,98 miniestacas produzidas por minicepa após oito coletas sucessivas em casa de vegetação não climatizada (OLIVEIRA et al., 2015). Da mesma maneira, em *Eugenia uniflora* (pitangueira), a produtividade média foi de 2,5 miniestacas por minicepa, após oito coletas ao longo de 12 meses, com temperaturas variando entre 14 e 20 °C em casa de vegetação não climatizada (PEÑA et al., 2015).

Enraizamento das miniestacas de *Luehea divaricata* nas quatro estações do ano

A sobrevivência das miniestacas não foi afetada em relação às estações do ano, nem pelo período de cultivo, atingindo média de 100%, o que é muito positivo para a propagação da espécie durante todo o ano.

Quanto a formação de raízes (IV = 1,01), houve efeito significativo apenas do período de cultivo ($p = 0,0416$), não da estação do ano ($p = 0,2428$) e tampouco da interação entre eles ($p = 0,2428$). Aos 30 dias, a média foi de 95% e aos 60 dias de 100%. Esses valores são muito satisfatórios, mesmo aos 30 dias, sugerindo que é possível acelerar o processo de produção de mudas (Figura 1). Em *Peltophorum dubium* (canafistula) (CURTI, 2014), *Paulownia fortunei* (quiri) (STUEPP et al., 2015) e *Psidium guajava* (goiabeira) (ALTOÉ et al., 2011), o período de 60 dias de cultivo foi o que favoreceu a formação de um sistema radicular mais desenvolvido.

Avaliando o número de raízes (IV = 3,53) e formação de calos (IV = 2,63), constata-se que houve efeito significativo apenas das estações do ano ($p = 0,0000$; $p = 0,0007$, respectivamente), mas não do período de cultivo ($p = 0,6042$; $p = 0,7477$, respectivamente) e nem da interação entre os dois fatores ($p = 0,0784$; $p = 0,9584$, respectivamente). O maior número de raízes foi observado no verão, com 11,47 raízes por miniestaca (Tabela 2), mas nas demais estações, que não diferiram entre si, as médias também são satisfatórias. Em função do maior crescimento vegetativo no verão, Hartmann et al. (2002) afirma que estacas coletadas nesta época tendem a ter maior facilidade de enraizamento, fato que ocorreu no presente trabalho. Já em *Sapium glandulatum* (leiteiro) o maior número de raízes foi observado no inverno (6,06), sem a adição de fitorreguladores nas miniestacas que permaneceram em casa de vegetação com nebulização (FERREIRA et al., 2010). Da mesma maneira em *Pinus taeda* (pinus), o maior número de raízes foi observado no inverno (7,4) e também na ausência de fitorreguladores (ALCANTARA et al., 2007).

Silva et al. – Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. nas diferentes estações do ano

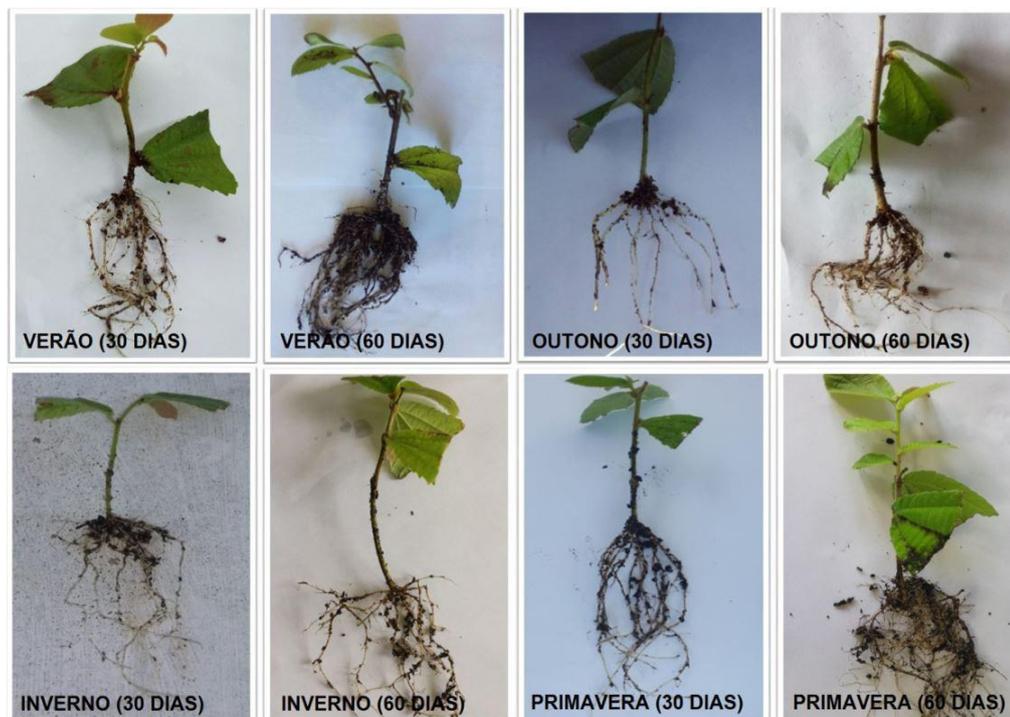


Figura 1 - Representação ilustrativa das miniestacas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função da estação do ano em que foram avaliadas (verão, outono, inverno ou primavera) e do período de avaliação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Figure 1 - Illustrative representation of the minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the season of the year in which they were evaluated (summer, autumn, winter or spring) and the evaluation period (30 or 60 days). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Tabela 2 – Médias de número de raízes e formação de calos (%) em miniestacas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função da estação do ano em que foram avaliadas (verão, outono, inverno ou primavera), independentemente do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Table 2 - Mean number of roots and callus formation (%) in minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., depending on the season of the year in which they were evaluated (summer, autumn, winter or spring), independently of the cultivation period (30 or 60 days). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Estação do ano	Número de raízes	Calos (%)
Verão	11,47 a*	7,5 ab
Outono	8,15 b	20,0 b
Inverno	7,92 b	0,0 a
Primavera	6,67 b	0,0 a
MÉDIA	8,55	6,87

IV**	3,53	2,63
------	------	------

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade.
 ** Índice de variação (IV).

