

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

**RIZOGÊNESE *IN VITRO* E *EX VITRO* EM  
*Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

**TESE DE DOUTORADO**

**Aline Ritter Curti**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**



**RIZOGÊNESE *IN VITRO* E *EX VITRO* EM  
*Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

**Aline Ritter Curti**

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 obtenção do grau de  
**Doutora em Engenharia Florestal**

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

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

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

Ritter Curti, Aline  
RIZOGÊNESE IN VITRO E EX VITRO EM *Peltophorum dubium*  
(SPRENGEL) TAUBERT / Aline Ritter Curti.-2014.  
133p.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Micropropagação 2. Miniestaquia 3. Aclimatização I.  
Rejane Silveira Reiniger, Lia II. Título.

---

©2014

Todos os direitos autorais reservados a Aline Ritter Curti. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por do autor.

Endereço eletrônico: [alinerittercurti@yahoo.com](mailto:alinerittercurti@yahoo.com)

---

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

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Tese de Doutorado**

**RIZOGÊNESE *IN VITRO* E *EX VITRO* EM  
*Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

elaborada por  
**Aline Ritter Curti**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Engenharia Florestal**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

**Maristela Machado Araújo, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

**Frederico Dimas Fleig, Prof. Dr. (UFSM)**

**Diego Pascoal Golle, Prof. Dr. (UNICRUZ)**

**Valdir Marcos Stefenon, Prof. Dr. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014.



***“Só podemos alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”***

*Friedrich Nietzsche*



## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Artemio e Nerci por serem meu porto seguro em todas as horas e por todo o amor e cuidados que a mim dedicam.

Ao meu irmão Jonas e sua família, em especial às minhas sobrinhas Roberta e Betina que a cada dia nos fazem acreditar que tudo vale à pena e que o amanhã pode ser ainda melhor.

À amiga Clair Walker, irmã que Deus me permitiu escolher, por tantos anos de amizade e por estar sempre comigo, não só nas horas boas, mas principalmente nas horas nem tão boas assim.

Às amigas Aline Christo e Suelen, por todos os momentos de alegria e descontração que me proporcionam nesta reta final.

À minha orientadora, professora Dr.<sup>a</sup> Lia Rejane Silveira Reiniger, por todas as oportunidades que proporcionou ao meu crescimento, que fizeram toda a diferença na minha formação profissional e pessoal, pela compreensão nos momentos mais difíceis e por nunca deixar de acreditar que eu era capaz.

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.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

Ao colega e amigo Enrique por toda a amizade e auxílio nos trabalhos, por sempre lembrar que tudo daria certo e por sempre se disponibilizar a nos ajudar, pelo seu exemplo de dedicação e profissionalismo.

À colega e amiga de longa data, Aline Paim, por todos os momentos alegres, dificuldades que superamos juntas ao longo da nossa jornada de estudos e amizade e também, pelas conquistas que partilhamos. Certamente ainda serão muitas!

Aos demais colegas do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, pela amizade e auxílio constante na execução e condução dos experimentos. Sem a ajuda de vocês tudo teria sido bem mais difícil e trabalhoso.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho e fizeram com que fosse possível chegar até aqui.

Muito obrigada!

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal  
Universidade Federal de Santa Maria

### **RIZOGÊNESE *IN VITRO* E *EX VITRO* EM *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

AUTORA: ALINE RITTER CURTI

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014.

*Peltophorum dubium* é uma espécie florestal nativa do Brasil dotada de importância ecológica para fins de recuperação de áreas degradadas e econômica, para fins madeiráveis. As sementes desta espécie apresentam germinação baixa e irregular se não forem submetidas a tratamentos para superação de dormência. Em virtude da carência de estudos que viabilizem a propagação vegetativa da espécie e considerando a natural recalcitrância em relação à rizogênese nesse processo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a rizogênese *in vitro* e *ex vitro* em brotações de *P. dubium* aplicando-se as técnicas de micropropagação e de miniestaquia, bem como a aclimatização das mudas produzidas por meio destas técnicas. Para a rizogênese *in vitro*, brotações micropropagadas foram submetidas a tratamentos em que foram testados diferentes meios de cultivo, com acréscimo de 30 g L<sup>-1</sup> de vermiculita, combinados aos meios nutritivos MS, MS/2, WPM, WPM/2 e alterações nas concentrações da auxina ácido indolbutírico - AIB (0, 5, 10 ou 20 µM) e sacarose (0, 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>), na presença ou ausência de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>), arranjados em diferentes ensaios. Os resultados indicaram que a melhor combinação para a rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* é a utilização do meio nutritivo WPM/2, na ausência de sacarose e da auxina, porém com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Essa condição foi, ainda, a que permitiu o melhor desempenho das mudas durante a aclimatização *in vitro*. Para a rizogênese em brotações via miniestaquia, foram utilizadas miniestacas, de 3 a 7 cm, isoladas da porção apical de brotações de minicepas de origem seminal. Foi avaliada a formação de raízes após as miniestacas serem submetidas à imersão em solução contendo 0, 1.000, 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, oriundas de diferentes coletas e permanecendo por 30, 60 ou 90 dias em casa de vegetação com condições controladas adequadas à indução de raízes. A rizogênese nessas miniestacas ocorreu mesmo sem a utilização de AIB, ao longo das sucessivas coletas. No entanto, foi incrementada com a utilização de até 2.000 mg L<sup>-1</sup> da auxina, sendo suficiente o período de 60 dias para que ocorra a formação de raízes. As mudas apresentaram bom desempenho durante a aclimatização, indicando que a técnica de miniestaquia é viável para a produção de mudas de *Peltophorum dubium*.

**Palavras-chave:** Micropropagação. Miniestaquia. Aclimatização.



## ABSTRACT

Doctor Thesis  
Post-Graduation Course in Forest Engineering  
Universidade Federal de Santa Maria

### **RHIZOGENESIS *IN VITRO* AND *EX VITRO* IN *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

AUTHOR: ALINE RITTER CURTI

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, February 28<sup>th</sup>, 2014.

*Peltophorum dubium* is native forest species of Brazil endowed with ecological importance for the recovery of degraded areas and economical for timber purposes. The seeds of this species have low and irregular germination if they are not subjected to treatments to overcome dormancy. However, there are few studies that allow for the vegetative propagation of the species. As a result, the present study aimed to evaluate the formation of roots in shoots of *P. dubium* applying the techniques of micropropagation and minicutting and acclimatization of plants produced by these techniques. For rooting *in vitro* micropropagated shoots were subjected to treatments where different culture media were tested, with addition of 30 g L<sup>-1</sup> vermiculite, combined with the nutrient media MS, MS/2, WPM, WPM/2 and changes in concentrations of auxin IBA (0, 5, 10 or 20 µM) and sucrose (0, 15 or 30 g L<sup>-1</sup>) in the presence or absence of agar (0 or 7g L<sup>-1</sup>) arranged in different tests. The results indicated that the best combination for root formation *in vitro* shoots of *Peltophorum dubium* is the use of nutritional WPM/2 without addition of sucrose and auxin, with 7 g L<sup>-1</sup> agar. This condition was still allowing the best performance of the plants during acclimatization *in vitro*. For rooting of shoots via minicutting, cuttings 3-7 cm apical portion of rooted shoots of seminal origin were used. Root formation after the cuttings are subjected to immersion in solution with 0, 1.000, 2.000 or 4.000 mg L<sup>-1</sup> IBA, from different collections and during 30, 60 or 90 days in a greenhouse with controlled conditions was evaluated for root induction. Rooting in cuttings occurred even without the use of IBA, after successive collections. However, it was increased with the use of up to 2.000 mg L<sup>-1</sup> auxin the period of 60 days being sufficient for the formation of roots takes place. The seedlings showed good performance during acclimatization, indicating that the technique is feasible for minicutting plants production *Peltophorum dubium*.

**Keywords:** Micropropagation. Minicutting. Acclimatization.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS acrescido de vermiculita e independentemente das concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20 $\mu$ M), aos 35 dias. Em A) Brotações no meio nutritivo; em B) formação de calo na base de brotação; em C) e D) formação de raiz a partir de calos e em E) formação de raízes a partir de calo, mas com a presença de raízes secundárias. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....47
- Figura 2 – Sobrevivência média (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30mL de vermiculita em função das diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico (AIB) durante a fase de aclimatização *in vitro*, ao longo de 21 dias de cultivo, em copos plásticos com capacidade para 300mL, contendo 90mL de substrato (mistura de vermiculita e Mc Plant® (1:1, v/v)) e 30mL de água destilada. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....48
- Figura 3 – Número médio de folhas em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30mL de vermiculita em função da interação entre as diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico (AIB) e os três períodos de cultivo, durante a fase de aclimatização *in vitro*, em copos plásticos com capacidade para 300mL, contendo 90mL de substrato (mistura de vermiculita e Mc Plant (1:1, v/v)) e 30mL de água destilada. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.....49
- Figura 4 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de vermiculita e diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20 $\mu$ M) durante a fase de aclimatização *in vitro*. Em A) brotações durante a fase de aclimatização *in vitro* em copos plásticos vedados com uma lâmina de polivinilcloro - PVC, aos 7 dias de cultivo; em B) brotação que sobreviveu durante a fase de aclimatização *in vitro*; e em C) brotação com sinais de senescência durante a aclimatização *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.....51
- Figura 5 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, ao longo de 60 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM ('Wood Plant Medium') com a concentração de sais reduzida à metade (WPM/2), acrescido de diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 10 ou 20  $\mu$ M) e combinados com 30mL de vermiculita. Em A) brotação com formação de calo na base, cultivada na ausência da auxina; em B) brotação com pequena formação de calo na base e emissão de raiz desprovida de raízes

secundárias, cultivada em meio contendo 10  $\mu\text{M}$  de AIB; em C) brotação enraizada sem formação de calos e com presença de raízes secundárias, cultivada em meio contendo 10  $\mu\text{M}$  de AIB; e em D) brotação enraizada com intensa formação de calos na base e presença de raízes secundárias, cultivada em meio contendo 20  $\mu\text{M}$  de AIB. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. .... 57

Figura 6 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo ('Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2). Em A) brotação cultivada em meio sem adição de ácido 3-indolbutírico - AIB, sacarose ou ágar; em B) brotação cultivada em meio sem adição de AIB e de sacarose, com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar; em C) brotação cultivada em meio sem adição de AIB, mas com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, na ausência de ágar; em D) brotação cultivada em meio com 10  $\mu\text{M}$  de AIB, sem adição de sacarose e de ágar; em E) brotação cultivada em meio com 10  $\mu\text{M}$  de AIB, sem adição de sacarose e com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar; e em F) brotação cultivada em meio com 10  $\mu\text{M}$  de AIB, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 64

Figura 7 – Médias de sobrevivência (%), número de folhas e porcentagem de folhas com senescência em mudas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert em função dos dias de cultivo, enraizadas independentemente da ausência ou presença de ácido indolbutírico (AIB), de diferentes concentrações de sacarose (0, 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>), em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), combinado com 30mL de vermiculita, durante a fase de aclimatização *in vitro* em copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 180mL contendo uma mistura de substrato McPlant "F"® + Vermiculita (1:1, v/v). Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 73

Figura 8 – Mudanças de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. Em A) ambiente de enraizamento *in vitro*, em meio nutritivo na ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico (0 ou 10  $\mu\text{M}$  AIB), com diferentes concentrações de sacarose (0, 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e na ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>), durante a fase de aclimatização *in vitro* (sala de cultivo); em B) após 56 dias de aclimatização *in vitro* em copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 180mL contendo uma mistura de substrato McPlant "F"® + Vermiculita (1:1, v/v). Barra = 2 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 74

Figura 9 – Miniestquia em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. Em A) Mudanças produzidas, a partir de sementes, com 45 dias; em B) Mudanças decepadas para constituir as minicepas; em C) Minicepas emitindo novas brotações; em D) Coletas de brotações para confeccionar as miniestacas; em E) Miniestaca com 3-10cm e, pelo menos, um par de folhas cortadas ao meio; em F) Imersão das miniestacas em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água

- destilada; v/v) de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 1000; 2000 ou 4000mg L<sup>-1</sup>); em G) Miniestacas postas para enraizar em bandejas contendo mistura de McPlant Misto® Classe “F” (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita), areia e vermiculita extra fina na proporção 2:1:1 (v/v/v); H) Bandejas contendo as miniestacas em casa de vegetação com nebulização; I) Miniestaca enraizada; e J) Aclimatização das mudas produzidas por miniestaquia em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....80
- Figura 10 – A) Minicepas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert., com aproximadamente 5 meses; B) Detalhe de uma minicepa após a 2<sup>a</sup> coleta de brotações, efetuada em 18/06/12 e C) Detalhe de uma minicepa com a emissão de novas brotações, aproximadamente 30 dias após a coleta. Santa Maria, UFSM, 2012. ....82
- Figura 11 – Aclimatização de mudas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert produzidas via miniestaquia, após permanência por 60 dias ou 90 dias na fase de formação de raízes. Em A) Fase inicial da aclimatização (aos 7 dias) em casa de vegetação sob sombrite; em B) Mudas após a retirada do sombrite, aproximadamente aos 30 dias após aclimatização. Santa Maria, UFSM, 2012. ....84
- Figura 12 – Médias de sobrevivência (%), formação de raízes (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm), formação de calos (%) e número de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada; v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB em que foram imersas por 10s, ao longo de 90 dias de avaliações. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.....86
- Figura 13 – Miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert enraizadas aos 30 e aos 60 dias após imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000mg L<sup>-1</sup>). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....88
- Figura 14 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, em função da coleta, independentemente da avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. ....92
- Figura 15 – Formação média de raízes (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, em função da coleta e independentemente da

avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 95

- Figura 16 – Nº médio de raízes em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg.L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, avaliados aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 99
- Figura 17 – Comprimento médio de raízes (cm) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, independentemente da coleta, nas avaliações efetuadas aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 100
- Figura 18 – Presença de raízes secundárias (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, nas diferentes coletas e nas avaliações efetuadas aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 103
- Figura 19 – Formação média de calos (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s, nas diferentes coletas e independentemente da avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 104
- Figura 20 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s, Independentemente da coleta, na avaliação efetuada aos 30 e aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 107
- Figura 21 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s, em função da coleta e independentemente da avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 107

- Figura 22 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, durante o período de aclimatização em casa de vegetação, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas por 10s, e do período de avaliação (30, 60 ou 90 dias) independentemente do período de coleta das miniestacas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 111
- Figura 23 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, durante o período de aclimatização em casa de vegetação, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, e da coleta, independentemente do período em que foi efetuada a avaliação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 112
- Figura 24 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, a coleta e o período de aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. .... 114
- Figura 25 – Diâmetro médio (mm) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, do período de coleta e das avaliações efetuadas aos 30, 60 ou 90 dias de aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. .... 116
- Figura 26 – Altura média (cm) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, do período de coleta e das avaliações efetuadas aos 30, 60 ou 90 dias de aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. .... 118



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Porcentagem média de sobrevivência e de folhas com sinais de senescência em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de vermiculita, independentemente das concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0, 5, 10 ou 20 $\mu$ M), em função do período de cultivo, durante a fase de aclimatização *in vitro*, em copos plásticos com capacidade para 300mL, contendo 90mL de substrato (mistura de vermiculita e Mc Plant® (1:1, v/v)) e 30mL de água destilada . Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....50
- Tabela 2 – Médias de sobrevivência (%), comprimento de raízes (cm) e nº de folhas em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes meios nutritivos, independentemente da presença de ácido 3-indolbutírico - AIB, combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....53
- Tabela 3 – Formação média de raízes (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes meios nutritivos, independentemente da presença de ácido 3-indolbutírico - AIB, combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....54
- Tabela 4 – Médias de formação de raízes (%), comprimento de raízes (cm), presença de raízes secundárias (%) e formação de calos (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, ao longo de 60 dias de cultivo, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0, 10 ou 20  $\mu$ M) acrescidas ao meio e combinadas com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....56
- Tabela 5 – Sobrevivência média (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da interação entre concentrações de sacarose e de ácido 3-indolbutírico (AIB), independentemente da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>), acrescidos ao meio e combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....60
- Tabela 6 – Sobrevivência média (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo ('Wood Plant Medium' - WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da interação entre concentrações de sacarose e da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10  $\mu$ M) adicionado ao meio e combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....61