A formação de calos (Tabela 2) foi de baixa (7,5%) a moderada (20%) nas miniestacas, sendo superior no outono. Os calos, por serem massas de células não-organizadas e irregularmente diferenciados, podem afetar negativamente o enraizamento na base das miniestacas (SCHMILDT et al., 2010). Contudo, no presente trabalho, a formação de calos não comprometeu a rizogênese de *Luehea divaricata*. De maneira similar, em miniestacas de *Sapium glandulatum* (leiteiro) foram observadas baixas porcentagens de formação de calos (inferiores a 5%), porém independentemente da estação do ano em que foram coletadas, mesmo na presença de até 8.000 mgL⁻¹ de AIB ou ANA (FERREIRA et al., 2010).

Em relação ao comprimento de raízes (IV = 2,78), formação de raízes secundárias (IV = 1,52) e número de folhas (IV = 4,91), houve efeito significativo das estações do ano (p = 0,0000; p = 0,0041; p = 0,0000, respectivamente), do período de cultivo (p = 0,0000; p = 0,0030; p = 0,0000, respectivamente) e da interação entre eles (p = 0,0194; p = 0,0282 e p = 0,0000, respectivamente). Em todas estas variáveis houve maior desenvolvimento no verão e na primavera, principalmente aos 60 dias após o estaqueamento, demonstrando que essas estações do ano são as mais adequadas para produzir mudas de *Luehea divaricata* por miniestaquia. Possivelmente as altas temperaturas, médias entre 22 e 25 °C (INMET, 2017), favoreceram o crescimento e o desenvolvimento das plantas, ressaltando que a temperatura possui função regulatória no metabolismo das plantas e afeta o enraizamento, uma vez que a divisão celular é favorecida com o aumento na temperatura e, conseqüentemente, auxilia na formação de raízes (HARTMANN et al., 2002).

Para o comprimento de raízes, o maior comprimento (Tabela 3) ocorreu no verão aos 60 dias de cultivo (Figura 1), porém é possível observar que mesmo aos 30 dias, até mesmo no outono e no inverno, em que foram registradas as menores médias (9,45 cm e 7,42 cm respectivamente), os valores apresentam-se adequados para produzir mudas aparentemente saudáveis e bem desenvolvidas. A redução nas médias observadas no outono e no inverno pode ser atribuída à diminuição na atividade metabólica, decorrente do período de crescimento vegetativo intenso nas estações anteriores.

Tabela 3 – Comprimento médio de raízes (cm), raízes secundárias (%) e número de folhas em miniestacas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), em função da interação entre o período de cultivo (30 ou 60 dias) e a estação do ano em que foram avaliadas (verão, outono, inverno ou primavera). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Table 3 – Length means of roots (cm), secondary roots (%) and number of leaves in minicuttings of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., depending on the interaction between the cultivation period (30 or 60 days) and the season of the year in which they were evaluated (summer, fall, winter or spring). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Estação do ano	Comprimento de raízes (cm)		Média
	30 dias	60 dias	

Verão	16,45 B a*	29,95 A a	23,20
Outono	9,45 B bc	18,60 A c	14,02
Inverno	7,42 B c	13,82 A d	10,62
Primavera	13,35 B ab	24,90 A b	19,12
MÉDIA	11,66	21,81	
IV**		2,78	
Raiz secundária (%)			
Estação do ano	30 dias	60 dias	Média
Verão	100,00 A a	100,00 A a	100,00
Outono	75,00 B b	100,00 A a	87,50
Inverno	75,00 B b	95,00 A a	85,00
Primavera	100,00 A a	100,00 A a	100,00
MÉDIA	87,50	98,75	
IV**		1,52	
Número de folhas			
Estação do ano	30 dias	60 dias	Média
Verão	3,80 A a	4,00 A b	3,90
Outono	0,10 A b	0,65 A c	0,37
Inverno	0,45 B b	1,55 A c	1,00
Primavera	0,90 B b	7,15 A a	4,02
MÉDIA	1,31	3,33	
IV**		4,91	

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade. **Índice de variação (IV).

De maneira similar, em *Psidium guajava* (goiabeira), o maior comprimento das raízes (8,0 cm), após 62 dias em casa de vegetação com nebulização, também ocorreu no verão (ALTOË et al., 2011). Em miniestacas de *Pinus taeda* (pinus), avaliadas nas quatro estações do ano, o comprimento das raízes em miniestacas coletadas no outono foi inferior (1,05 cm) ao daquelas obtidas nas demais estações do ano (variando de 3 a 8 cm) (ALCANTARA et al., 2007).

Em relação à formação de raízes secundárias, as médias são elevadas e variaram entre 95% e 100% aos 60 dias de cultivo, nas quatro estações do ano (Tabela 3). Esses resultados são muito positivos, pois a presença de raízes secundárias é de extrema importância para o desenvolvimento das mudas, uma vez que são responsáveis pela absorção de água e de nutrientes (SILVA et al., 2012).

A formação de folhas na primavera, aos 60 dias, foi bem superior àquela observada nas demais estações (Tabela 3), sendo seguida pelo número de folhas formadas no verão; no outono e no inverno o número de folhas novas foi reduzido. A presença de folhas nas miniestacas é importante para o desenvolvimento da muda e para o processo de enraizamento, que é decorrente da produção e translocação de substâncias, como carboidratos, durante a fotossíntese, bem como à síntese de auxinas responsáveis pela rizogênese, o que pode aumentar sua sobrevivência e a probabilidade de formação de raízes (DIAS et al., 2012; HARTMANN et al., 2002; VALERI et al., 2012).

CONCLUSÕES

A produtividade das minicepas foi superior nas coletas efetuadas no verão e esta estação também propiciou a produção de mudas de *Luehea divaricata* com maior número de folhas, maior formação e comprimento de raízes primárias e presença de raízes secundárias por meio de miniestaquia. Contudo, o processo de miniestaquia, nas condições avaliadas, pode ter continuidade ao longo do ano. Aos 60 dias de cultivo, já podem ser obtidas mudas de *Luehea divaricata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, G. B.; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; RIBAS, K. C. Z.; KOEHLER, H. S. Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 399-404, 2007.

ALFENAS, A. C.; ZAZUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV. 2009. 500 p.

ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M.; PAIVA, H. N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.

ALTOÉ, J. A., MARINHO, C. S.; TERRA, M. I. C.; BARROSO, D. G. Propagação de araçazeiro e goiabeira via miniestaquia de material juvenil. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 312-318, 2011.