- Tabela 7 – Médias de porcentagem de formação raízes e de folhas com sinais de senescência em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de sacarose adicionadas ao meio e combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente da presença ou ausência de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) e de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10 µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 62
- Tabela 8 – Médias de número de raízes, formação de calos (%) e número de folhas por explante em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico (AIB) combinadas a 30mL de vermiculita no meio, independentemente das concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>). Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 63
- Tabela 9 – Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%) e número de folhas por explante em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico (AIB) combinadas a 30mL de vermiculita no meio, independentemente das concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>). Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 65
- Tabela 10 – Médias de porcentagem de formação de raízes e de raízes secundárias em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) acrescido ao meio nutritivo, combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente das concentrações de sacarose (0, 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012. .... 66
- Tabela 11 – Médias de porcentagem de formação de raízes secundárias e de folhas com sinais de senescência em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de sacarose acrescidas ao meio, combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente da ausência ou presença ou de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10 µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 67
- Tabela 12 – Comprimento médio de raízes (cm) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi

reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de sacarose, acrescidas ao meio, combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) e em função da presença ou ausência de ácido 3-indolbutírico (0 ou 10µM de AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.....68

- Tabela 13 – Médias de porcentagem de sobrevivência, número de folhas e porcentagem de folhas com sinais de senescência em mudas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas da fase de enraizamento *in vitro*, em meio nutritivo ‘Wood Plant Medium’ (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função dos tratamentos que consistiram de combinações entre ausência ou presença de ácido indolbutírico (AIB), diferentes concentrações de sacarose (Sac) e da ausência ou presença de ágar, após 56 dias de aclimatização *in vitro* em mistura de substrato McPlant “F”® + Vermiculita (1:1, v/v). Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....71
- Tabela 14 – Médias de formação de raízes (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm) e presença de raízes secundárias (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função do período de avaliação, independentemente da concentração da solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido indolbutírico - AIB (a 0; 1000; 2000 ou 4000 mg L<sup>-1</sup>), nas quais foram previamente imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2012. ....90
- Tabela 15 – Formação média de raízes (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função do período de avaliação, independentemente da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) nas quais foram, previamente, imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. ....97
- Tabela 16 – Comprimento médio de raízes em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes coletas e do período (em dias) em que foram efetuadas as avaliações, após tratamentos de imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) independentemente da concentração utilizada. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. ....101
- Tabela 17 – Formação média de calos (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes coletas e o período de avaliação (em dias), após tratamentos de imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg.L<sup>-1</sup>) independentemente da concentração utilizada. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. ....105
- Tabela 18 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes

coletas e o período de avaliação (em dias), após tratamentos de imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) em que foram, previamente, imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 108

Tabela 19 – Produtividade (nº médio de miniestacas coletadas por minicepa) de minicepas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert mantidas em casa de vegetação, em vasos flexíveis com capacidade para 4L, contendo uma mistura de substrato McPlant Misto® - Classe “A” (casca de pinus, corretivo de acidez e fertilizantes minerais) e Carolina Soil® (turfa, vermiculita, calcário, NPK e casca de arroz) na proporção 1:1 (v/v) em função das diferentes coletas, data das coletas, estação do ano e intervalo entre coletas. Santa Maria, RS, UFSM, 2012..... 110

Tabela 20 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes coletas e o período (em dias) de aclimatização em casa de vegetação, independentemente da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 112

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 A espécie <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Propagação vegetativa</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3 Rizogênese em espécies lenhosas</b> .....	<b>35</b>
<b>3 CAPÍTULO I RIZOGÊNESE <i>IN VITRO</i> EM BROTAÇÕES DE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT E ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Objetivo</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 Material e métodos</b> .....	<b>39</b>
3.2.1 Efeito do meio nutritivo contendo AIB na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> .....	39
3.2.2 Aclimatização <i>in vitro</i> de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> enraizadas em meio nutritivo contendo AIB.....	40
3.2.3 Efeito de diferentes meios nutritivos contendo AIB na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert.....	41
3.2.4 Efeito do meio nutritivo WPM/2 com AIB na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert.....	42
3.2.5 Efeito de sacarose, AIB e ágar na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert .....	43
3.2.6 Aclimatização <i>in vitro</i> de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> enraizadas em meio nutritivo contendo diferentes concentrações de sacarose, AIB e ágar .....	44
3.2.7 Análises estatísticas .....	45
<b>3.3 Resultados e discussões</b> .....	<b>45</b>
3.3.1 Efeito do meio nutritivo contendo AIB na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> .....	45
3.3.2 Aclimatização <i>in vitro</i> de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> enraizadas em meio nutritivo contendo AIB.....	47
3.3.3 Efeito de diferentes meios nutritivos contendo AIB na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert.....	52
3.3.4 Efeito do meio nutritivo WPM/2 com AIB na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert.....	55
3.3.5 Efeito de sacarose, AIB e ágar na rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert .....	59
3.3.6 Aclimatização <i>in vitro</i> de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> enraizadas em meio nutritivo contendo diferentes concentrações de sacarose, AIB e ágar .....	70
<b>3.4 Conclusões</b> .....	<b>75</b>
<b>4 CAPÍTULO II MINIESTAQUIA EM <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT</b> .....	<b>77</b>
<b>4.1 Objetivo</b> .....	<b>77</b>
<b>4.2 Material e Métodos</b> .....	<b>77</b>
4.2.1 Miniestaquia em <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert a partir de propágulos juvenis .....	77
4.2.2 Enraizamento de miniestacas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert.....	78

4.2.3 Formação de raízes em miniestacas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert após sucessivas coletas.....	81
4.2.4 Produtividade do minijardim clonal .....	82
4.2.5 Aclimatização de mudas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert produzidas via miniestaquia.....	83
4.2.6 Análises estatísticas .....	84
<b>4.3 Resultados e discussões .....</b>	<b>85</b>
4.3.1 Enraizamento de miniestacas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert....	85
4.3.2 Formação de raízes em miniestacas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert após sucessivas coletas.....	91
4.3.3 Produtividade do minijardim clonal .....	108
4.3.4 Aclimatização de mudas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert produzidas via miniestaquia.....	110
<b>4.4 Conclusões .....</b>	<b>120</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, houve um expressivo acréscimo no uso da propagação vegetativa como ferramenta para a implantação de florestas clonais, sendo que as práticas convencionais de produção de mudas estão sendo substituídas por técnicas que possam garantir a superioridade genética dos indivíduos. A procura constante pelo melhoramento da qualidade das mudas e pela racionalização de custos de produção tem justificado a elevada demanda por pesquisas e desenvolvimento tecnológico neste setor (SILVA *et al.*, 2008), impulsionando o desenvolvimento de vários trabalhos de pesquisa, os quais procuram definir as melhores técnicas, material de propagação, épocas do ano, recipientes, substratos e adubação para a produção de mudas.

Na silvicultura brasileira, a propagação vegetativa foi responsável por 85% do total de 280 milhões de mudas de eucalipto plantadas anualmente em uma área de aproximadamente 170 mil hectares, segundo dados divulgados até o ano de 2008. Do total de mudas produzidas de maneira assexuada, 96% foram produzidas utilizando-se miniestacas produzidas em minijardins clonais (SILVA *et al.*, 2008). No ano de 2011, a produção primária florestal, somou R\$ 18,1 bilhões, sendo que a silvicultura contribuiu com 72,6% (R\$ 13,1 bilhões) desse total (IBGE, 2011). Esses valores tão expressivos devem-se, entre outros, ao fato de que a utilização de técnicas de propagação vegetativa tem proporcionado ganhos consideráveis na produtividade de mudas, mantendo as características favoráveis de indivíduos selecionados, evitando a variabilidade inerente a populações de árvores obtidas a partir de sementes e assim, permitido a obtenção de grandes avanços no setor florestal com a utilização da silvicultura clonal, a qual têm se mostrado promissora, inclusive, para espécies nativas.

Técnicas como miniestaquia, microestaquia e micropropagação têm permitido a multiplicação uniforme e em larga escala de genótipos selecionados. Para espécies do gênero *Eucalyptus*, por exemplo, já foram obtidos grandes avanços nesse setor, os quais permitiram incrementos na produtividade e alto rendimento em plantios clonais. No entanto, as informações técnicas disponíveis sobre a produção de mudas de espécies nativas do Brasil são escassas, o que limita o progresso da

sua silvicultura, uma vez que a qualidade da muda usada nos plantios comerciais tem influência no sucesso de qualquer programa de desenvolvimento florestal e reflete no crescimento futuro das árvores, podendo, desta maneira, interferir na produtividade das florestas.

Entre as espécies nativas que têm despertado interesse, mas que ainda carece de estudos nesse sentido, está *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, pertencente à família Fabaceae, e conhecida popularmente, nas diferentes regiões do Brasil, como canafístula, acácia amarela, barbatimão, angico-bravo, entre outros. Sua madeira serrada e roliça apresenta alto valor econômico, pois tem resistência moderada ao apodrecimento, bem como seu uso é recomendado para restauração de matas ciliares e recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 1992; IPEF, 2013).

Entretanto, as sementes de canafístula apresentam forte dormência tegumentar e a espécie encontra-se ameaçada de extinção, sendo recomendada a sua conservação *ex situ* (CARVALHO, 2003). Os estudos publicados até o momento contemplam, na sua maioria, aspectos relacionados à propagação da espécie via sexuada (BRACHTVOGEL e MALAVASI, 2010; NAKAGAWA *et al.*, 2010; PEREZ *et al.*, 1999; POLETTO *et al.*, 2007; PORTELA *et al.*, 2001). No entanto, mesmo ainda incipientes, os estudos desenvolvidos visando à propagação vegetativa da espécie, via micropropagação (BASSAN, 2006; CURTI *et al.*, 2010a; CURTI *et al.*, 2010b; CURTI; REINIGER, 2014), indicam que a espécie tem potencial para a multiplicação via assexuada, mas que, ainda, é necessária a realização de estudos visando incrementar as taxas de multiplicação e otimizar a fase de enraizamento *in vitro*. Por tratar-se de uma espécie florestal, o principal entrave para a produção de mudas reside, principalmente, na dificuldade de enraizamento de brotações, tanto para aquelas obtidas *in vitro* como *ex vitro*.

Isso é decorrente do fato de que, em espécies lenhosas, a aptidão para o enraizamento de propágulos está associada ao grau de maturação, sendo observado que, na fase juvenil, as plantas apresentam maior potencial de enraizamento que na adulta. Em vista das dificuldades de enraizamento apresentadas pelo material maduro, o rejuvenescimento de células e tecidos é, provavelmente, um dos mais importantes aspectos para a efetiva aplicação da propagação vegetativa em espécies florestais (FERREIRA *et al.*, 2010).

Com essa finalidade é que foram desenvolvidas as técnicas de miniestaquia e microestaquia, assim como a micropropagação. Basicamente, a diferença entre as duas primeiras técnicas consiste na origem do material que compõe o jardim clonal, ou seja, a microestaquia é uma técnica em que os brotos são provenientes da micropropagação, sendo enraizados *in vitro* (em laboratório) ou *ex vitro* (em casa de vegetação) e, posteriormente, formando o microjardim clonal. A técnica de microestaquia foi desenvolvida buscando aproveitar, ao máximo, a juvenildade dos propágulos vegetativos e visando a maximizar o enraizamento das microestacas no processo de propagação clonal (XAVIER e COMÉRIO, 1996). No entanto, o processo de microestaquia, na sua primeira etapa, depende da existência de laboratórios de cultura de tecidos, para alcançar um grau de rejuvenescimento rápido e desejável às plantas, o que encarece a produção de mudas e necessita de mão-de-obra especializada.

A técnica de miniestaquia surgiu em consequência dessas limitações apresentadas pela microestaquia, no que tange aos aspectos técnicos e econômicos (XAVIER *et al.*, 2001). A técnica consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo método da estaquia convencional ou a partir de sementes como fontes de propágulos vegetativos, formando o minijardim clonal, que pode se localizar em tubetes, sobre bandejas metálicas, vasos, canaletões e outros (WENDLING, 1999). Nesse sentido, a utilização de brotos de mudas produzidas por semente apresenta uma série de vantagens em relação à de plantas matrizes adultas no campo, como maior facilidade de coleta das brotações, menores gastos com deslocamentos, maiores índices e velocidade de enraizamento, maior vigor do sistema radicial e partes aéreas formadas, maior variabilidade genética e a possibilidade de propagação vegetativa sem a necessidade de utilizar indutores de enraizamento, entre outros (WENDLING *et al.*, 2005).

A aplicação dessas técnicas tem permitido a propagação de genótipos de difícil enraizamento, a ampliação da porcentagem de propágulos enraizados, bem como a melhoria do sistema radicular, que é de extrema importância para o desenvolvimento satisfatório das mudas a campo (ALFENAS *et al.*, 2009). Esses aspectos podem, adicionalmente, contribuir significativamente para a ampliação da base silvicultural de espécies nativas para fins econômicos, recuperação de áreas e ecossistemas degradados (FERRIANI *et al.*, 2010).

Considerando-se o exposto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a capacidade de rizogênese *in vitro* e *ex vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert utilizando-se as técnicas de micropropagação e miniestaquia, bem como analisar a aclimatização das mudas produzidas. O trabalho está organizado em dois capítulos, divididos de acordo com a técnica utilizada:

- no primeiro capítulo são abordados os ensaios referentes à rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium*, utilizando-se a técnica de micropropagação, e a posterior aclimatização das mudas produzidas. Foram testados diferentes meios de cultivo contendo variações nos meios nutritivos, nas concentrações de auxina, sacarose e de ágar como agente gelificante;

- no segundo capítulo são apresentados os ensaios referentes à rizogênese *ex vitro* em brotações de *Peltophorum dubium*, utilizando-se a técnica de miniestaquia, e a posterior aclimatização das mudas produzidas, bem como a avaliação da produtividade do minijardim clonal. Foram testadas o efeito de diferentes concentrações da auxina AIB sobre a rizogênese, bem como de diferentes períodos de coleta de brotações e o crescimento das mudas no período de aclimatização.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A espécie *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, da família Fabaceae, conhecida como canafístula, acácia-amarela, angico bravo, tamboril, entre outros, é uma árvore longeva que ocorre, naturalmente, no Brasil desde 7°S na Paraíba a 29°S no Rio Grande do Sul e atingindo o limite Sul a 30°25'S em Artigas, no Uruguai (CARVALHO, 2003).

Sua madeira apresenta resistência moderada ao apodrecimento e pode ser empregada na construção civil, marcenaria, tanoaria, carrocerias, dormentes etc. A árvore, de crescimento rápido, muito rústica e heliófila, é recomendada para reflorestamentos mistos de áreas degradadas, para paisagismo em geral, arborização de parques, praças e rodovias (LORENZI, 1992; MARCHIORI, 1997).

O processo reprodutivo desta espécie inicia-se entre 8 e 12 anos, florescendo de dezembro a fevereiro, com a maturação das sementes de abril a junho. A dispersão dos frutos é feita lentamente pelo vento, mas os frutos maduros permanecem na árvore por longo tempo (NAKAGAWA *et al.*, 2010). Os frutos maduros, colhidos das árvores, podem ser semeados diretamente, porém, como há possibilidade de formarem mudas defeituosas, deve-se preferir extrair as sementes dos frutos (LORENZI, 1992).

As sementes da canafístula apresentam forte dormência tegumentar, a qual se instala durante a fase de desenvolvimento e/ou, maturação, o que resulta em sementes dormentes na dispersão. Esse fenômeno dificulta o estudo de maturação, o trabalho dos analistas de sementes e a formação de mudas pelos viveiristas, porque a avaliação da capacidade de germinação é prejudicada (NAKAGAWA *et al.*, 2010). No entanto, a utilização das sementes beneficiadas e que sofreram o processo de superação de dormência apresenta melhores resultados de germinação em laboratório e no viveiro do que o uso dos frutos. Para a obtenção de mudas são sugeridos tratamentos de escarificação mecânica cortando-se o tegumento na região oposta à da emergência da radícula. O poder germinativo é alto, até 95% em

sementes submetidas a tratamento para superação de dormência, e baixo, no máximo 28% em sementes não tratadas (CARVALHO, 2003). A dormência tegumentar das sementes de canafístula foi superada, também de forma eficiente, pelos tratamentos de imersão em água quente e de escarificação com ácido sulfúrico, sendo esses métodos responsáveis por proporcionarem menor tempo de emergência das plântulas, o que possibilita a formação de mudas com qualidade, em menor tempo (DUTRA *et al.*, 2013).

No Estado de São Paulo, a canafístula está ameaçada de extinção, sendo recomendada a sua conservação *ex situ* através de populações-base, sob a forma de testes de progênies e procedências (CARVALHO, 2003). Nesse sentido, vêm sendo desenvolvidos estudos com o intuito de contornar tanto os problemas que podem interferir na sua conservação como na produção de mudas de qualidade, a exemplo do trabalho realizado por Nakagawa *et al.* (2010), em que o máximo potencial de germinação, detectado nas sementes escarificadas de *Peltophorum dubium*, foi observado ocorrer no início da dispersão, quando predominaram sementes duras. O potencial de armazenamento, a germinação e o vigor das sementes de *Peltophorum dubium* também foram avaliados em diferentes substratos e profundidades de semeadura. Neste caso, em todos os tratamentos, o índice de velocidade de emergência diminuiu significativamente com o aumento na profundidade de semeadura (PEREZ *et al.*, 1999). O uso de substratos alternativos também vem sendo estudado para a produção de mudas de qualidade em viveiro, sendo que a inclusão de bagaço de cana na composição de substratos, em mistura com Bioplant®, na proporção de 3:1 (75% de Bioplant® +25% de Bagaço de cana) ou 1:1 (50% de Bioplant® +50% de Bagaço de cana), mostrou ser técnica e economicamente viável, proporcionando as maiores taxas de crescimento e índices de qualidade das mudas de canafístula produzidas (DUTRA *et al.*, 2013).

Ainda relatando estudos com sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, quando foram submetidas à superação de dormência por água aquecida a 80 °C e pré-germinadas em caixas plásticas tipo gerbox (sobre papel), em germinador à temperatura constante de 25 °C, a altura das plântulas foi beneficiada com o uso do saco plástico e de fertilizante de liberação lenta, sendo o efeito do último incrementado com o aumento no volume do recipiente. Similarmente, foi observado incremento no diâmetro do coleto de plântulas em recipientes maiores. O número de folhas, a massa seca da parte aérea e a massa seca total foram

semelhantes nas plântulas submetidas à fertilização com NPK, independentemente do volume do recipiente, o que não ocorreu naquelas tratadas com fertilizante de liberação lenta, em que a média dessa variável diminuiu com o aumento no volume do recipiente (BRACHTVOGEL; MALAVASI, 2010). O uso de turfa, como substrato para produção de mudas de canafístula a partir de sementes, realizada em tubetes com capacidade para 124 cm<sup>3</sup>, produziu resultados satisfatórios, aos sete meses, relativos às variáveis altura, diâmetro do colo, biomassa aérea, biomassa radicular, biomassa total e relação biomassa aérea/radicular (POLETTTO *et al.*, 2007).

Em outro trabalho realizado, foi avaliada a influência do sombreamento no crescimento de mudas de *Peltophorum dubium*, sendo recomendada, para o plantio imediato, a produção de mudas a sol pleno, a 30% ou a 75% de sombra. Na produção de mudas para estocagem, as mudas poderiam ser mantidas sob 50% de sombreamento (PORTELA *et al.*, 2001).

Em relação à aplicação de técnicas de cultura de tecidos, estudos que têm sido desenvolvidos no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria, demonstraram que a canafístula apresenta potencialidade para a micropropagação por meio da emissão de gemas laterais (BASSAN, 2006). Contudo, na ocasião em que foi realizado o estudo, a autora alertou que, para a obtenção de clones dessa espécie, seria necessária a otimização da capacidade dos segmentos apicais caulinares em desenvolver gemas laterais por períodos mais longos de cultivo *in vitro*, o aumento nas taxas de multiplicação e na frequência de rizogênese.

Posteriormente, estudos de multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*, desenvolvidos pelo mesmo grupo, demonstraram que o emprego da citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP), associado ou não a outras citocininas, em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKKOG, 1962), não foi eficiente em induzir a emissão de brotações em segmentos apicais caulinares (CURTI *et al.*, 2010a). Porém o emprego de meio MS suplementado com a auxina Ácido  $\alpha$ -Naftaleno Acético (ANA), combinado com a citocinina Thidiazuron (TDZ) (a 10  $\mu$ M), foi possível obter uma média de 73% de explantes que emitiram brotações adventícias. No entanto, nesse mesmo tratamento houve intensa formação de calos, indesejável nessa fase do cultivo, sendo recomendado o estudo de alternativas no intuito de promover a proliferação de um maior número de brotações (CURTI *et al.*, 2010 b). Foram

testadas também, além de BAP, as citocininas Cinetina (CIN), Isopentenil Adenina (2iP) e TDZ associadas ou não a ANA. No entanto, de maneira geral, independentemente da concentração e da combinação utilizada, essas citocininas não afetaram, significativamente, a multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Pesquisando alternativas para incrementar as taxas de multiplicação ou para obter conhecimentos adicionais sobre eventuais respostas em relação à organogênese indireta, foram obtidos resultados promissores com a utilização de segmentos cotiledonares e hipocótilos cultivados em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKKOG, 1962) contendo a auxina Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), indicando que esta pode ser uma via para o cultivo *in vitro* da espécie, a qual mostrou-se responsiva nessas condições (CANDIDO, 2013). Por fim, em relação à formação *in vitro* de raízes, resultados promissores foram obtidos, tanto sob o ponto de vista quantitativo (foram obtidas médias de 36,78% de culturas enraizadas) como qualitativamente (as raízes formadas apresentavam raízes secundárias), com a utilização de substratos alternativos, como vermiculita, areia e Plantmax® combinados ao meio nutritivo MS, aos 60 dias de cultivo. Com a utilização de vermiculita houve intensa formação de calos na base das brotações, aos 60 dias de cultivo, porém, também houve a maior formação de raízes e foi observada melhoria na qualidade do sistema radicular, quando este substrato foi combinado ao meio nutritivo MS (CURTI; REINIGER, 2014).

Em síntese, a literatura especializada contempla muitas informações relacionadas a características botânicas, morfológicas e à obtenção de mudas de canafístula via sexuada. No entanto, o volume de informações referentes às técnicas de propagação vegetativa é incipiente, sendo necessária a realização de estudos nesse sentido, os quais poderiam contribuir para o desenvolvimento de tecnologias que viabilizassem a produção de mudas de alta qualidade de maneira mais eficiente e partindo-se de materiais selecionados, com características superiores.

## **2.2 Propagação vegetativa**

A utilização da propagação vegetativa em espécies florestais, associada a programas de melhoramento, tem como finalidades acelerar o crescimento,

aumentar a produtividade e gerar madeira de qualidade e homogênea (ALFENAS *et al.*, 2009), pela multiplicação de plantas selecionadas.

As principais vantagens da propagação vegetativa para essas espécies são a formação de plantios clonais de alta uniformidade e produtividade, a produção de madeira de qualidade, a multiplicação de árvores resistentes a pragas e doenças e a transferência, de geração para geração, das características genéticas desejáveis. As principais eventuais desvantagens decorrentes do emprego da propagação vegetativa são o risco do estreitamento da base genética e a dificuldade de enraizamento existente em algumas espécies. Existem vários métodos disponíveis para a propagação vegetativa de plantas, dentre os quais podem-se citar a estaquia, a microestaquia, a miniestaquia e a propagação por meio de cultura de tecidos. Dentre esses, a cultura de tecidos e a miniestaquia têm tido ampla aplicação na produção de mudas de espécies florestais (WENDLING, 1999).

Dentro de um conceito amplo, a cultura de tecidos envolve um conglomerado de técnicas, mediante as quais um explante (parte isolada de uma planta, como protoplastos, células, tecidos e órgãos) é cultivado de maneira asséptica em um meio nutritivo (conhecido, também, como meio de cultura e que contém, entre outros constituintes, água, sais minerais, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crescimento e uma fonte de carboidrato) sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade. Nesse contexto, a depender do tipo de explante, o crescimento pode ocorrer de modo organizado ou desorganizado (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

A cultura de tecidos está apoiada na teoria da totipotência, assim como as demais técnicas de propagação vegetativa, que consiste no fato de que todas as células vivas têm a capacidade de reproduzir um organismo inteiro, desde que possuam a informação genética necessária. Na prática, entretanto, procuram-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência das células (SOUZA; JUNGHANS, 2006). Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a mais amplamente empregada é a micropropagação, que ganhou grande impulso na década de 1970, período em que surgiu o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*, elaborado por Murashige (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), a saber:

- Estágio I – seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas.

- Estágio II – multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação.

- Estágio III – transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo.

A definição e a utilização de um ou outro método de propagação varia de acordo com os objetivos do estudo, da espécie envolvida, da época do ano, da habilidade do executor, do tipo e quantidade de material disponível e das condições ambientais, entre outros fatores (WENDLING *et al.*, 2002). Devido a isso, dentre os métodos de propagação vegetativa desenvolvidos e aplicados a espécies florestais, a estaquia é a técnica mais simples e de maior viabilidade econômica para o estabelecimento de plantios clonais, pois permite, a um menor custo, a multiplicação de genótipos selecionados, em um curto período de tempo. Entretanto, a estaquia não é viável, técnica e economicamente, para todas as espécies, pois algumas não apresentam taxas de enraizamento satisfatórias. Em decorrência dessas limitações, outras técnicas, como a microestaquia e a miniestaquia, foram desenvolvidas, visando à otimização do enraizamento (JUNIOR, 2007).

A aplicação da miniestaquia na propagação clonal de *Eucalyptus* é uma realidade e mostra-se bem desenvolvida (XAVIER *et al.*, 2001), entretanto em espécies florestais nativas ainda é recente, necessitando de desenvolvimento quanto aos ajustes no processo de produção das mudas. A aplicabilidade da miniestaquia em espécies nativas é uma opção para a propagação vegetativa, igualmente, em algumas espécies em que as sementes apresentam baixo potencial de germinação, dificuldade de armazenamento e/ou quando as próprias são insumos limitantes. O tipo de propágulo utilizado para o enraizamento das miniestacas, por exemplo, é um dos itens importantes a ser avaliado na definição da melhor técnica de propagação vegetativa. Dentre os tipos de propágulos, geralmente, utilizados na propagação vegetativa estão as estacas/miniestacas, que podem ser caulinares, foliares ou radiculares (SANTOS *et al.*, 2000a).

Estudos realizados revelaram que a miniestaquia é viável para o enraizamento de miniestacas coletadas em minicepas produzidas partindo de sementes, em espécies nativas como o jequitibá rosa (*Cariniana estrellensis*), cedro rosa (*Cedrela fissilis*), mogno (*Swietenia macrophylla*) e sete cascas (*Samanea*

*inopinata*) (SANTOS *et al.*, 2000b; SANTOS *et al.*, 2001; XAVIER *et al.*, 2003). Em uma sequência esquemática da técnica de miniestaquia, inicialmente, faz-se a poda do ápice da brotação da estaca enraizada, e, em intervalos variáveis, em função da época do ano, do clone/espécie, das condições nutricionais, entre outras, haverá a emissão de novas brotações, que serão coletadas e colocadas para enraizar em condições controladas de temperatura e umidade (WENDLING *et al.*, 2002).

Para a adoção do processo de miniestaquia na propagação comercial são necessárias, entretanto, informações sobre a produtividade e longevidade das minicepas em sucessivas coletas e, quanto às miniestacas, sobre a capacidade de enraizamento, a necessidade de aplicação de auxinas exógenas, o estabelecimento e a influência da época de produção e intervalos de coleta, sobre esses propágulos, assim como sobre a aclimatização das mudas produzidas. No que se refere à micropropagação de espécies florestais, os entraves relacionados à formação de raízes em brotações devem ser superados. Para tanto, há necessidade de estudos adicionais em relação à composição dos meios de cultivo durante a fase de enraizamento *in vitro*, a exemplo da utilização ou não de fitorreguladores, de substratos alternativos ao agente geleificante ágar, bem como a necessidade de uma fonte de carboidrato externa, entre outros, uma vez que inúmeros fatores interferem na rizogênese.

### **2.3 Rizogênese em espécies lenhosas**

Para muitas espécies, sobretudo as herbáceas, a formação de raízes adventícias não tem constituído grande problema, enquanto para outras, entre as quais se inclui a maioria das espécies lenhosas, a elucidação do processo de rizogênese não foi ainda conseguida. Os maiores obstáculos ao adequado conhecimento dos fenômenos envolvidos no processo de formação de raízes adventícias residem na dificuldade de isolar e caracterizar os fatores que os controlam, em virtude da sua complexidade e da grande interação existente entre eles (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). O aprimoramento no enraizamento de brotações tem sido conseguido, especialmente, com o desenvolvimento das técnicas da microestaquia, e da miniestaquia, que possibilitaram consideráveis ganhos

decorrentes, principalmente, do aumento nos índices de enraizamento e na redução do tempo para formação da muda (XAVIER; COMÉRIO, 1996).

Na micropropagação, a etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplântio para condições *ex vitro*. A rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento de raízes. Enquanto as duas primeiras fases (às vezes consideradas como uma só) respondem ou dependem de auxina, o crescimento das raízes é inibido pela presença de auxina. A dificuldade em desenvolver um sistema eficiente de micropropagação está em determinar a condição *in vitro* na qual todas essas fases possam ocorrer normalmente e, de preferência, sem demandar manipulação adicional de uma fase para outra (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Alguns pontos básicos devem ser observados quando é desejado desenvolver metodologias de enraizamento *in vitro* para espécies recalcitrantes, como as lenhosas. Os fatores importantes incluem a escolha e as condições de cultivo da planta doadora, a composição do meio nutritivo e as condições de incubação, bem como as características do explante em si. Certos pré-tratamentos, principalmente com auxinas, podem auxiliar no enraizamento, uma vez que as auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam, consistentemente, a formação de primórdios radiculares. Skoog & Miller, em 1957, demonstraram que a reação do tecido cultivado *in vitro* depende do balanço entre auxina e citocinina: aumentando-se a concentração da primeira haveria formação de raízes; aumentando-se a da segunda, de gemas adventícias; e, em uma relação intermediária, haveria a formação de calo (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A concentração de auxinas pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular, sendo que a formação de raízes normais verifica-se em concentrações mais baixas; altas concentrações tendem a produzir muito calo na zona de enraizamento. Todavia, espécies ou mesmo cultivares diferentes reagem de maneira diversa a concentrações distintas de auxinas. A concentração ótima, para uma certa planta, pode ser insuficiente ou muito elevada para outra. Uma menor duração do período de exposição dos explantes às substâncias químicas do meio nutritivo pode levar a um melhor balanço entre raiz e parte aérea, produzindo plantas mais saudáveis (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A necessidade de utilização de duas fases distintas para o enraizamento, aplicando-se auxina por um período determinado, seguido de transferência para outro meio nutritivo, desprovido de substâncias reguladoras de crescimento pode apresentar resultados benéficos à formação de raízes (NEWELL *et al.*, 2003). Em trabalhos realizados com *Sequoia sempervirens*, concentrações de 100 a 300 mg L<sup>-1</sup> de AIB conduziram à formação máxima de raízes, após a transferência dos explantes para meio sem fitorreguladores. Porém, concentrações menores de AIB permitiram o enraizamento sem transferência para meio desprovido de fitorreguladores (ORTIZ, 1992).

Igualmente, as concentrações de fitorreguladores podem variar em função da espécie, estado de maturação dos propágulos, da forma de aplicação, entre outros e ainda em função da adoção das técnicas de microestaquia ou miniestaquia (WENDLING; XAVIER, 2005). Em *Eucalyptus* spp., por exemplo, com a técnica de miniestaquia, as concentrações variaram desde a não-aplicação até 2.000 mg L<sup>-1</sup> (WENDLING, 1999; TITON, 2001; XAVIER *et al.*, 2001), já para microestaquia recomenda-se o enraizamento sem a aplicação de regulador de crescimento (XAVIER; COMÉRIO, 1996).