BRONDANI, G. E.; ARAUJO, M. A.; WENDLING, I.; KRATZ, D. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 57, p. 29-38, jul-dez, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Açoita-Cavalo (*Luehea divaricata*)**, Circular Técnica Embrapa Florestal, Colombo, n. 147, 9 p., 2008

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

DIAS, P. C., OLIVEIRA, L. S., XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p 109-112, 2014.

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; NOGUEIRA, A.

C. Miniestaquia

de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax com o uso de Ácido Indol Butírico e Ácido Naftaleno Acético. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010.

FERRIANI, A. P. ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; HELM, C. V.; BOZA, A.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Produção

de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, n. 67, p. 257-264, 2011.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant**

Propagation: principles and practices. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant**

Propagation: principles and practices. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

Instituto Nacional de Meteorologia – INMET. Brasília: INMET, 2017. Disponível em:

<<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 07 dez. 2017.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol

1. Nova Odessa: Plantarum. 2008. 384 p.

OLIVEIRA, T. P. F.; BARROSO, D. G.; LAMÔNICA, K. R.; CARNEIRO, J. G. A.; OLIVEIRA, M. A. Productivity

of polyclonal minigarden and rooting of *Handroanthus heptaphyllus* Mattos minicuttings. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 2423-2432, 2015.

PACHECO, J. P.; FRANCO, E. T. H. Ácido indolbutírico em diferentes diâmetros na estaquia de *Luehea divaricata*.

Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.6, p.1624-1629, 2008.

PEÑA, M. L. P.; ZANETTE, F.; BIASI, L. A. Época de coleta e ácido indolbutírico no

enraizamento de miniestacas de pitangueira. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 5, p. 3055-3068, 2015.

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

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. [S.l.]:

Herbário Barbosa Rodrigues; Secretaria da Agricultura e Abastecimento-DRNR, 1988. 525 p.

ROSA, L. S. **Adubação nitrogenada e substratos na miniestaquia de *Eucalyptus***

dunnii Maiden. 89 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O.; COLEHO, R. I.; RABELLO, W. S.; MARTINS FILHO, S.

Níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 125-

129, 2010.

SILVA, M. P. S.; BARROSO, D. G.; SOUZA, J. S.; FERREIRA, D. A.; CARNEIRO, J. G. A. Enraizamento de miniestacas e produtividade de minicepas de cedro australiano manejadas em canaletões e tubetes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 4, p. 703-713, 2012.

STUEPP, C. A.; WENDLING, A.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Estaquia de árvores adultas de *Paulownia fortunei* var. *mikado* a partir de brotações epicórmicas de decepa. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 667-677, 2015.

TONIETTO, A.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Enraizamento de miniestacas de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 373-376, 2001.

VALERI, S. V.; SÁ, A. F. L.; MARTINS, A. B. G.; BARBOSA, J. C. Enraizamento de estacas de *Caesalpinia echinata* Lam. em hidroponia. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 2, p. 241-250, 2012.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2013. 279 p.

XAVIER, A., SANTOS, G. A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M. L. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 2, p.139-143, 2003.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Circular Técnica Embrapa Florestas**, Colombo, 5 p., 2008.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de corticeira-domato por miniestaquia de propágulos juvenis**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 5 p. (Comunicado Técnico 130).

Recebido em:

14/03/2018

Aceito em:

28/09/2018

6 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

6.1 Variabilidade genética de fragmentos naturais de *Luehea divaricata* no bioma Mata Atlântica com marcadores microssatélites

Manuscrito em fase final de revisão para submissão

RESUMO

No presente estudo usamos locos microssatélites para analisar a variabilidade genética em três fragmentos naturais de *Luehea divaricata* localizados em municípios do estado do Rio Grande do Sul no bioma Mata Atlântica, visando obter informações que auxiliem na conservação desses recursos florestais. Ter inferências sobre a variabilidade genética é fundamental para a escolha correta das estratégias de manejo a serem implantadas nessas e em outras áreas. Com auxílio do *software* GenAlEx 6.5 foram estimados parâmetros da variabilidade genética e sua partição entre e dentro dos fragmentos. Foi observada uma maior variabilidade genética dentro dos fragmentos (77%), o que é esperado para espécies cuja reprodução é predominantemente por cruzamentos. Foi estimado um fluxo gênico superior a 1 ($Nm=3,853$), o que é suficiente para homogeneizar as frequências alélicas e tornar os fragmentos similares geneticamente. Em decorrência do elevado fluxo gênico entre os fragmentos, o índice de diferenciação genética foi baixo ($F_{ST}=0,072$), o que torna os fragmentos menos suscetíveis aos efeitos adversos da fragmentação. Há variabilidade genética nos fragmentos de *Luehea divaricata* estudados, e a maior parte está distribuída dentro desses remanescentes florestais. O intenso fluxo gênico contribui para uma baixa diferenciação genética desses fragmentos naturais, tornando-os menos suscetíveis aos efeitos do isolamento reprodutivo.

Palavras-chave: Recursos genéticos; Conservação; Espécie florestal; Fluxo gênico.

ABSTRACT

In this study we used microsatellite loci to analyse the genetic variability of three natural fragments of *Luehea divaricata* in the Atlantic Forest, aiming to provide information useful for their conservation. Having inferences about genetic variability is fundamental for the correct selection of management strategies to be implemented in these and other areas. With the GenAlEx 6.5 software, genetic variability parameters and their partition between and within fragments were estimated. Higher genetic variability was observed within the fragments (77%), which is expected for species whose reproduction is predominantly by crosses. A gene flow greater than 1 ($Nm=3.853$) was estimated, which is sufficient to homogenize allelic frequencies and make genetically similar fragments. Due to the high gene flow between fragments, the genetic differentiation index was low ($F_{ST}=0.072$), which makes the fragments less susceptible to the adverse effects of fragmentation. There is genetic variability in *Luehea divaricata* fragments studied, and most of them are distributed within these forest remnants. The intense gene flow contributes to a low genetic differentiation of these natural fragments, making them less susceptible to the effects of reproductive isolation.

Key-words: Genetic resources; Conservation; Forest species; Gene flow.