Em relação à constituição do meio nutritivo utilizado na fase de enraizamento *in vitro*, o ágar é o agente gelificante mais empregado em vários trabalhos para a maioria das espécies. No entanto, nessa condição, o que se tem observado é a formação de um sistema radicular de baixa qualidade, com raízes quebradiças e desprovidas de pelos radiculares (VIAGANÓ *et al.*, 2007). Essas raízes, em geral, mostram-se pouco eficientes na absorção de água e nutrientes, comprometendo a sobrevivência e o desenvolvimento, durante a fase de aclimatização, das mudas produzidas (HOFFMANN *et al.*, 2001). Em decorrência disso, vêm sendo testados substratos alternativos para a formação *in vitro* de raízes, visando à obtenção de um sistema radicular mais apropriado à subsequente adaptação da planta em casa de vegetação. A utilização de vermiculita, perlita ou espumas de poliuretano embebidas em meio líquido podem ser alternativas mais baratas e propiciar melhores resultados do que o ágar (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Na micropropagação de mirtilo (*Vaccinium* sp.), a adição de perlita e vermiculita em meio nutritivo WPM promoveu o aumento no número e comprimento de raízes, além de maiores porcentagens de enraizamento (até 77,5%) quando comparados ao meio nutritivo contendo ágar e

carvão ativado (7,5%) durante um período de 60 dias de cultivo (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

O substrato mais adequado para a produção de mudas também varia de acordo com a espécie a ser propagada e deve permitir um bom suprimento de oxigênio e de água para a base da brotação e para o desenvolvimento de raízes, independentemente da condição de cultivo ser *in vitro* ou *ex vitro*. O material utilizado como substrato deve ser inerte, poroso, com boa drenagem e capaz de manter a aeração e a umidade, permitindo o desenvolvimento do sistema radicial (HARTMANN *et al.*, 2002).

## 3 CAPÍTULO I

### RIZOGÊNESE *IN VITRO* EM BROTAÇÕES DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT E ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS

#### 3.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de meios de cultivo com variações nos meios nutritivos, concentrações de sacarose, AIB e ágar na rizogênese *in vitro* em *Peltophorum dubium* e a posterior aclimatização das mudas micropropagadas.

#### 3.2 Material e métodos

Foram realizados diferentes ensaios, em sequência, sendo que os resultados obtidos em cada ensaio conduziram às alterações realizadas no meio de cultivo utilizado nos ensaios posteriores, os quais são descritos a seguir e apresentados resumidamente no Anexo A.

##### 3.2.1 Efeito do meio nutritivo contendo AIB na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium*

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo unifatorial, sendo que os tratamentos consistiram das concentrações 0; 5; 10 ou 20  $\mu\text{M}$  de ácido 3-indolbutírico (AIB) adicionados ao meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Brotações de *Peltophorum dubium* provenientes de ensaios de multiplicação *in vitro*, cultivadas por um período de 30 dias em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de  $1\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado, na

ausência de reguladores de crescimento, foram utilizados como explantes. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL de meio nutritivo contendo AIB, conforme o tratamento, 30mL de vermiculita e três brotações cada. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento.

Ao meio nutritivo foram acrescentados 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar (7g L<sup>-1</sup>) e, posteriormente, os frascos contendo os meios de cultivo foram autoclavados a 121°C e 1atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 20µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 35 dias de cultivo foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: sobrevivência das brotações, brotações que formaram calo na base e brotações com formação de raízes, todas expressas em porcentagem.

### 3.2.2 Aclimatização *in vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* enraizadas em meio nutritivo contendo AIB

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x3, em que os níveis do fator “A” corresponderam às concentrações de AIB (0; 5; 10 ou 20µM) adicionadas ao meio nutritivo, empregadas na fase de enraizamento *in vitro* (descrita anteriormente), e a partir das quais as brotações cultivadas no presente experimento foram oriundas, enquanto os níveis do fator “B” consistiram das avaliações realizadas aos sete, 14 ou 21 dias, totalizando 12 tratamentos. Foram utilizadas 20 brotações oriundas de cada concentração de AIB, com 35 dias de cultivo, independente de terem enraizado ou não, sendo que não havia nenhuma brotação com raiz oriunda do tratamento em que a auxina estava ausente (0µM), havia duas brotações (10%) com raízes no tratamento com 5µM de AIB, quatro brotações (20%) com raízes no tratamento com 10µM de AIB e seis brotações (30%) com raízes no tratamento que incluiu 20µM de AIB.

Estas brotações (do experimento anteriormente descrito) foram transferidas (aos 35 dias de cultivo) para copos plásticos com capacidade para 300mL contendo 90mL de substrato (mistura de vermiculita e substrato comercial McPlant Misto® Classe F, à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita, na proporção 1:1 (v/v)) e 30mL de água destilada. A unidade experimental consistiu de quatro copos plásticos, cada um contendo uma brotação. Foram utilizadas cinco repetições, totalizando 20 unidades amostrais por tratamento. Os copos plásticos foram cobertos com uma camada de filme de polivinilcloro (PVC) e acondicionados em sala de cultivo sob temperatura de  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Diariamente, foi verificada a umidade no interior dos copos e, quando necessário, foram acrescidos 10mL de água destilada para manter o turgor hídrico das brotações.

Após sete, 14 e 21 dias de aclimatização, nas condições descritas anteriormente, as plantas foram avaliadas quanto ao percentual de sobrevivência, número de folhas e número de folhas senescentes (folhas que se encontravam amareladas e/ou com as bordas secas).

### 3.2.3 Efeito de diferentes meios nutritivos contendo AIB na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, sendo que os tratamentos consistiram dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em sua composição integral de sais, MS reduzido à metade da concentração de sais (MS/2), 'Wood Plant Medium' - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) em sua composição integral de sais ou WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2) combinados às concentrações 0 ou  $10\mu\text{M}$  de ácido 3-indolbutírico (AIB). Foram utilizadas, como explantes, brotações de *Peltophorum dubium* provenientes de ensaios de multiplicação *in vitro*, cultivadas por um período de 30 dias em meio nutritivo MS acrescido de  $1\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado, na ausência de reguladores de crescimento. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL de

meio nutritivo conforme o tratamento, 30mL de vermiculita e três brotações cada. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento.

Aos meios nutritivos utilizados foram acrescidos  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $100\text{mg L}^{-1}$  (meios MS e WPM) ou  $50\text{mg L}^{-1}$  (meios MS/2 e WPM/2) de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar ( $7\text{g L}^{-1}$ ) e, posteriormente, os frascos contendo os meios de cultivo foram autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de  $20\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 30 dias de cultivo foi realizada a avaliação e as variáveis analisadas foram: sobrevivência das brotações (%), brotações que formaram calo na base (%), brotações com formação de raízes (%), comprimento de raízes (cm) e número de folhas.

#### 3.2.4 Efeito do meio nutritivo WPM/2 com AIB na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial  $3\times 2$ , sendo que os tratamentos consistiram das concentrações 0; 10 ou  $20\mu\text{M}$  de ácido 3-indolbutírico (AIB) acrescidos ao meio nutritivo, com avaliações realizadas aos 30 ou 60 dias de cultivo. Brotações de *Peltophorum dubium* provenientes de ensaios de multiplicação *in vitro*, cultivadas por um período de 21 dias em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de  $1\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado, na ausência de reguladores de crescimento foram utilizadas como explantes. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL de meio nutritivo contendo AIB, conforme o tratamento, 30mL de vermiculita e três brotações cada. Foram utilizadas sete repetições por tratamento.

Foi utilizado o meio nutritivo 'Wood Plant Medium' - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2), acrescido de  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $50\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar ( $7\text{g L}^{-1}$ ) e, posteriormente, os meios de cultivo foram

autoclavados a 121°C e 1atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 20µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 30 e 60 dias de cultivo foram realizadas avaliações e as variáveis analisadas foram: brotações com formação de raízes (%), comprimento de raízes (cm), brotações com formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

### 3.2.5 Efeito de sacarose, AIB e ágar na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo trifatorial 3x2x2, em que o fator “A” consistiu de concentrações de sacarose (0; 15 ou 30g L<sup>-1</sup>), o fator “B”, da presença ou ausência de AIB (0 ou 10µM) no meio nutritivo e o fator “C”, da presença ou ausência de ágar (0 ou 7g L<sup>-1</sup>) no meio nutritivo. Foram utilizadas, como explantes, brotações de *Peltophorum dubium* provenientes de ensaios de multiplicação *in vitro*, cultivadas por um período de 21 dias em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 1g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, na ausência de reguladores de crescimento. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL de meio nutritivo WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2), 30mL de vermiculita e três brotações cada. Foram utilizadas seis repetições por tratamento.

O meio nutritivo WPM/2 foi acrescido de AIB e sacarose, conforme o tratamento, e 50mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar (para os meios que o continham) e, posteriormente, os meios nutritivos foram autoclavados a 121°C e 1atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 20µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 30 e 60 dias de cultivo foram realizadas avaliações e as variáveis analisadas foram: sobrevivência (%), brotações com formação de raízes (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm), brotações com formação de raízes secundárias (%), brotações que formaram calo na base (%), número de folhas por explante e folhas com sinais de senescência (%) (assim consideradas àquelas folhas que se encontravam amareladas e/ou com as bordas secas).

### 3.2.6 Aclimatização *in vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* enraizadas em meio nutritivo contendo diferentes concentrações de sacarose, AIB e ágar

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 12x8, em que os tratamentos resultaram das combinações de sacarose (0; 15 ou 30g L<sup>-1</sup>), AIB (0 ou 10µM) e ágar (0 ou 7g L<sup>-1</sup>) que foram empregadas na fase de rizogênese *in vitro* (descrita anteriormente em 3.2.5), a partir da qual as brotações foram oriundas, avaliados semanalmente até os 56 dias (totalizando oito avaliações). Foram utilizadas, no mínimo, três brotações oriundas de cada tratamento em que havia ocorrido formação de raízes após 60 dias de cultivo, exceto àquelas do tratamento em que foi utilizado 10µM de AIB e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose na ausência de ágar, posto que havia somente duas brotações com raízes.

Essas brotações foram transferidas para copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 180mL contendo 60mL de substrato (mistura de vermiculita e substrato comercial McPlant Misto® Classe F, à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita, na proporção 1:1 (v/v)), acrescido de 15mL de meio nutritivo WPM/2 e 10mL de água destilada. A unidade experimental consistiu de um copo plástico contendo uma brotação. Os copos plásticos foram cobertos com outro copo, de igual capacidade, também com o fundo perfurado, a fim de manter a umidade no interior do copo e permitir que ocorressem trocas gasosas. As plantas, nessa condição, foram acondicionados em sala de cultivo sob temperatura de 25±3°C, fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 20 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Diariamente, foi verificada a umidade no interior dos copos e, quando

necessário, foram acrescentados 10mL de água destilada para manter o turgor hídrico das brotações.

Semanalmente, até os 56 dias de aclimatização, as plantas foram avaliadas quanto ao percentual de sobrevivência, número de folhas e número de folhas senescentes (assim consideradas as folhas que se encontravam amareladas e/ou com as bordas secas).

### 3.2.7 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 variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função  $\sqrt{x+0,5}$ , sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se, para a comparação das médias, o teste de Tukey ou de Scott-Knott (Experimentos 3.2.3; 3.2.4 e 3.2.5) ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão do experimento foi medida através da acurácia seletiva (AS) calculada por  $\sqrt{1-1/F_{cal}}$ , que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos.

## 3.3 Resultados e discussões

### 3.3.1 Efeito do meio nutritivo contendo AIB na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium*

Não houve efeito significativo sobre nenhuma das variáveis avaliadas. No entanto, foi observado 100% de sobrevivência das brotações (Figura 1 – A) e uma média geral de 96,6% de brotações com formação de calos na base (Figura 1 – B), o

que pode ter prejudicado o seu enraizamento, uma vez que se formaram raízes em apenas uma pequena porcentagem (9,9%) de brotações. A maioria das raízes formou-se a partir do calo e não apresentou raízes secundárias (Figura 1 – C e D). Contudo, em algumas raízes estavam presentes raízes secundárias e, neste caso, proporcionaram um melhor desenvolvimento da parte aérea (Figura 1 – E).

Isso pode ter ocorrido devido ao balanço hormonal que se estabeleceu com os níveis endógenos de hormônios das brotações e o acréscimo ou não de reguladores de crescimento no meio nutritivo, culminando com a formação de calos, e não de raízes. Semelhantemente, em explantes de cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade cv. 'Delite' e *V. corymbosum* L. cv. 'Georgiagem') enraizados em meio nutritivo WPM contendo 7 $\mu$ M de AIB, também ocorreu intensa formação de calos na base das brotações cultivadas em meios nutritivos contendo vermiculita (DAMIANI; SCHUCH, 2009). Entretanto, diferentemente do que foi observado no presente estudo, em porta-enxertos de macieira (*Malus domestica*), a indução do enraizamento e o desenvolvimento das raízes adventícias em meio nutritivo MS acrescido de 1mg L<sup>-1</sup> de AIB (4,92 $\mu$ M), combinado com vermiculita, foram considerados eficientes (HOFFMANN *et al.*, 2001). Esses resultados demonstram que as auxinas podem auxiliar no enraizamento de propágulos de algumas espécies, contudo, é necessário um balanço hormonal adequado nos tecidos, sendo este específico para cada espécie, genótipo e estado fisiológico das plantas (DIAS *et al.*, 2012).

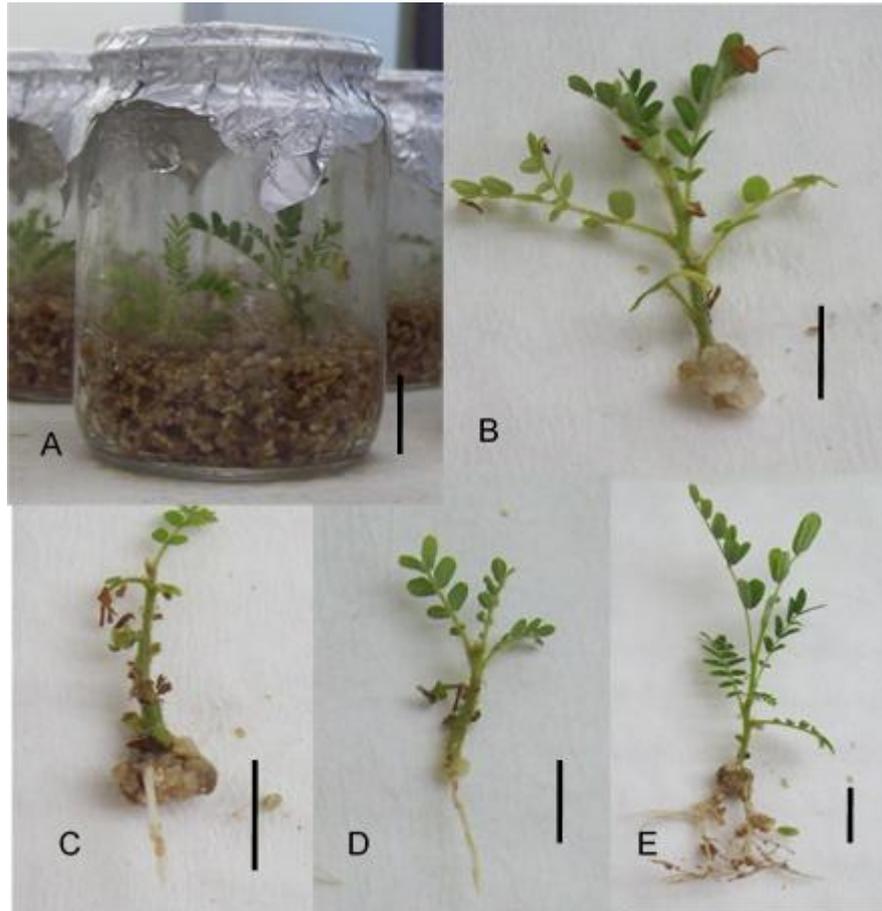


Figura 1 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS acrescido de vermiculita e independentemente das concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20 $\mu$ M), aos 35 dias. Em A) Brotações no meio nutritivo; em B) formação de calo na base de brotação; em C) e D) formação de raiz a partir de calos e em E) formação de raízes a partir de calo, mas com a presença de raízes secundárias. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

### 3.3.2 Aclimatização *in vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* enraizadas em meio nutritivo contendo AIB

Para a variável sobrevivência das brotações houve efeito significativo dos fatores principais concentrações de AIB ( $p=0,0480$ ) e do período de avaliação ( $p=0,000$ ). Os valores de acurácia seletiva obtidos, para todas as variáveis foram altos ou muito altos, permitindo que se deposite confiança nos resultados observados. Para as concentrações de AIB foi observado um comportamento

quadrático (Figura 2) da sobrevivência em relação às concentrações de AIB nas quais haviam sido cultivadas na fase de enraizamento, sendo que à medida que aumentou a concentração da auxina ocorreram maiores porcentagens de sobrevivência (em torno de 60,0%), provavelmente decorrentes da maior porcentagem de brotações enraizadas oriundas desse tratamento. Quanto ao período de avaliação, a maior porcentagem de sobrevivência foi observada aos sete dias (Figura 4 – A a C), que diferiu daquelas observadas tanto aos 14 quanto aos 21 dias (Tabela 1), decorrentes, provavelmente, do esgotamento das reservas das brotações que, sem raízes, não foram capazes de se nutrir com o avanço do período de cultivo ocasionando baixas porcentagens de sobrevivência (inferiores a 20%). Na aclimatização de marmeleiro (*Cydonia oblonga*), foram obtidos 65,12% de sobrevivência das plantas após 30 dias em processo de aclimatização, sendo que a redução no número de plantas sobreviventes ocorreu após terem sido transferidas da sala de crescimento para telado (ERIG; SCHUCH, 2004), o que nem chegou a ser efetuado (a transferência) com as brotações de *Peltophorum dubium*, no presente ensaio.

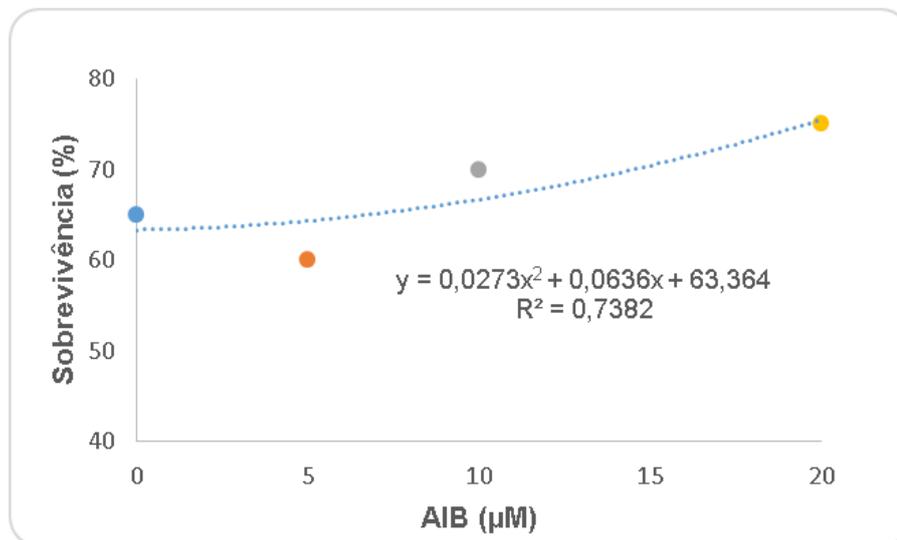


Figura 2 – Sobrevivência média (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30mL de vermiculita em função das diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico (AIB) durante a fase de aclimatização *in vitro*, ao longo de 21 dias de cultivo, em copos plásticos com capacidade para 300mL, contendo 90mL de substrato (mistura de vermiculita e Mc Plant® (1:1, v/v)) e 30mL de água destilada. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Para a variável número de folhas houve efeito significativo do fator período de avaliação ( $p=0,000$ ), mas ocorreu, também, interação significativa entre o período de avaliação e o fator concentração de AIB em que as brotações foram cultivadas anteriormente ( $p=0,0044$ ). Aos sete dias foi observado um comportamento linear decrescente (Figura 3) do número de folhas em relação às concentrações de AIB, ou seja, na maior concentração utilizada foi obtido o menor número de folhas por explante. Com o decorrer do cultivo, aos 14 e 21 dias, foi observado um comportamento linear crescente, em que o número de folhas aumentou com o aumento nas concentrações de AIB. No entanto, mesmo nas maiores concentrações, o número de folhas por explante foi inferior ao observado no início do cultivo, provavelmente resultante da ocorrência de senescência das folhas durante a aclimatização.

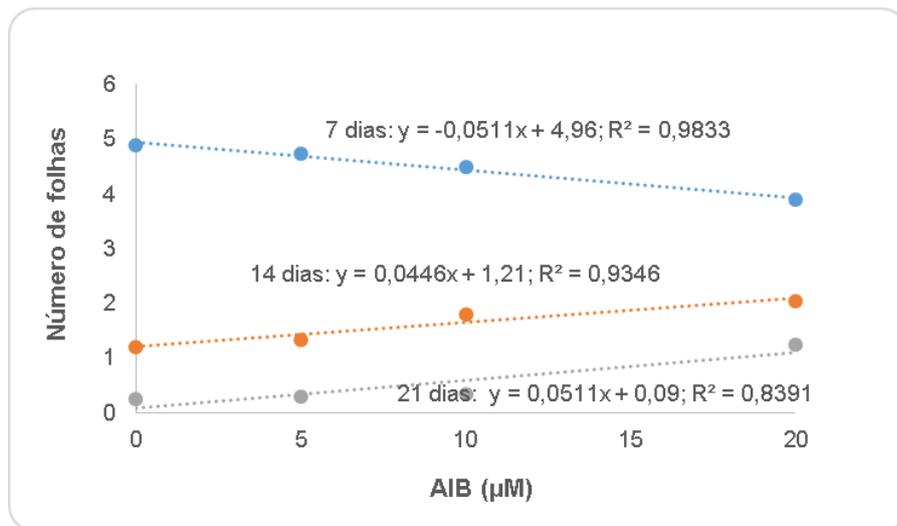


Figura 3 – Número médio de folhas em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30mL de vermiculita em função da interação entre as diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico (AIB) e os três períodos de cultivo, durante a fase de aclimatização *in vitro*, em copos plásticos com capacidade para 300mL, contendo 90mL de substrato (mistura de vermiculita e Mc Plant (1:1, v/v)) e 30mL de água destilada. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Para a porcentagem de folhas com sinais de senescência foi observado efeito significativo somente do fator período de avaliação ( $p=0,000$ ), sendo observada uma

diminuição na porcentagem de folhas senescentes ao longo do período de aclimatização (Tabela 1). Isso se deve ao fato de que as folhas que apresentavam senescência por ocasião da primeira avaliação, aos sete dias, já haviam caído e as poucas que restaram ainda não apresentavam sinais de senescência por serem folhas mais jovens.

Tabela 1 – Porcentagem média de sobrevivência e de folhas com sinais de senescência em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de vermiculita, independentemente das concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0, 5, 10 ou 20µM), em função do período de cultivo, durante a fase de aclimatização *in vitro*, em copos plásticos com capacidade para 300mL, contendo 90mL de substrato (mistura de vermiculita e Mc Plant® (1:1, v/v)) e 30mL de água destilada . Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Dias	Sobrevivência (%)		Folhas senescentes (%)	
7	100,00	a*	55,56	c
14	83,75	b	25,86	b
21	18,75	c	5,12	a
Média	67,50		28,85	
AS**	0,99		0,99	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1 / Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS  $\geq 0,9$  = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e  $\leq 0,5$  = baixa.

Uma das principais causas de redução na sobrevivência das plantas durante o processo de aclimatização é a perda excessiva de água pelas mudas que são produzidas *in vitro*. A remoção das mudas das condições *in vitro* para condições *ex vitro* provoca estresse hídrico, sendo necessário manter umidade alta e a temperatura amena, pelo menos no início do processo, para que ocorram as adaptações necessárias à sobrevivência. Mesmo com essas condições supridas, as plantas terão que desenvolver, ainda, mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática, ativar os mecanismos de controle de perda de água pelas células e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica, o que nem sempre ocorre e pode ocasionar a perda das mudas (PUROHIT, 2002; ROCHA *et al.*, 2008; VARSHNEY; ANIS, 2012). Muitas vezes, ainda, as raízes formadas não

apresentam características adequadas às funções de absorção o que determina, também, entre outros fatores, a morte das mudas (ERIG; SCHUCH, 2004). No caso de *Peltophorum dubium*, mesmo as brotações que não tinham sido enraizadas *in vitro* foram transferidas para a fase de aclimatização no intuito de que a formação de raízes pudesse ocorrer concomitantemente à essa fase. Portanto, as baixas porcentagens de plantas aclimatizadas e os indícios de pequeno desenvolvimento das plantas sobreviventes (poucas folhas e ocorrência de senescência) podem ser atribuídas à ausência de raízes nas brotações e, provavelmente, à qualidade do sistema radicular formado quando havia raízes presentes, uma vez que, essa característica é determinante no sucesso do transplante das mudas para a fase de aclimatização.

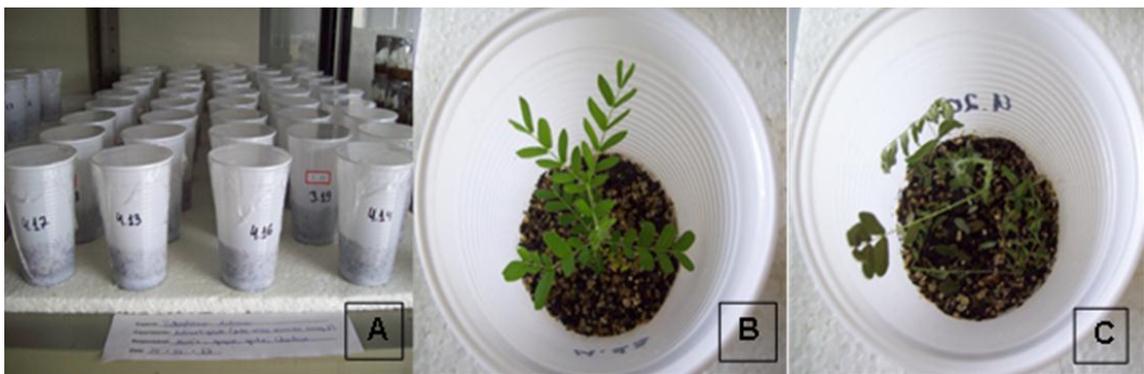


Figura 4 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas do enraizamento *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de vermiculita e diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 5; 10 ou 20 $\mu$ M) durante a fase de aclimatização *in vitro*. Em A) brotações durante a fase de aclimatização *in vitro* em copos plásticos vedados com uma lâmina de polivinilcloro - PVC, aos 7 dias de cultivo; em B) brotação que sobreviveu durante a fase de aclimatização *in vitro*; e em C) brotação com sinais de senescência durante a aclimatização *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

### 3.3.3 Efeito de diferentes meios nutritivos contendo AIB na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Para as variáveis sobrevivência, comprimento de raízes e número de folhas houve efeito significativo apenas do fator principal meio nutritivo (com valores de “p” de 0,000; 0,0205 e 0,000 respectivamente). Os valores de acurácia seletiva obtidos para a sobrevivência e número de folhas foram muito altos e para o comprimento de raízes foi alto, permitindo que seja depositada confiança nos resultados observados. Para todas estas variáveis, o meio nutritivo WPM, com a concentração de sais reduzida à metade (WPM/2) apresentou-se superior aos demais (Tabela 2). A utilização de WPM/2 promoveu incrementos satisfatórios nas taxas de sobrevivência, comprimento de raízes e no número de folhas nas brotações, indicando que sua composição é adequada para o crescimento e desenvolvimento das brotações de *Peltophorum dubium* e que, provavelmente, a redução na concentração de sais do meio nutritivo e a manutenção da concentração original de sacarose, fonte de carbono, alterou a relação Carbono/Nitrogênio, favorecendo a rizogênese. Na micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) e framboeseira (*Rubus ideaus*), a utilização do meio nutritivo WPM na composição original de sais apresentou as melhores médias (no entanto, superiores àquelas obtidas em *Peltophorum dubium* no presente ensaio) para a porcentagem de formação de raízes (81,5%), número de raízes (3,39) e comprimento de raízes (1,47 cm) quando comparado ao meio nutritivo MS (com médias de 52,0%, 1,63 e 0,85 cm para as mesmas variáveis), após 30 dias de cultivo (LEITZKE *et al.*, 2009).

Esses resultados observados podem ser considerados satisfatórios nesta fase de cultivo *in vitro*, uma vez que é geralmente efetuada, na fase de enraizamento, uma redução na composição de sais e vitaminas do meio nutritivo quando comparada às demais fases do cultivo *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A utilização do meio WPM acarreta ainda, em redução nos custos, além de representar benefícios para a posterior aclimatização das plantas micropropagadas, já que, na fase de aclimatização, as condições ótimas de cultivo vão sendo alteradas, para que a planta passe por um processo de rustificação e possa sobreviver no ambiente *ex vitro*. Se as plantas enraizadas *in vitro* não forem devidamente rustificadas, a sua sobrevivência, sob condições *ex vitro*, será baixa,

principalmente pelo desenvolvimento inadequado de ceras cuticulares e baixa qualidade do sistema radicular (PUROHIT *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Médias de sobrevivência (%), comprimento de raízes (cm) e nº de folhas em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes meios nutritivos, independentemente da presença de ácido 3-indolbutírico - AIB, combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Meio	Sobrevivência (%)		Comprimento de raízes (cm)		Nº de folhas	
MS	16,55	c*	0,00	b	0,95	c
MS/2	34,80	c	0,11	b	2,55	c
WPM	53,05	b	0,09	b	5,15	b
WPM/2	86,50	a	0,38	a	7,70	a
Média	47,72		0,15		4,09	
AS**	0,97		0,84		0,97	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1-(1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para a formação de raízes houve interação entre os fatores meio nutritivo e concentração de AIB (p=0,0316). A acurácia seletiva estimada para a formação de raízes foi alta, o que indica que os resultados observados são confiáveis. Na ausência da auxina, os meios nutritivos avaliados não diferiram entre si (Tabela 3), e resultaram em porcentagens muito reduzidas de formação de raízes. Na presença de 10 µM AIB, o meio nutritivo que se mostrou superior em relação à formação de raízes foi o WPM/2, assim como também ocorreu em relação às variáveis anteriormente apresentadas. Adicionalmente, este foi o único meio nutritivo que diferiu quanto à utilização ou não de AIB, apresentando resultados promissores quanto à formação de raízes quando a auxina estava presente.

Em microestacas de carvalho (*Quercus* sp.) a utilização do meio nutritivo WPM/2 sem auxina também não induziu a formação de raízes. No entanto, a adição de 14,76 µM de AIB resultou em 66,7 % de enraizamento em *Q. glauca* e 77,8% em *Q. leucotrichophora*. Além disso, para as duas espécies o número médio (3,7 e 4,6 respectivamente) e o comprimento médio de raízes (3,8 e 3,6 cm) também foram

incrementados. Estes tratamentos, no entanto, também resultaram em formação de calos (PUROHIT *et al.*, 2002).

Tabela 3 – Formação média de raízes (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes meios nutritivos, independentemente da presença de ácido 3-indolbutírico - AIB, combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Meio nutritivo	AIB ( $\mu\text{M}$ )						Média (%)
	0		10				
MS	0,00	a*	A	0,00	b	A	0,00
MS/2	6,60	a	A	3,30	b	A	4,95
WPM	0,60	a	A	13,30	b	A	6,65
WPM/2	6,60	a	B	36,30	a	A	21,45
Média (%)	3,30		13,22				8,26
AS**	0,86						

\* médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS  $\geq 0,9$  = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e  $\leq 0,5$  = baixa.

Para a formação de calos, em *Peltophorum dubium*, não foi observado efeito significativo dos fatores principais meio nutritivo ( $p=0,5087$ ) e AIB ( $p=0,2008$ ), tampouco houve interação ( $p=0,8644$ ) entre estes fatores. Foi obtida uma média geral de apenas 2,9% de formação de calos na base das brotações, indicando que, independente do meio nutritivo utilizado e da presença ou ausência de AIB, a formação de calos, nessas condições, mantém-se baixa. Calos são massas de células não-organizadas, em crescimento desordenado e irregularmente diferenciados e, a sua presença na base das brotações, pode afetar negativamente a rizogênese (SCHMILDT *et al.*, 2010). Portanto, tratando-se da fase de enraizamento *in vitro* em um estudo cujo objetivo é a produção de mudas micropropagadas, o resultado observado pode ser considerado satisfatório, uma vez que raízes formadas a partir de calos, geralmente surgem pela rediferenciação das células do calo e raramente possuem conexões vasculares com a parte aérea, comprometendo, assim, o posterior desenvolvimento da muda.