INTRODUÇÃO

A intensa degradação e perda da cobertura florestal no Brasil está gerando uma grande preocupação nas últimas décadas no que diz respeito a perda da biodiversidade dos biomas. O estabelecimento de campos de cultivo e agropecuária que se estendem por grandes áreas no sul do país, onde inicialmente a cobertura nativa predominava, levou à devastação de grande parte dos biomas sulinos (ROESCH et al., 2009). Assim como outras espécies florestais brasileiras, *Luehea divaricata* Martius & Zuccarini, nativa dos biomas Pampa e Mata

Atlântica, teve suas populações naturais assoladas pela ação antrópica. Essa fragmentação justifica a realização de estudos visando à conservação dos recursos genéticos para, dessa maneira, garantir a preservação dos genes que ainda estão presentes na floresta nativa, e que possuem combinações gênicas únicas e insubstituíveis (CARVALHO, 2008; FLÔRES et al., 2011).

Pesquisas relacionadas à conservação de populações naturais têm seu enfoque na variabilidade genética e sua estruturação entre e dentro de populações. Os resultados desses trabalhos são fundamentais para a escolha correta das estratégias de manejo e conservação a serem implantadas nessas e em outras áreas (NAGEL et al., 2015; CONSON et al., 2013).

Luehea divaricata é integrante da família Malvaceae, com ocorrência natural desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul na mata semidecídua, sendo conhecida popularmente nesses locais como açoita-cavalo, caiboti, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, pau-de-canga. Do ponto de vista ambiental, é uma das árvores mais utilizadas na recuperação de áreas degradadas em função da sua adaptação às encostas íngremes, margens de rios e áreas com solo permanentemente encharcado (CARVALHO, 2008; LORENZI, 2008).

Trata-se de uma espécie hermafrodita, classificada como alógama quanto ao sistema reprodutivo, ou seja, a fecundação cruzada é predominante em suas populações naturais quando não fragmentadas ou perturbadas de alguma maneira. Espécies que se reproduzem predominantemente por cruzamentos, apresentam menor divergência genética entre populações do que àquelas que se reproduzem por autofecundação, uma vez que as fecundações cruzadas recombina a variabilidade genética a cada geração e favorecem a dispersão dos genes via pólen (SERROTE et al., 2016).

No entanto, é esperado que espécies alógamas que tenham sofrido fragmentação e, portanto, redução populacional estão propensas à atuação de fatores como a deriva genética e

a endogamia, que reduzem a variabilidade genética e influenciam diretamente na viabilidade desses indivíduos remanescentes. Em curto prazo, as populações com baixa variabilidade genética se tornam mais suscetíveis a doenças e pragas, perda de alelos de incompatibilidade e fixação de alelos deletérios. Já em longo prazo, a perda de variabilidade genética pode conduzir à redução na capacidade das populações em responder a alterações nas pressões de seleção (TEMPLETON, 2011; HARTL; CLARCK, 2010). O fluxo gênico, que corresponde ao movimento de genes dentro ou entre populações diferentes, permite a conectividade destas populações de tamanho reduzido as quais passam a se comportar como uma única população de maior tamanho, reduzindo assim os efeitos da fragmentação sobre a perda de viabilidade das populações (SERROTE et al., 2016).

O acesso à variabilidade genética existente nas populações naturais é frequentemente realizado de maneira indireta por meio de marcadores de DNA, que têm como base o polimorfismo localizado em suas sequências. Os marcadores também têm sido utilizados para realizar estudos comparativos, permitindo simulações sobre a origem e evolução de populações, espécies e famílias, através de parâmetros genéticos que caracterizam as populações como a riqueza alélica, a heterozigosidade observada e esperada, o coeficiente de endogamia, o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a riqueza genotípica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GODOY, 2009; MONDINI et al., 2009).

Algumas espécies arbóreas já tiveram suas populações estudadas a partir de marcadores de DNA, como a própria *Luehea divaricata* (NAGEL et al., 2015; SERROTE et al., 2016), *Eugenia uniflora* (AGUIAR et al., 2013), *Cabralea canjerana* (MELO et al., 2015), *Araucaria angustifolia* (SILVA et al., 2015), *Tectona grandis* (GIUSTINA et al., 2017) entre outras. Face ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética de três fragmentos naturais de *Luehea divaricata* com marcadores microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal, isolamento e análise das soluções de DNA genômico

Foram coletadas amostras foliares de indivíduos adultos de três fragmentos naturais de *Luehea divaricata* no bioma Mata Atlântica localizados no Rio Grande do Sul, Brasil, nos municípios de Coronel Barros 28°23'00.2"S 53°59'59.2"W (sete exemplares), São Pedro do Sul 29°38'08.0"S 54°12'56.8"W (cinco exemplares) e Restinga Seca 29°44'01.9"S 53°30'24.8"W (10 exemplares). A seguir, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel kraft e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até o isolamento de DNA.

O isolamento de DNA foi conduzido no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), seguindo adaptações do protocolo de Ferreira; Grattapaglia (1998), conforme determinado por León (2014). A qualidade e a concentração das amostras de DNA genômico obtidas foram realizadas em espectrofotômetro de UV-Vis NanoDrop® ND-1000.

Amplificação dos fragmentos de DNA

As soluções de DNA foram diluídas para uma concentração 50 ng μL^{-1} para posterior amplificação por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR), no Núcleo de Genômica e Ecologia Molecular – NuGEM, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus São Gabriel. Foram analisados quatro locos microssatélites (Ldiv31; Ldiv40; Ldiv55; Ldiv58) selecionados pelo nível de polimorfismo observado nos fragmentos de *Luehea divaricata* estudados por Ruas et al. (2009).

O volume total de cada reação foi de 12,5 μL de solução, que foi preparada usando-se um Eppendorf epMotion® 5070 (Eppendorf AG®, Hamburgo, Alemanha) contendo cerca de 50 ng de DNA template, 0,25 μM de tampão, 0,5 μM de MgCl_2 , 1 U de DNA-Polimerase *Taq* (Invitrogen®), 0,05 μM de dNTP, 0,125 μM de iniciadores *forward* e *reverse* e 0,125 μM do

iniciador M-13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3), marcado com fluorescência AlexaFluor 680 (Invitrogen®). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador BIO-RAD C1000 Touch™ (BioRad Co., Hercules, CA, EUA) obedecendo ao seguinte perfil térmico: desnaturação inicial de 96°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 50 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 7 min e uma extensão final a 72 °C por 7 min.

Posteriormente, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (p/v) utilizando-se um sequenciador de DNA automático Li-Cor 4300 S (LiCor Inc., Lincoln, NB, EUA), os quais foram automaticamente marcados e analisados pelo SAGAGT *Software*® (LiCor Inc.). Simultaneamente, foi efetuada uma verificação visual em cada gel a fim de corrigir eventuais erros de marcação das bandas pelo *software*.

Análise da variabilidade genética

A partir dos dados obtidos, foram estimados os parâmetros genéticos populacionais usando-se o software GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Para cada loco microsatélite foram estimados o número total de alelos (N), o número efetivo de alelos (Ne), a heterozigosidade observada (H_O), a heterozigosidade esperada (H_E), o índice de fixação populacional (F_{IS}), o índice de diferenciação genética (F_{ST}) e, também, foi testado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Análise da estruturação genética

Foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) para particionar a variabilidade genética entre e dentro dos fragmentos. Adicionalmente, com base nos valores do F_{ST} , foram obtidos os valores do fluxo gênico para cada par de fragmentos naturais de *Luehea divaricata* estudados, em termos de número de migrantes por geração (Nm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variabilidade genética

Os três fragmentos naturais apresentaram polimorfismo nos locos analisados, revelando, cada um, dois alelos em cada fragmento (Tabela 1), exceto São Pedro do Sul no loco Ldiv58, motivo pelo qual foi excluído das análises subsequentes. Esse reduzido número de alelos possivelmente é consequência de um processo de fragmentação das populações originais, haja vista o igualmente reduzido número de indivíduos observados nos remanescentes, os quais foram todos amostrados.

Com o maior número de indivíduos, Restinga Seca foi o fragmento com os maiores valores de heterozigosidade ($H_O = 0,7$; $H_E = 0,448$), o que implica em maior variabilidade genética, já São Pedro do Sul ($H_O = 0,2$; $H_E = 0,18$), o menor fragmento, apresenta a menor variabilidade (Tabela 1). No estudo de Nagel et al. (2015), em que foram utilizados os mesmos locos do presente trabalho (para além do loco Ldiv48), a H_O variou entre 0,42 e 0,57, sendo a H_E entre 0,53 e 0,77.

O número efetivo de alelos foi inferior ao número total de alelos, em todos os locos e fragmentos, o que sugere a presença de alelos raros (alelos com frequência abaixo de 0,05) (MOURA et al., 2009). Igualmente, o resultado está de acordo com o esperado (KIMURA; CROW, 1964) aplicando-se a Lei de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Resultado semelhante foi relatado por Nagel et al. (2015) que obtiveram entre 2 e 11 alelos, e um número efetivo entre 1,15 e 7,81, a partir da amostragem de 128 indivíduos em cinco populações de *Luehea divaricata*.

Os valores da heterozigosidade observada (H_O) para a maioria dos locos avaliados nos três fragmentos, apesar de numericamente superiores aos esperados no equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) (médias de 0,408 e 0,293, respectivamente) não diferiram significativamente de acordo com o teste de equilíbrio ($P < 0,05$), o que significa que fatores evolutivos, tais como

seleção, mutação, migração e deriva genética não estão atuando de maneira a alterar suas frequências gênicas e genóticas ao longo das gerações.

Constituiu exceção os locos Ldiv31 e Ldiv40 no fragmento de Restinga Seca, no qual a heteroziguidade observada foi superior à esperada o que sugere um excesso de heterozigotos. Isso é ratificado pelos valores negativos dos índices de fixação (F_{IS}) (Tabela 1), que indicam haver uma seleção favorável ao genótipo heterozigoto nos locos estudados (MOURA et al., 2009). De maneira semelhante, no estudo de três locos microssatélites em populações de *Solanum lycocarpum* localizadas ao Sul do estado de Goiás, Brasil, foram observados valores de H_O superiores a H_E , presumivelmente devido à seleção favorável ao genótipo heterozigoto (MOURA et al., 2009). Além da seleção, há que se considerar que outros fatores evolutivos (mutação, migração e deriva genética) também podem estar contribuindo para alterar a distribuição de frequências alélicas e genóticas, conduzindo a um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (FRANKHAM et al., 2002), observado em um dos fragmentos de *Luehea divaricata* estudados no presente trabalho.

Por outro lado, na análise de cinco locos microssatélites (dos quais quatro foram empregados no presente trabalho) em cinco populações de *Luehea divaricata* localizadas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, Brasil, os valores de H_O foram inferiores aos de H_E (0,52 e 0,64, respectivamente), sendo obtido um F_{IS} de 0,186 (NAGEL et al., 2015). Nesse caso, os resultados sugerem redução da diversidade genética em decorrência da intensa fragmentação que a espécie pode ter sofrido no bioma Pampa brasileiro.

Estruturação genética

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a maior proporção da variabilidade genética está distribuída dentro (77%) e apenas 23% entre os fragmentos naturais estudados. Resultado semelhante foi obtido por Nagel et al. (2015) em estudo já

mencionado anteriormente realizado com microssatélites em cinco populações do bioma Pampa, no Brasil, em que 76,12% da variabilidade está distribuída dentro e 23,88% entre as populações. Já em outro estudo realizado desta feita com nove populações de *Luehea divaricata* no bioma Mata Atlântica brasileiro também com microssatélites, foi registrada uma maior (93,16%) variação dentro das populações (CONSON et al., 2013). Valores altos de variabilidade genética dentro de grupos naturais de indivíduos são esperados ocorrer em espécies cuja reprodução é predominantemente do tipo fecundação cruzada (VOGLER; KALISZ, 2001), como é considerada ser *Luehea divaricata* (RUAS et al., 2009), e cujos resultados observados no presente trabalho e já discutidos anteriormente ratificam que os cruzamentos, aparentemente, reduzem eventuais efeitos de deriva e de endogamia, mesmo diante da fragmentação existente que poderia ocasionar isolamento reprodutivo.