### 3.3.4 Efeito do meio nutritivo WPM/2 com AIB na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Em todas as variáveis analisadas houve efeito significativo do fator principal concentração de AIB (Tabela 4), porém também foi observado efeito significativo do fator dias de cultivo sobre o comprimento das raízes, conforme será apresentado posteriormente. Por outro lado, não foi observada interação significativa entre os fatores estudados, o que demonstra que o emprego da auxina não é influenciado pelo período de cultivo *in vitro*. Foram obtidos valores muito altos ou altos de acurácia seletiva, indicando que a precisão do experimento foi adequada e que os resultados observados são confiáveis.

Para as variáveis formação de raízes ( $p=0,0031$ ), comprimento de raízes ( $p=0,0059$ ) e formação de raízes secundárias ( $p=0,0525$ ), a utilização de AIB no meio nutritivo, independentemente da concentração (10 ou 20  $\mu\text{M}$ ), foi superior quando comparada à ausência da auxina (Figura 5). Na ausência de auxina não ocorreu formação de raízes enquanto que, com a sua utilização, foram obtidas até 25,93% de brotações com raízes na menor concentração utilizada, indicando que a presença de AIB, nas condições do presente ensaio, é necessária para que ocorra a formação e o desenvolvimento *in vitro* de raízes em brotações de *Peltophorum dubium*, conforme foi evidenciado pelos incrementos no comprimento de raízes e pela presença de raízes secundárias com o aumento nas concentrações do regulador de crescimento. Os efeitos estimulantes do AIB sobre o desenvolvimento radicular podem ser devidos a vários fatores, como sua captação preferencial, transporte e estabilidade em relação a outras auxinas e subsequente ativação gênica (LUDWIG-MULLER, 2000).

Semelhantemente, no enraizamento *in vitro* de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana*) também não houve formação de raízes na ausência de AIB e a utilização de 9,8  $\mu\text{M}$  da auxina resultou nas maiores porcentagens de enraizamento observadas, independentemente do genótipo, sendo obtidos valores de 43,3% e 70,0%, comprimento de raízes variando de 2 a 3,5 cm e até 70% de brotações com raízes adventícias em um dos genótipos avaliados (ROCHA *et al.*, 2008). Em brotações de marmeleiro (*Cydonia oblonga*), a maior média de enraizamento

(24,15%) também foi obtida com a utilização de 10 µM de AIB, comparativamente à utilização das auxinas ANA e AIA nas mesmas concentrações, e com o comprimento das raízes chegando a 2,73 cm. No entanto, na ausência de suplementação com auxina, neste caso, foi obtido 0,14% de enraizamento, o que foi atribuído ao acúmulo de auxinas endógenas provenientes das folhas ou gemas. Tal acúmulo resulta em aumento na atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente, na formação de raízes (ERIG; SCHUCH, 2004).

Tabela 4 – Médias de formação de raízes (%), comprimento de raízes (cm), presença de raízes secundárias (%) e formação de calos (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, ao longo de 60 dias de cultivo, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0, 10 ou 20 µM) acrescidas ao meio e combinadas com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

AIB (µM)	Form. de raiz (%)	Comprim. raiz (cm)	Raízes sec. (%)	Calos (%)
0	0,00 b*	0,00 b	0,00 b	56,31 a
10	25,93 a	1,10 a	9,43 a	90,29 b
20	20,30 a	0,88 a	12,69 a	87,07 b
Média	15,67	0,67	7,42	78,02
AS**	0,92	0,91	0,83	0,87

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.



Figura 5 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, ao longo de 60 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM ('Wood Plant Medium') com a concentração de sais reduzida à metade (WPM/2), acrescido de diferentes concentrações de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 10 ou 20  $\mu\text{M}$ ) e combinados com 30mL de vermiculita. Em A) brotação com formação de calo na base, cultivada na ausência da auxina; em B) brotação com pequena formação de calo na base e emissão de raiz desprovida de raízes secundárias, cultivada em meio contendo 10  $\mu\text{M}$  de AIB; em C) brotação enraizada sem formação de calos e com presença de raízes secundárias, cultivada em meio contendo 10  $\mu\text{M}$  de AIB; e em D) brotação enraizada com intensa formação de calos na base e presença de raízes secundárias, cultivada em meio contendo 20  $\mu\text{M}$  de AIB. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

No que se refere à formação de calos na base das brotações, diferentemente do que foi observado para as demais variáveis avaliadas, a ausência de auxina no meio nutritivo foi a condição que proporcionou os melhores resultados, sendo obtidas porcentagens menores de calogênese nessa condição. No entanto, os valores obtidos ainda foram bastante elevados (superiores a 50%). No enraizamento *in vitro* de marmeleiro (*Cydonia oblonga*) a maior intensidade de calos também foi observada na presença de auxinas, em concentrações acima de 5  $\mu\text{M}$ , enquanto que, na sua ausência não ocorreu a formação destas estruturas, o que é mais desejável nesta fase do cultivo *in vitro*, já que a formação de calos na base das brotações pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular (ERIG; SCHUCH, 2004). Contudo, no enraizamento *in vitro* de jenipapeiro (*Genipa americana*) foi observada formação de calos na maior parte dos tratamentos testados e os mesmos pareceram não ter prejudicado a rizogênese, que atingiu valores de até 70% (ROCHA *et al.*, 2008). Em segmentos de caule de *Arabidopsis thaliana* tratados com AIB, a indução de raízes adventícias foi sempre precedida por formação de calo (o que não ocorreu na ausência de auxina) e as

raízes adventícias claramente surgiram a partir do câmbio, que, inicialmente, desdiferenciou-se para formar calo, seguido pela formação de raízes que, após alongadas e formadas zonas adicionais de calo, deram origem à formação de novas raízes adventícias (LUDWIG-MULLER *et al.*, 2005).

Para a variável comprimento de raízes houve, adicionalmente, efeito significativo do fator principal dias de cultivo ( $p=0,0297$ ,  $AS=0,89$ ). Nos primeiros 30 dias já havia ocorrido a emissão de raízes, com comprimento de até 0,38cm, mas foi necessário um período suplementar de 30 dias de cultivo para que ocorresse o desenvolvimento dessas raízes, as quais atingiram 1cm de comprimento, aos 60 dias. Em cultivares de bananeira (*Musa* spp) o comprimento de raízes também foi incrementado (atingindo até 6,0 cm) com o aumento da permanência no meio de cultivo, ao longo de 28 dias. No entanto, o número de raízes, no final do período de cultivo, diferiu somente daquele observado aos 7 dias de cultivo *in vitro*. Dessa forma, pode-se inferir, que após a fase de indução dos primórdios radiculares não há mais emissão de raízes, mas sim o seu crescimento e/ou alongamento (COSTA *et al.*, 2008). Raízes mais curtas, em geral, são mais adequadas por apresentarem-se em fase de crescimento ativo, facilitando a sobrevivência das mudas no momento da aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além disso, a maior permanência das plantas em meio nutritivo, a fim de desenvolver melhor o sistema radicular, pode proporcionar um rápido envelhecimento das raízes, tornando-as menos funcionais (COSTA *et al.*, 2008).

Em virtude desses aspectos e da maioria das características relacionadas à formação de raízes, exceto o comprimento de raízes, não ter apresentado diferença significativa aos 30 e 60 dias de cultivo, não é necessária a manutenção das brotações de *Peltophorum dubium* na fase de enraizamento por um período adicional de 30 dias. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados buscando otimizar a formação de raízes e determinar as melhores condições para a formação de um sistema radicular de qualidade em brotações de *Peltophorum dubium*.

### 3.3.5 Efeito de sacarose, AIB e ágar na rizogênese *in vitro* em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

No presente ensaio, as estimativas de acurácia seletiva, estatística utilizada no presente estudo para avaliar a precisão dos ensaios realizados, foram altas ou muito altas, tanto para as avaliações realizadas aos 30 como aos 60 dias permitindo que se deposite confiança nos resultados obtidos.

Em relação às avaliações efetuadas aos 30 dias de cultivo, para a variável sobrevivência houve efeito significativo do fator principal ausência ou presença de AIB ( $p=0,0074$ ) e, também, das interações duplas entre os fatores concentração de sacarose e ausência/presença de AIB ( $p=0,0196$ ) e, também, concentrações de sacarose e ausência/presença de ágar ( $p=0,0191$ ). Na ausência de AIB foram obtidas as melhores médias para a sobrevivência (98,11%), as quais diferiram em relação à utilização de 10  $\mu\text{M}$  da auxina (91%).

Na ausência de AIB, não houve diferenças significativas na sobrevivência em função das concentrações de sacarose (Tabela 5), enquanto que, com a utilização de 10  $\mu\text{M}$  da auxina, o acréscimo desta fonte de carboidratos no meio nutritivo, independentemente da concentração utilizada (15 ou 30g  $\text{L}^{-1}$ ), aumentou a sobrevivência das brotações comparada àquela observada na sua ausência. No entanto, na ausência de sacarose e de AIB foram obtidos 100% de sobrevivência, resultado significativamente superior àquele obtido na ausência de sacarose quando a auxina estava presente (Tabela 5). Este resultado indica que há necessidade de uma fonte externa de carboidratos para suprir o gasto energético das brotações nesta fase do cultivo *in vitro* quando a auxina é adicionada ao meio nutritivo.

Ainda em relação às concentrações de sacarose, a sobrevivência das brotações foi comprometida na sua ausência combinada à ausência simultânea de ágar; nessa condição o desempenho foi inferior comparado às demais concentrações de sacarose na ausência deste agente gelificante (Tabela 6). Na presença de 7g  $\text{L}^{-1}$  de ágar, independente da ausência ou presença, nas duas concentrações avaliadas (15 ou 30g  $\text{L}^{-1}$ ) de sacarose, não houve diferença significativa na sobrevivência das brotações. Isso pode ser decorrente do fato de que, no meio nutritivo sem ágar, a disponibilidade de nutrientes é maior do que quando o agente gelificante está presente, sendo necessário, também, um maior

suprimento de carboidratos. Esses resultados têm implicações no custo do meio nutritivo, uma vez que o emprego de sacarose, mesmo na concentração mínima testada ( $15\text{g L}^{-1}$ ), pode dispensar o uso de ágar sem prejuízo à sobrevivência das brotações de *Peltophorum dubium* na fase de enraizamento *in vitro*.

Tabela 5 – Sobrevivência média (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da interação entre concentrações de sacarose e de ácido 3-indolbutírico (AIB), independentemente da ausência ou presença de ágar (0 ou  $7\text{g L}^{-1}$ ), acrescidos ao meio e combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ )	AIB ( $\mu\text{M}$ )		Média (%)
	0	10	
0	100,00 a* A	83,00 b B	91,80
15	96,91 a A	96,60 a A	96,76
30	97,17 a A	94,33 a A	95,75
Média (%)	98,11	91,00	94,65
AS**		0,87	

\* médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS  $\geq 0,9$  = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e  $\leq 0,5$  = baixa.

Tabela 6 – Sobrevivência média (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo ('Wood Plant Medium' - WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da interação entre concentrações de sacarose e da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10 µM) adicionado ao meio e combinados com 30mL de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Ágar (g L <sup>-1</sup> )				Média (%)
	0		7		
0	85,83	b B	97,38	a A	91,80
15	100,00	a A	93,20	a A	96,76
30	94,33	a A	97,17	a A	95,75
Média (%)	93,20		96,11		94,65
AS**			0,87		

\* médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para a formação de raízes e a porcentagem de folhas senescentes houve efeito significativo das concentrações de sacarose (p=0,0058 e p=0,0383 respectivamente), sendo observadas respostas opostas para as duas variáveis (Tabela 7). Enquanto a maior porcentagem de formação de raízes ocorreu na ausência do carboidrato, a menor média de folhas com sinais de senescência foi observada na maior concentração testada de sacarose. A ausência de uma fonte de carbono externa pode ter estimulado as células a desenvolverem mecanismos para suprir suas necessidades nutricionais, culminando com a formação de raízes, que irão cumprir essa função. Por outro lado, a presença de uma fonte externa de carboidratos no meio inibiu a síntese de clorofila e, portanto, reduziu a capacidade fotossintética das brotações, aumentando o número de folhas senescentes.

Tabela 7 – Médias de porcentagem de formação raízes e de folhas com sinais de senescência em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de sacarose adicionadas ao meio e combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente da presença ou ausência de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) e de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10 µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Formação de raízes (%)		Folhas senescentes (%)	
0	37,04	a*	17,77	b
15	18,86	b	20,54	b
30	12,37	b	11,49	a
Média (%)	23,13		16,45	
AS**	0,90		0,84	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1-(1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para a variável número de raízes foi observado efeito significativo, também, do fator ausência ou presença de AIB (p=0,0060), sendo que a utilização de 10 µM de AIB resultou em maior média de rizogênese (Tabela 8) (Figura 6), apesar do número de raízes formadas ainda ter sido baixo.

Igualmente, para a formação de calos e para o número de folhas por explante houve efeito significativo do fator principal ausência ou presença de AIB (com valores de p=0,041 e 0,0129 respectivamente). Para ambas as variáveis, a ausência da auxina foi superior, acarretando em menores porcentagens de formação de calos (Figura 6) e maior número de folhas por explante (Tabela 8). Com o acréscimo da auxina no meio nutritivo, o balanço hormonal das células foi alterado de maneira que a interação da auxina com os níveis endógenos de citocininas culminou com a formação de calos e comprometeu o desenvolvimento, também, da parte aérea. A formação tanto de raízes, como de parte aérea e calos é regulada pela interação destas duas classes de reguladores de crescimento, sendo que, quando as auxinas estão presentes em igual ou maior proporção do que as citocininas desencadeiam a formação de calos e de raízes respectivamente, conforme preconiza a teoria do balanço hormonal (SKOOG; MILLER, 1957).

Ainda para o número de folhas por explante foi observado efeito significativo do fator ausência ou presença de ágar ( $p=0,0136$ ). Na ausência de ágar foram obtidas 4,38 folhas por explante enquanto que, na sua presença, essa média foi inferior (3,81 folhas por explante), indicando que a presença do agente gelificante no meio nutritivo pode ter interferido na disponibilidade de água, nutrientes e, até mesmo, de hormônios para as brotações.

Tabela 8 – Médias de número de raízes, formação de calos (%) e número de folhas por explante em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico (AIB) combinadas a 30mL de vermiculita no meio, independentemente das concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

AIB (µM)	Nº de raízes		Calos (%)		Nº folhas por explante	
0	0,36	b	55,22	a	4,37	a
10	1,04	a	79,23	b	3,80	b
Média	0,69		66,88		4,09	
AS**	0,94		0,94		0,92	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para o comprimento de raízes e presença de raízes secundárias não foi observado efeito significativo de nenhum dos fatores testados, tampouco houve interação entre os fatores. Foi observado um comprimento médio das raízes formadas de 0,70cm e presença de raízes secundárias em apenas 8,48% das brotações. Resultados obtidos em outros experimentos (dados não apresentados) sugerem que, talvez, seja necessário um período maior que o de 30 dias de cultivo, para que ocorra o desenvolvimento das raízes e a emissão de raízes secundárias.