No presente trabalho, pode-se constatar que não há isolamento reprodutivo entre os fragmentos estudados, haja vista ter sido estimado um fluxo gênico superior a 1 ($Nm = 3,853$ migrantes/geração – Tabela 2), que é suficiente para homogeneizar as frequências alélicas e tornar os fragmentos similares geneticamente (SLATKIN, 1985). A partir desse fluxo, foram estimados, para todos os pares de fragmentos, baixos valores de distância genética (G_{ST}) e altos valores de identidade genética (Tabela 2). O par São Pedro do Sul – Coronel Barros foi o que apresentou a menor distância genética (0,024) e a maior identidade genética (0,977). Já o par São Pedro do Sul – Restinga Seca apresentou a maior distância genética (0,089) e a menor identidade genética (0,915). Esses resultados são coerentes com aqueles relacionados ao fluxo gênico (Tabela 2) entre esses fragmentos. Entretanto, o par São Pedro do Sul – Restinga Seca é, dentre aqueles estudados, o mais próximo geograficamente (71 km), sendo, assim, esperado que apresentasse a menor diferenciação genética de acordo com a primeira lei da geografia (TOBLER, 1970). O valor do coeficiente de correlação entre as matrizes de diferenciação

genética e distância geográfica foi negativo e significativo ($r = -0,954$, $p < 0,05$), portanto, não foi observado o cumprimento deste princípio nos fragmentos estudados. No estudo de Nagel et al. (2015) foram obtidos valores baixos de distância genética entre as populações estudadas (R_{ST} entre 0,046 e 0,347) e uma correlação positiva com a distância geográfica, suportado pelo padrão de isolamento por distância.

Quando foi utilizada a abordagem F de Wright (1965), foi observado o mesmo padrão de diferenciação genética discutido anteriormente em relação a distância genética de Nei, em que os fragmentos de São Pedro do Sul e de Restinga Seca apresentaram o maior valor ($F_{ST} = 0,118$), possivelmente como resultado do mais baixo fluxo gênico ($Nm = 1,867$ migrantes/geração) (Tabela 2) entre eles. Contudo, o fluxo gênico não é o único responsável pela redução da diferenciação genética entre esses fragmentos, mas também o fato da deriva e seleção favorecerem os mesmos alelos em todos os fragmentos.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a importância de se preservar o maior tamanho possível de fragmentos ou populações naturais de maneira a assegurar a conservação da variabilidade genética, haja vista que a heterozigosidade está diretamente relacionada ao número de indivíduos. Também foi observado que a fragmentação não afetou a viabilidade genética, pois os remanescentes estudados mantêm fluxo gênico suficiente para se contrapor aos efeitos negativos do isolamento reprodutivo. Assim, considerando-se esses aspectos, constituem fragmentos menos prioritários para intervenção visando à conservação. Entretanto, deve-se considerar que a variabilidade genética e o fluxo gênico devem ser monitorados de maneira a reportar eventuais reduções e adotar medidas necessárias à perpetuação da espécie a médio e longo prazos.

CONCLUSÃO

Há variabilidade genética nos fragmentos de *Luehea divaricata* estudados, e a maior parte está distribuída dentro desses remanescentes florestais. O intenso fluxo gênico contribui para uma baixa diferenciação genética desses fragmentos naturais, tornando-os menos suscetíveis aos efeitos do isolamento reprodutivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, R. V. et al. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 226-233, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rceres/v60n2/v60n2a11.pdf> Acesso em: 15/08/2019. doi: 10.1590/S0034-737X2013000200011.
- CARVALHO, P. E. **Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*)**. Circular Técnica, Colombo,PR: 2008.
- CONSON, A.R.O. et al. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v. 141, p. 205–215, 2013. doi: 10.1007/s10709-013-9719-4
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FLÔRES, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cflo/v21n1/1980-5098-cflo-21-01-00175.pdf> Acesso em: 24/08/2019. doi: 10.5902/198050982760
- FRANKHAM, R. et al. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press. pp. 617, 2002.

- GODOY, J. A. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. **Revista Ecosistemas**, v. 18, n. 1, p. 23-33, 2009.
- GIUSTINA, L. D. et al. Variabilidade genética em genótipos de teca (*Tectona grandis* Linn. F.) baseada em marcadores moleculares ISSR e caracteres morfológicos. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1311-1324, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cflo/v27n4/1980-5098-cflo-27-04-1311.pdf> Acesso em: 03/09/2019. doi: 10.5902/1980509829894
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 659 p.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v.49, n.4, p.725-738, 1964.
- LEÓN, E. A. B. **Qualidade de sementes, micropropagação, conservação *in vitro* e isolamento de DNA genômico de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.** Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1**. Nova Odessa: Plantarum. 2008. 384p.
- MELO, A. T. O. et al. Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica na APA Fernão Dias. **Revista Árvore**, v.39, n.2, p.365-374, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v39n2/0100-6762-rarv-39-02-0365.pdf> Acesso em: 05/09/2019. doi: 10.1590/0100-67622015000200016
- MONDINI, L. et al. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. **Diversity**, v.1, p.19-35, 2009. doi: 10.3390/d1010019

MOURA, T. M. et al. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 82, p. 143-150, 2009.

NAGEL, J.C. et al. Historical gene flow within and among populations of *Luehea divaricata* in the Brazilian Pampa. **Genetica**, v.143, n.3, p.317-29, 2015. doi: 10.1007/s10709-015-9830-9

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v.28, p.2537-2539, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460

ROESCH, L. F. W. et al. The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. **Diversity**. v. 1, p. 182-198, 2009. doi: 10.3390/d1020182

RUAS E. A. et al. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. **Conservation Genetics Resources**, v. 1. p. 245-248, 2009. doi: 10.1007/s12686-009-9060-5

SERROTE, C. M. L. et al. Simulating the selfing and migration of *Luehea divaricata* populations in the Pampa biome to investigate the conservation potential of their genetic resources. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016. doi: 10.4238/gmr.15038410

SILVA, E. C. B. et al. Coeficientes de herdabilidade e de parentesco em um fragmento florestal de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcadores genéticos. **Scientia forestalis**, v. 43, n. 105, p. 147-153, 2015.

SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, v.39, n.1, p.53-65, 1985.

TEMPLETON, A. R. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011.

TOBLER, W.R. A computer movie simulating urban growth in the Detroit region. **Economic Geography**, v.46, n.2, p.234-240, 1970.

VOGLER, D. W.; KALISZ, S. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 202-204, 2001.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, n.3, p.395-420, 1965.

Tabela 1 - Estimativas de parâmetros relacionados à variabilidade genética de três fragmentos naturais de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) com base na análise de quatro locos microssatélites. Santa Maria, RS, UFSM, 2019.

Fragmento	Locos	N	Na	Ne	H _O	H _E	F _{IS}	EHW
	Ldiv31	7	2	1,508	0,429	0,337	-0,273	0,471 ^{ns}
	Ldiv40	7	2	1,508	0,429	0,337	-0,273	0,471 ^{ns}
Coronel	Ldiv55	7	2	1,153	0,143	0,133	-0,077	0,839 ^{ns}
Barros	Ldiv58	2	2	1,600	0,500	0,375	-0,333	0,637 ^{ns}
	Total	23						
	Média		2	1,442	0,375	0,295	-0,239	
	Ldiv31	5	2	1,220	0,200	0,180	-0,111	0,804 ^{ns}
São Pedro	Ldiv40	5	2	1,220	0,200	0,180	-0,111	0,804 ^{ns}
do Sul	Ldiv55	5	2	1,220	0,200	0,180	-0,111	0,804 ^{ns}
	Total	15						
	Média		2	1,220	0,200	0,180	-0,111	
	Ldiv31	10	2	1,923	0,800	0,480	-0,667	0,035 [*]
	Ldiv40	10	2	1,923	0,800	0,480	-0,667	0,035 [*]
Restinga	Ldiv55	10	2	1,835	0,700	0,455	-0,538	0,089 ^{ns}
Seca	Ldiv58	10	2	1,600	0,500	0,375	-0,333	0,292 ^{ns}
	Total	40						
	Média		2	1,820	0,700	0,448	-0,551	
	Total	78						

N= Número de indivíduos; Na= Número de alelos diferentes; Ne= Número efetivo de alelos;

H_O= Heterozigiosidade observada; H_E= Heterozigiosidade esperada; F= Índice de Fixação;

EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; ns = não significativo; * = significativo (P<0,05).

Tabela 2 – Estimativas de parâmetros relacionados à estruturação genética entre os pares de fragmentos naturais estudados. Santa Maria, RS, UFSM, 2019.

Fragmentos	Nm	G_{ST}	Identidade genética de Nei	Distância Geográfica (Km)	F_{ST}
Coronel Barros - São Pedro do Sul	4,884	0,024	0,977	228	0,049
Coronel Barros – Restinga Seca	4,809	0,053	0,949	180	0,049
São Pedro do Sul – Restinga Seca	1,867	0,089	0,915	71	0,118
Média	3,853	0,055	0,947	160	0,072

Nm = Fluxo gênico; G_{ST} = Distância genética de Nei; F_{ST} = Diferenciação genética.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram obtidos relevantes avanços no estado da ciência relativa à propagação vegetativa via micropropagação e miniestaquia da espécie florestal nativa brasileira *Luehea divaricata*, integrante dos biomas Mata Atlântica e Pampa. Os resultados obtidos foram publicados como artigos científicos ou manuscritos submetidos a periódicos especializados, em sua maioria, do estrato Qualis internacional.

No que diz respeito à qualidade das sementes de *Luehea divaricata*, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram seu comportamento fisiológico ortodoxo no armazenamento, e indicam que é possível manter sua viabilidade mesmo após longos períodos de conservação, no caso específico, quatro anos, em refrigerador.

A variação observada na incidência de alguns gêneros fúngicos ao longo do armazenamento pode ser resultante da atuação isolada ou combinada de fatores ambientais e genéticos, os quais podem ter implicações na qualidade fisiológica e sanitária das sementes. Adicionalmente, não se deve excluir a possibilidade que o comportamento variável na incidência de fungos esteja relacionado a eventuais interações desfavoráveis entre eles, que resultaram no controle da maioria dos gêneros fúngicos no decorrer dos quatro anos de armazenamento, conforme foi verificado no presente estudo.

De maneira semelhante ao que foi registrado em relação à qualidade fisiológica, considerando-se o grau de umidade determinado nos lotes de sementes também é possível confirmar sua classificação como ortodoxa durante o armazenamento, o que vai de encontro a alguns registros da literatura, que as classificam como recalcitrantes.

Em relação à micropropagação da espécie, as concentrações 10 ou 20 μM da auxina Ácido Indolbutírico (AIB) são eficientes em formar raízes em brotações de *Luehea divaricata* aos 60 dias de cultivo *in vitro*. No que diz respeito ao estudo do efeito dos diferentes períodos de cultivo *in vitro*, realizado em meio nutritivo MS sem fitorreguladores, somente após 56 dias foi observada média superior a uma folha por

explante com sinal de senescência em brotações de *Luehea divaricata*, indicando que o intervalo entre os subcultivos pode ser de cerca de 60 dias. Porém, nas fases de multiplicação e enraizamento, a suplementação com fitorreguladores, a qual não foi testada no experimento em questão, poderia, talvez, reduzir esse tempo e aumentar a produtividade, haja vista que os melhores resultados observados em relação às folhas e às raízes, nessas condições, ocorreram somente após 5 meses de cultivo.

No experimento relacionado ao crescimento mínimo e subsequente retomada do crescimento, a concentração 10 g L^{-1} de sorbitol é importante para realizar a conservação *in vitro* de *Luehea divaricata*, a qual pode ser realizado por um período de até 120 dias. Contudo, a subsequente retomada de crescimento das brotações conservadas na presença de sorbitol é limitada a 90 dias.

Na miniestaquia, aos 30 dias de cultivo, no que diz respeito à formação e ao número de raízes com o emprego de 1000 mg L^{-1} de AIB em tratamento “pulse”, já são produzidos resultados satisfatórios, permitindo que as plantas permaneçam um menor tempo em casa de vegetação utilizando-se uma concentração reduzida de auxina, comparativamente àquelas que foram testadas. Isso pode otimizar tanto o tempo como os custos da produção de mudas. No entanto, para obter maiores médias de formação de raízes secundárias, comprimento das raízes e número de folhas, é necessário aumentar o cultivo para um período de 60 dias.