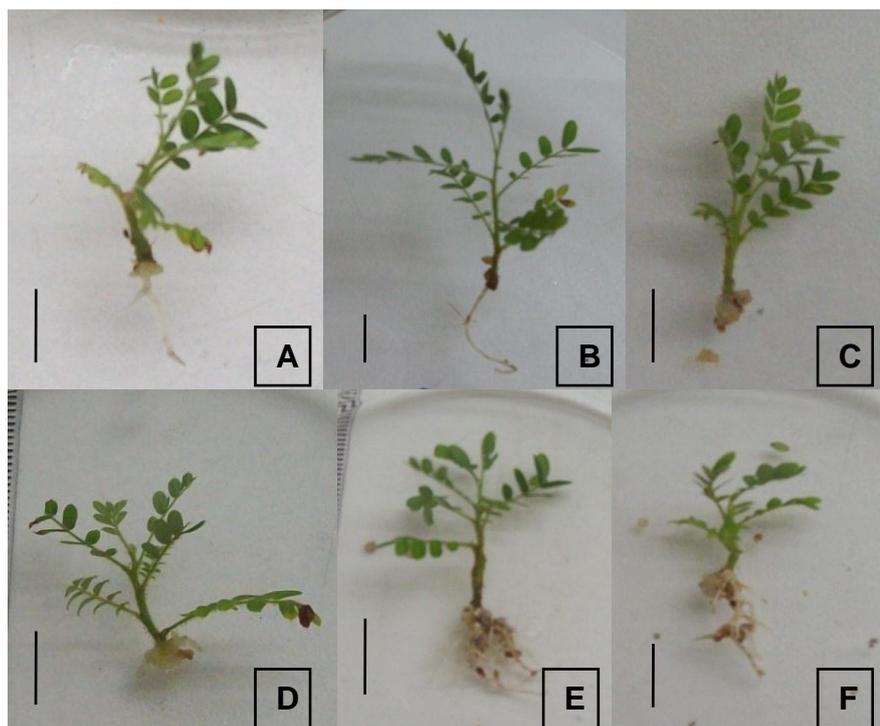


Figura 6 – Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo ('Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2). Em A) brotação cultivada em meio sem adição de ácido 3-indolbutírico - AIB, sacarose ou ágar; em B) brotação cultivada em meio sem adição de AIB e de sacarose, com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar; em C) brotação cultivada em meio sem adição de AIB, mas com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, na ausência de ágar; em D) brotação cultivada em meio com 10 μM de AIB, sem adição de sacarose e de ágar; em E) brotação cultivada em meio com 10 μM de AIB, sem adição de sacarose e com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar; e em F) brotação cultivada em meio com 10 μM de AIB, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Por ocasião das avaliações realizadas aos 60 dias de cultivo, para as variáveis sobrevivência, formação de calos e número de folhas por explante houve efeito significativo do fator principal ausência ou presença de AIB (com valores de "p" iguais a 0,0393; 0,000 e 0,0028 respectivamente), sendo que a ausência do fitorregulador foi mais favorável para todas as variáveis-resposta avaliadas (Tabela 9), semelhantemente ao que foi observado aos 30 dias de cultivo, resultando em mais de 90,0% de sobrevivência das brotações e mais de 4 folhas por brotação. A formação de calos ainda ocorreu, no entanto, parece não ter comprometido o desenvolvimento das brotações, de maneira semelhante ao que foi observado na micropropagação de *Arabidopsis thaliana*, em que concentrações de AIB até 10μM

induziram à formação de raízes adventícias (em até 95% das brotações), sempre precedidas pela formação de calos, os quais não comprometeram a rizogênese. No entanto, na ausência da auxina estas estruturas não foram visíveis, bem como não houve formação de raízes (LUDWIG-MULLER *et al.*, 2005).

Tabela 9 – Médias de sobrevivência (%), formação de calos (%) e número de folhas por explante em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico (AIB) combinadas a 30mL de vermiculita no meio, independentemente das concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

AIB (µM)	Sobrevivência (%)	Calos (%)	Nº folhas/explante
0	90,67 a*	33,94 a	4,57 a
10	75,29 b	65,41 b	3,31 b
Média (%)	83,20	49,23	3,96
AS**	0,88	0,97	0,95

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para a formação de raízes e a presença de raízes secundárias em *Peltophorum dubium* houve efeito significativo do fator principal ausência ou presença de ágar (com valores de "p" iguais a 0,0254 e 0,0071 respectivamente) (Tabela 10), sendo que a presença do agente geleificante foi favorável para essas variáveis, as quais apresentaram médias mais satisfatórias e superiores àquelas observadas por ocasião da avaliação realizada aos 30 dias de cultivo. Houve formação de raízes em mais de 40% das brotações e, aproximadamente, metade delas tinham raízes secundárias presentes. No entanto, para o número de raízes não houve efeito significativo de nenhum dos fatores testados, sendo obtida uma média geral de 1,04 raízes por brotação, a qual ainda não pode ser considerada satisfatória. Para ilustrar, em mamoeiro (*Caryca papaya*), o número médio de raízes foi muito próximo nas concentrações 0, 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com valores de 3,35; 2,87 e 2,75 raízes por brotação aos 35 dias de cultivo em meio nutritivo MS

(SCHMILDT *et al.*, 2007). As diferenças na capacidade de formar raízes adventícias têm sido atribuídas às diferenças no metabolismo da auxina, que envolvem a conjugação do AIB e seus inibidores, além de diferenças no transporte e absorção da auxina (LUDWIG-MULLER *et al.*, 2005).

Tabela 10 – Médias de porcentagem de formação de raízes e de raízes secundárias em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) acrescido ao meio nutritivo, combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente das concentrações de sacarose (0, 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Ágar (g L <sup>-1</sup> )	Formação de Raízes (%)		Raízes Secundárias (%)	
0	28,30	b*	12,26	b
7	44,43	a	27,40	a
Média (%)	36,36		19,80	
AS**	0,90		0,96	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Ainda no que diz respeito à formação de raízes secundárias (%), houve efeito significativo, também, das concentrações de sacarose (p= 0,000), assim como ocorreu para a porcentagem de folhas com sinais de senescência (p=0,0630) (Tabela 11). A emissão de raízes secundárias ocorreu de maneira mais satisfatória na ausência de sacarose no meio nutritivo. No entanto, essa condição também foi a mais favorável para a presença de folhas com senescência. Na micropropagação de mamoeiro (*Caryca papaya*), na ausência de sacarose, as folhas das brotações, também, apresentaram-se aclorofiladas evidenciando a necessidade da adição de sacarose no meio de cultivo *in vitro* na fase de enraizamento (SCHMILDT *et al.*, 2007). Isso ocorre, em geral, porque a formação de raízes requer energia, oriunda da fotossíntese ou de outra fonte. Uma fonte exógena de carboidratos é, na maioria das vezes, indispensável à rizogênese *in vitro*, sendo que adições de sacarose no

meio nutritivo em concentrações inferiores a 20 g L<sup>-1</sup> podem causar clorose generalizada na cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Um maior conteúdo de sacarose no meio nutritivo corresponde à maior concentração de carboidratos (ou de reservas) no tecido foliar. Em consequência, as folhas têm capacidade de permanecer mais tempo na planta (CALVETE *et al.*, 2002).

Tabela 11 – Médias de porcentagem de formação de raízes secundárias e de folhas com sinais de senescência em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de sacarose acrescidas ao meio, combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente da ausência ou presença ou de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico - AIB (0 ou 10 µM). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Raízes Secundárias (%)		Folhas com Senescência (%)	
0	38,36	a*	22,88	b
15	11,00	b	23,63	b
30	8,25	b	14,22	a
Média (%)	19,80		20,14	
AS**	0,96		0,81	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1 / Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para a o comprimento de raízes houve interação (p= 0,0061) entre os fatores ausência ou presença de AIB e as concentrações de sacarose (Tabela 12), sendo que o melhor resultado foi obtido na ausência de sacarose e de AIB, com raízes apresentando comprimento superior a 3 cm. Esse valor é próximo daquele que vem sendo obtido, por exemplo, no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus pumila*) também em meios nutritivo MS/2 combinado com vermiculita (com raízes medindo 3,4 cm), acrescido de sacarose e 1 mg L<sup>-1</sup> de AIA. No entanto, foi inferior àquele observado no mesmo estudo, no mesmo meio nutritivo acrescido de ágar (5,7 cm). Embora as raízes formadas na presença de ágar tenham sido maiores, estavam desprovidas de pelos absorventes, sendo ineficientes após o

transplante para um suporte aerado, causando perda de vigor das plantas em casa de vegetação (VIEIRA *et al.*, 2007). No enraizamento *in vitro* de morangueiro (*Fragaria x ananassa*), em meio MS desprovido de auxina, níveis crescentes de sacarose resultaram em aumento da biomassa radicular, provavelmente em decorrência de maior número e comprimento de raízes, sendo que, na ausência da fonte externa de carboidrato, não houve formação de raízes (CALVETE *et al.*, 2002), indicando que as plantas, a depender tanto do genótipo como da espécie, quando cultivadas *in vitro*, requerem suprimentos energéticos e de fitorreguladores diferenciados durante a fase de enraizamento.

Tabela 12 – Comprimento médio de raízes (cm) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função das concentrações de sacarose, acrescidas ao meio, combinadas com 30mL de vermiculita, independentemente da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>) e em função da presença ou ausência de ácido 3-indolbutírico (0 ou 10µM de AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	0 µM de AIB			10 µM de AIB			Média (cm)
0	3,78	a*	A	0,81	b	B	2,36
15	1,11	b	A	3,00	a	A	2,01
30	1,66	b	A	0,41	b	A	1,03
Média (cm)	2,26			1,31			1,8
AS**				0,9			

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1-(1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

De maneira geral, analisando-se os resultados obtidos por ocasião das duas avaliações realizadas durante a fase de enraizamento *in vitro* de *Peltophorum dubium*, os resultados obtidos até os 30 dias de cultivo já podem ser considerados satisfatórios e indicaram, inicialmente, que a utilização de AIB e de sacarose é dispensável para a formação de raízes *in vitro* em *Peltophorum dubium* quando se utiliza o meio nutritivo WPM/2 combinado com vermiculita e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Aos 60 dias, esses resultados se confirmaram, uma vez que, em ambas as avaliações,

nessa condição, a sobrevivência das brotações foi satisfatória, as porcentagens de formação de raízes foram incrementadas em relação ao que vinha sendo obtido em ensaios anteriores e as demais variáveis indicaram que há desenvolvimento das brotações. As porcentagens de formação de calos foram bastante elevadas; no entanto, essas estruturas parecem não ter prejudicado o desenvolvimento das mudas micropropagadas já que, na sua maioria, precederam a formação de raízes. Aos 30 dias foram observadas baixas porcentagens de brotações enraizadas com presença de raízes secundárias, as quais são de extrema importância para que se obtenha sucesso no enraizamento. No entanto, aos 60 dias os resultados obtidos para essa variável foram mais promissores e pelo que se pôde observar estiveram associados a plantas com parte aérea mais vigorosa.

O fato do uso da sacarose ser dispensável nessa fase de cultivo, sem prejuízo à qualidade do sistema radicular formado, é bastante promissor, uma vez que a eliminação da sacarose no meio nutritivo, além de reduzir os riscos de contaminação microbiana, também melhora as características fisiológicas das plantas (DAMIANI; SCHUCH, 2009). Além disso, a transição do meio heterotrófico para o autotrófico é uma das etapas mais críticas na micropropagação da maioria das espécies vegetais e, as altas taxas de sobrevivência, obtidas em plantas aclimatizadas, dependem do correto tratamento providenciado durante o processo da transição das plantas da condição *in vitro* para *ex vitro* (CALVETE *et al.*, 2002), o qual inclui a redução nos sais dos meios nutritivos e da fonte externa de carbono.

De acordo com a capacidade fotossintética, as plantas cultivadas em meio asséptico são agrupadas em duas classes. Na primeira, estão as plantas heterotróficas ou mixotróficas, nas quais são classificadas as plantas cujas folhas formadas não desenvolvem capacidade fotossintética se crescerem em meio contendo sacarose. Na segunda, encontram-se àquelas plantas adaptadas a condições autotróficas *in vitro* e que, apesar das condições artificiais de cultivo, podem apresentar uma significativa taxa fotossintética (GROUT, 1988), o que parece ser o caso de *Peltophorum dubium*. No entanto, estudos adicionais e mais aprofundados devem ser realizados para comprovar a capacidade fotossintética das mudas micropropagadas de *Peltophorum dubium*, pois mesmo quando a sacarose não foi adicionada ao meio nutritivo houve a formação de raízes, o que requer energia que oriunda da fotossíntese, haja vista que não havia carbono exógeno.

### 3.3.6 Aclimatização *in vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* enraizadas em meio nutritivo contendo diferentes concentrações de sacarose, AIB e ágar

Para todas as variáveis avaliadas (sobrevivência, número de folhas e número de folhas senescentes) houve efeito significativo para ambos os fatores isolados, tratamentos, dos quais as brotações foram originárias (com valores de “p”= 0, 000; 0,000 e 0,0149 respectivamente) e dias de cultivo (todos com valores de “p”= 0, 000). Foram obtidos valores muito altos ou altos de acurácia seletiva (0,96; 0,95 e 0,74), permitindo que se deposite confiança nos resultados observados.

O tratamento que apresentou os melhores resultados, para todas as variáveis avaliadas foi aquele em que a auxina e a sacarose estavam ausentes, sendo utilizado somente o agente geleificante no meio nutritivo combinado com vermiculita (Tabela 13 – tratamento nº2), ratificando os resultados obtidos na fase de enraizamento *in vitro*. Neste tratamento foram obtidas a maior porcentagem de sobrevivência (acima de 70%) aliada ao maior número de folhas (superior a 5 folhas por brotação) e à menor porcentagem de senescência foliar (inferior a 20%). Nos tratamentos em que a auxina esteve presente, de maneira geral, foram obtidas as menores porcentagens de sobrevivência, as quais diferiram significativamente dos tratamentos em que não foi utilizado AIB, além do número de folhas ser mais reduzido. No entanto, em alguns casos, para a porcentagem de folhas com senescência, estes tratamentos não diferiram do tratamento 2, que combinou os melhores resultados para todas as variáveis.

Tabela 13 – Médias de porcentagem de sobrevivência, número de folhas e porcentagem de folhas com sinais de senescência em mudas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert oriundas da fase de enraizamento *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), em função dos tratamentos que consistiram de combinações entre ausência ou presença de ácido indolbutírico (AIB), diferentes concentrações de sacarose (Sac) e da ausência ou presença de ágar, após 56 dias de aclimatização *in vitro* em mistura de substrato McPlant®, Classe "F" (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita) e Vermiculita (1:1, v/v). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Trat.	AIB ( $\mu\text{M}$ )	Sac ( $\text{g L}^{-1}$ )	Ágar ( $\text{g L}^{-1}$ )	Sobreviv (%)	Nº folhas	Senescência (%)
1	0	0	0	59,37 b	4,80 a	24,18 b
2	0	0	7	77,70 a	5,18 a	18,37 a
3	0	15	0	87,50 a	5,00 a	28,44 b
4	0	15	7	57,50 b	3,70 b	25,26 b
5	0	30	0	79,17 a	4,08 b	31,2 b
6	0	30	7	75,00 a	4,09 b	32,73 b
7	10	0	0	9,37 d	1,06 c	22,08 a
8	10	0	7	37,50 c	2,21 c	17,16 a
9	10	15	0	25,00 d	1,17 c	16,12 a
10	10	15	7	48,00 c	3,32 b	29,81 b
12	10	30	7	56,25 b	3,03 b	20,37 a
Média				58,6	3,67	23,6
AS				0,96	0,95	0,74

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS  $\geq 0,9$  = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e  $\leq 0,5$  = baixa.

Em relação aos dias de cultivo, para todas as variáveis, foi observado decréscimo ao longo do período de aclimatização (Figura 7). Para a sobrevivência e a porcentagem de folhas com sinais de senescência foi observado um comportamento linear decrescente em que, no final do período de aclimatização, em torno de 50% das mudas micropropagadas sobreviveram e não mais apresentaram folhas com sinais de senescência. Esse resultado permite inferir que, aquelas folhas senescentes no início do período de aclimatização, já haviam caído e foram, gradualmente, sendo substituídas por folhas novas, já que o número de folhas mostrou-se mais estável a partir dos 30 dias de aclimatização e com uma leve tendência a aumentar. Permite inferir ainda que, provavelmente, as plantas que

sobreviveram, foram somente àquelas em que estavam presentes raízes secundárias na fase de enraizamento *in vitro*, já que estas estruturas é que são responsáveis pela captação de água e nutrientes para a sustentação da planta.

Essa diminuição na sobrevivência das plantas é bastante frequente nessa fase do cultivo, pois a sobrevivência da planta, seu crescimento e sua produtividade estão intimamente associados ao ambiente aéreo, por meio de processos como a troca de energia, perda de vapor de água na transpiração e absorção de dióxido de carbono na fotossíntese (PUROHIT *et al.*, 2002). A taxa de trocas de vapor de água é bastante alterada na transição das plantas da condição *in vitro* para a aclimatização (Figura 8) e isso afeta a disponibilidade de energia e transpiração das folhas e, conseqüentemente, a fisiologia da planta inteira.