A produtividade das minicepas é superior no verão, e esta estação também produz mudas mais desenvolvidas e enraizadas de *Luehea divaricata*, porém podem ser efetuadas coletas nas demais estações, indicando que o processo de miniestaquia pode ter continuidade ao longo do ano, nas condições avaliadas. A miniestaquia é, portanto, uma alternativa eficiente para a propagação da espécie, e já aos 30 dias de cultivo em casa de vegetação podem ser obtidas miniestacas de qualidade, e a critério dos viveiristas esse período pode ser prolongado para 60 dias de cultivo obtendo-se um maior desenvolvimento das mudas de *Luehea divaricata* obtidas por miniestaquia.

Em relação à análise da variabilidade genética por meio de marcadores microssatélites, foi observada uma maior variabilidade genética dentro (77%) dos

três fragmentos naturais de *Luehea divaricata* localizados em municípios do estado do Rio Grande do Sul no bioma Mata Atlântica, o que é esperado para espécies cuja reprodução é predominantemente por cruzamentos. Foi estimado um fluxo gênico superior a 1 ($Nm=3,853$), o que é suficiente para homogeneizar as frequências alélicas e tornar os fragmentos similares geneticamente. Em decorrência desse elevado fluxo gênico entre os fragmentos, o índice de diferenciação genética foi baixo ($F_{ST}=0,072$), o que os torna menos suscetíveis aos efeitos adversos da fragmentação. Os resultados observados são fundamentais para a adequada escolha de estratégias de manejo e conservação genética desses recursos florestais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. 350p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 365p.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> Acesso em: 08/07/2017.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata Atlântica: manual de adequação ambiental**. Brasília: MMA/SBF, 2010. 96 p.

CARDOSO, V. J. M. **Dormência: estabelecimento do processo**. In: A. G. Ferreira & F. Borghetti (orgs). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. 2004. 323p.

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

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

CARVALHO, P. E. **Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*)**. Circular Técnica, Colombo,PR: 2008.

CHEROBINI, E. A. I. **Avaliação da qualidade de sementes e mudas de espécies florestais nativas**. 2006. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

CUNNINGHAM, R. A. Provisional tree and shrub seed zones for the great plains. **Great Plains Agricultural Council Publication**, v. 71, p. 1-15, 1975.

DAVIDE, A. C; SILVA, E. A. A.; Sementes florestais. In: DAVIDE, A. C; SILVA, E. A. A. **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. Lavras: Ed. UFLA, 2008, pp. 11 – 82.

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M. B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M. A. de O.; BAITELLO, J. B. **Sementes e mudas de árvores tropicais**. São Paulo: Páginas Letras Editora e Gráfica, 1997. 65 p.

DUTRA, A. F.; ARAUJO, M. M.; RORATO, D.; MIETH, P. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Luehea divaricata* Mart. et. Zucc. em diferentes substratos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 411-418, 2016.

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**, v.3, n. 1, p. 1-13, 1993.

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

FLÔRES, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). 2007. 73p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

FLÔRES, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência. Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.

FOWLER, J. A. P. Superação de dormência e armazenamento de sementes de espécies florestais. In: GALVÃO, A. P. M. **Reflorestamento de Propriedades Rurais para fins Produtivos e Ambientais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. cap.5, p77-100.

GOMES, C. S. **Qualidade de sementes e rizogênese *in vitro* em *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). 2017. 62p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

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

HONG, T. D.; ELLIS, R.H. **Storage**. In: Tropical tree seedmanual. [s.l]: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries & Genetics Resources, 2003. p.125-136.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745 p.

LEÓN, E. A. B. **Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese *in vitro* em explantes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

LEÓN, E. A. B. **Qualidade de sementes, micropropagação, conservação *in vitro* e isolamento de DNA genômico de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.** Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarium, 1992. 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1**. Nova Odessa: Plantarum. 2008. 384p.

MACIEL, C.G.; SOUZA, L.B.; BOVOLINI M.P.; BRUM, D.L.; MUNIZ, M.F.B.; BURIOL, G.A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoitacavalão (*Luehea divaricata*). **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 75, p. 331-338, 2013.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC / ESAL / FAEPE, 1988. 106p.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais**. 2013. 98p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MBORA, A.; SCHMIDT, L.; ANGAINE, P.; MESO, M. OMONDI, W.; AHENDA, J.; LILLESO, J-P.; MWANZIA, J.; MUTUA, W.; MUTUA, N.; JAMNADASS, R. **Tree seed quality guide**. Nairobi: world Agroforestry Centre, 2009. 28 p.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas**. Colombo: Embrapa Florestas, 13 p., 2006.

MEDEIROS, A.C. DE S.; MENDES, M.A .S.; FERREIRA, M.A .S.V.; ARAGÃO, F.J.L. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*Astronium urundeuva*) (Fr. All) Engl. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n.1, p. 51-55, 1992.

MELO, P.R.B.; **Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de ipê-verde (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.)**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Tese de Doutorado. São Paulo, 2009

MIETH, A. T.; PIVETA, G.; PACHECO, C.; HAMANN, F. A.; RODRIGUES, J.; MUNIZ, M. F. B. Influência de extrato vegetal na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de *Luehea divaricata* (açoitacavalão). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 1240-1242, 2007.

NAPPO, Mauro E.; GOMES, Laura J.; CHAVES, Maria M. F. **Reflorestamentos mistos com essências nativas para recomposição de matas ciliares**. Boletim Agropecuário, Nº 30, p. 5-31, UFLA, Lavras, 2001.

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.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura; AGIPLAN, 1977. 289 p.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, p. 499-514, 1973.

SILVA, K. B. **Rizogênese *in vitro* e aclimatização de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). 2016. 73p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.

SILVA, K. B.; REINIGER, L. R. S.; RABAIOLLI, S. M. S.; STEFANEL, C. M.; SILVA, L. D. Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. *Ciência Florestal*, v. 29, n. 3, p. 1282-1295, 2019.

SMITH, M.; WANG, T. B. S.P.; MSANGA, H. P. Chapter 5: **Dormancy and Germination**. *In: Tropical Tree Seed Manual*. [s.l]: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003.

STEFANEL, C. M. **Aspectos da qualidade de sementes e do estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* De Candolle**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). 2016. 101p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.

VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. **Métodos de Quebra de Dormência de Sementes**. Piracicaba: IPEF-LCF/ESALQ/USP, Informativo Sementes IPEF, 1997.