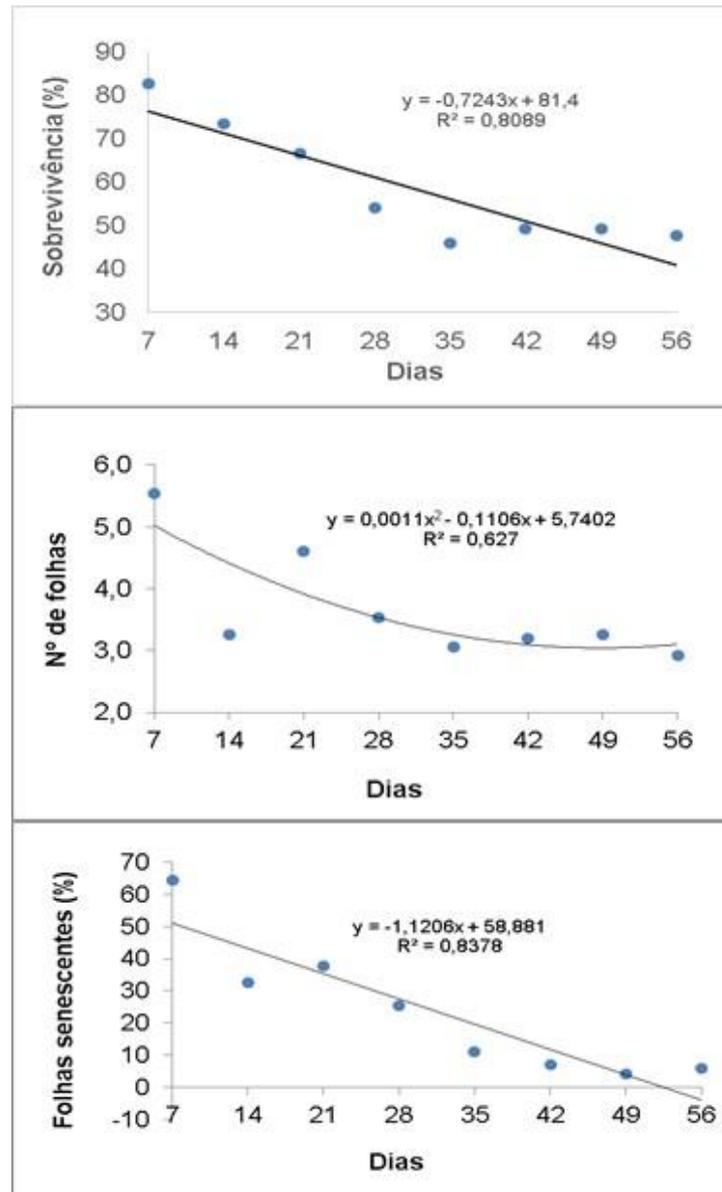


Figura 7 – Médias de sobrevivência (%), número de folhas e porcentagem de folhas com senescência em mudas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert em função dos dias de cultivo, enraizadas independentemente da ausência ou presença de ácido indolbutírico (AIB), de diferentes concentrações de sacarose (0, 15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e da ausência ou presença de ágar (0 ou 7 g L<sup>-1</sup>), em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2), combinado com 30mL de vermiculita, durante a fase de aclimatização *in vitro* em copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 180mL contendo uma mistura de substrato McPlant®, Classe "F" (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita) e Vermiculita (1:1, v/v). Santa Maria, RS, UFSM, 2012.



Figura 8 – Mudanças de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. Em A) ambiente de enraizamento *in vitro*, em meio nutritivo na ausência ou presença de ácido 3-indolbutírico (0 ou 10  $\mu\text{M}$  AIB), com diferentes concentrações de sacarose (0, 15 ou 30  $\text{g L}^{-1}$ ) e na ausência ou presença de ágar (0 ou 7  $\text{g L}^{-1}$ ), durante a fase de aclimatização *in vitro* (sala de cultivo); em B) após 56 dias de aclimatização *in vitro* em copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 180mL contendo uma mistura de substrato McPlant®, Classe “F” (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita) e Vermiculita (1:1, v/v). Barra = 2 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

### 3.4 Conclusões

- A utilização de AIB, nas concentrações 0, 5, 10 ou 20  $\mu\text{M}$ , não é eficiente na indução ao enraizamento adventício em brotações de *Peltophorum dubium* quando é utilizado o meio nutritivo MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de vermiculita.
- Brotações não enraizadas *in vitro* ou com sistema radicular desprovido de raízes secundárias não são capazes de enraizar e sobreviver durante o período de aclimatização *in vitro*.
- A utilização do meio nutritivo WPM reduzido à metade da sua concentração de sais (WPM/2), combinado com 30 g L<sup>-1</sup> de vermiculita, possibilita que ocorra a formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* mesmo sem a utilização de auxina exógena. No entanto, na presença de AIB, ocorre maior formação de raízes e a presença de raízes secundárias.
- O uso de sacarose e de AIB é dispensável e resulta em melhor qualidade do sistema radicular em *Peltophorum dubium* quando é utilizado o meio nutritivo WPM reduzido à metade da sua concentração de sais (WPM/2), combinado com 30 g L<sup>-1</sup> de vermiculita e na presença de 7 g L<sup>-1</sup> de ágar.
- Mudanças micropropagadas com sistema radicular bem desenvolvido, que apresentam resultados superiores durante a fase de enraizamento *in vitro*, também mostram-se superiores durante a fase de aclimatização *in vitro*, apresentando porcentagens de sobrevivência e nº de folhas satisfatórios.



## 4 CAPÍTULO II

### MINIESTAQUIA EM *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

#### 4.1 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a rizogênese em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, coletadas em diferentes épocas e submetidas à aplicação de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB), bem como avaliar o desenvolvimento das mudas produzidas via miniestaquia durante a aclimatização em casa de vegetação.

#### 4.2 Material e Métodos

##### 4.2.1 Miniestaquia em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert a partir de propágulos juvenis

Para a realização deste experimento, as seguintes definições foram adotadas e adaptadas de Xavier *et al.* (2009):

- Miniestaquia: utilização de brotações de mudas decepadas (obtidas a partir de sementes) como fonte de propágulos para a produção de mudas.
- Minicepa: muda oriunda de semente, que recebeu a poda do ápice em torno de 10 cm acima do coleto e que, em intervalos variáveis, emitiu brotações que foram coletadas para o enraizamento.
- Miniestaca: brotação da minicepa coletada e preparada para apresentar um tamanho entre 3 e 10 cm, contendo um par de folhas reduzidas à metade, para enraizamento em casa de vegetação.

- Minijardim clonal: conjunto de minicepas, acondicionadas em vasos flexíveis em casa de vegetação de polietileno, das quais foram coletadas as miniestacas para o processo de miniestaquia.

Para a formação do minijardim clonal, mudas de *Peltophorum dubium* foram produzidas a partir de sementes oriundas de um lote da produção de 2010, adquirido na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa em Florestas (FEPAGRO FLORESTAS), localizado no distrito de Boca do Monte, em Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Para a superação de dormência, as sementes passaram por escarificação mecânica do tegumento com lixa nº 100 na região oposta ao embrião. Em seguida, foram colocadas para germinar, em casa de vegetação, em vasos flexíveis com capacidade para 4L, contendo uma mistura de substrato composta por McPlant Misto® - Classe "A" (casca de pinus, corretivo de acidez e fertilizantes minerais) e Carolina Soil® (turfa, vermiculita, calcário, NPK e casca de arroz) na proporção 1:1 (v/v). Após 30 dias, quando as mudas já estavam com, aproximadamente, 20 cm de altura e contendo 3 a 4 pares de folhas, foi feita uma aplicação de 100mL de solução de NPK (5-20-20) a  $1,5\text{g L}^{-1}$  em cada vaso, que continha de 3 a 5 mudas (Figura 9 – A). Posteriormente, quando as mudas estavam com 45 dias, foram decepadas a uma altura de, aproximadamente, 10 cm, mantendo-se apenas 1 a 2 pares de folhas, para constituírem as minicepas (Figura 9 – B). Diariamente, as minicepas receberam irrigações para manter o seu turgor hídrico e toda a semana receberam uma aplicação de 100mL de solução de NPK (5-20-20) a  $1,5\text{g L}^{-1}$  em cada vaso, que continha de 3 a 5 mudas, para manter-se o 'status' nutricional das minicepas.

Após, aproximadamente, 50 dias da data da decepta das mudas, a maioria já havia emitido brotações (Figura 9 – C), permitindo a realização das coletas para os experimentos de miniestaquia, a seguir descritos.

#### 4.2.2 Enraizamento de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x3, em que o fator "A" consistiu das concentrações de AIB (0;

1000; 2000 ou 4000mg L<sup>-1</sup>) e o fator “B”, do período das avaliações (30; 60 ou 90 dias), totalizando 12 tratamentos.

As miniestacas foram confeccionadas a partir da parte apical de brotações de minicepas em casa de vegetação (Figura 9 – D), contendo, aproximadamente, 7 a 10 cm e um par de folhas cortadas ao meio (Figura 9 – E). Durante o período da coleta até o momento de serem colocadas para enraizar em substrato, as miniestacas foram acondicionadas em caixa de isopor contendo água para evitar que murchassem.

Em seguida, as miniestacas foram imersas em solução hidroalcoólica (50% etanol e 50% de água destilada, v/v) contendo AIB, conforme o tratamento, por 10 s (Figura 9 – F). As miniestacas foram postas para enraizar em bandejas plásticas pretas com dimensões de 20x40x60cm, contendo uma camada de 10cm de substrato (Figura 9 – G). O substrato utilizado para enraizamento foi uma mistura de McPlant Misto® Classe “F” (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita), areia e vermiculita extra fina na proporção 2:1:1 (v/v/v).

Para cada tratamento foi utilizada uma bandeja devidamente identificada e contendo 25 miniestacas cada. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização e temperatura controlada (UR 80% e 25°C) (Figura 9 – H).

Decorridos 30, 60 ou 90 dias, as miniestacas foram avaliadas quanto à sobrevivência (%), formação de raízes (%), número de raízes, comprimento médio de raízes (cm), presença de raízes secundárias (%), formação de calos na base das miniestacas (%) e número de folhas (Figura 9 – I).

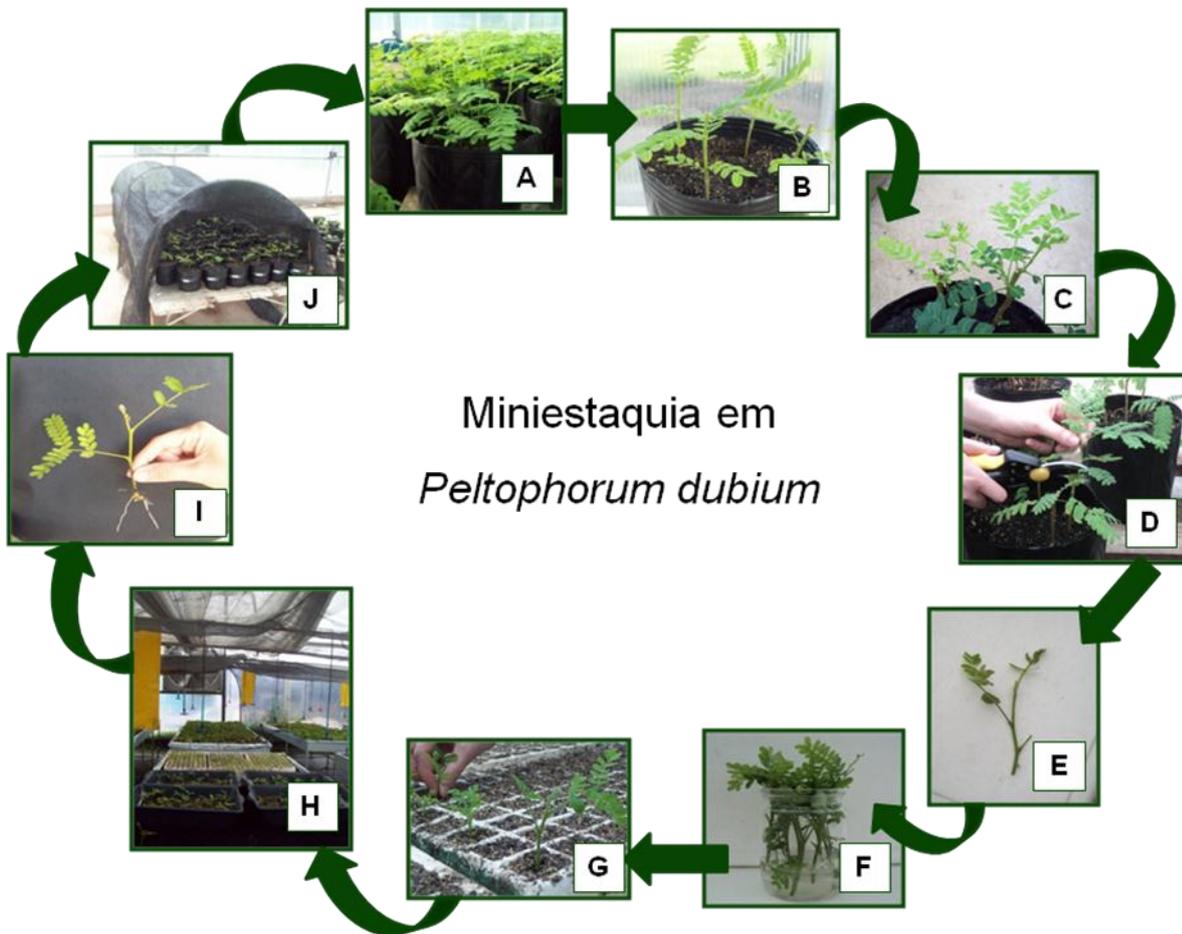


Figura 9 – Miniestquia em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. Em A) Mudas produzidas, a partir de sementes, com 45 dias; em B) Mudas decepadas para constituir as minicepas; em C) Minicepas emitindo novas brotações; em D) Coletas de brotações para confeccionar as miniestacas; em E) Miniestaca com 3-10cm e, pelo menos, um par de folhas cortadas ao meio; em F) Imersão das miniestacas em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada; v/v) de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 1000; 2000 ou 4000mg L<sup>-1</sup>); em G) Miniestacas postas para enraizar em bandejas contendo mistura de McPlant Misto® Classe “F” (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita), areia e vermiculita extra fina na proporção 2:1:1 (v/v/v); H) Bandejas contendo as miniestacas em casa de vegetação com nebulização; I) Miniestaca enraizada; e J) Aclimatização das mudas produzidas por miniestquia em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

#### 4.2.3 Formação de raízes em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após sucessivas coletas

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo trifatorial 4x2x3, em que o fator “A” consistiu da concentração de AIB (0; 1000; 2000 ou 4000mg L<sup>-1</sup>); o fator “B”, do período das avaliações (30 ou 60 dias) e o fator “C” das coletas (Coleta 1: 09/05/12 - outono; Coleta 2: 18/06/12 - outono e Coleta 3: 07/08/12 - inverno), totalizando 24 tratamentos. As miniestacas foram confeccionadas a partir da porção apical de brotações de minicepas que estavam em desenvolvimento em casa de vegetação, e que continham, aproximadamente, 3 a 7 cm e um par de folhas cortadas ao meio. Durante o período da coleta até o momento em que foram colocadas para enraizar em substrato, as miniestacas foram acondicionadas em caixa de isopor contendo água para evitar que murchassem.

Em seguida, as miniestacas foram imersas em solução hidroalcoólica (50% etanol e 50% água destilada; v/v) contendo AIB, conforme o tratamento, por 10s. As miniestacas foram postas para enraizar em bandejas plásticas pretas com dimensões de aproximadamente 20x40x60cm (Coletas 1 e 3) e em bandejas de isopor contendo 128 células individuais com dimensões de, aproximadamente, 5x5x5cm (Coleta 2). O substrato utilizado para enraizamento foi uma mistura de McPlant Misto® Classe “F” (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita), areia e vermiculita extra fina na proporção 2:1:2 (v/v/v). Para cada tratamento foi utilizada uma bandeja devidamente identificada e contendo 25 (Coleta 1) ou 45 (Coletas 2 e 3) miniestacas cada, sendo dispostas de maneira intercalada nas bandejas. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização e temperatura controlada (UR 80 % e 25 °C).

Decorridos 30 e, depois, 60 dias, as miniestacas foram avaliadas quanto à sobrevivência (%), formação de raízes (%), número de raízes, comprimento médio de raízes (cm), presença de raízes secundárias (%), formação de calos na base das miniestacas (%) e número de folhas.

#### 4.2.4 Produtividade do minijardim clonal

Para o controle da produtividade do minijardim clonal (Figura 10 – A), foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema unifatorial, em que os tratamentos consistiram das 6 coletas de miniestacas realizadas no período de 09/05/2012 a 19/12/2012. Cada vaso, contendo as minicepas, foi numerado (de 1 a 50) e, em cada coleta de brotações (Figura 10 – B), foi registrada a data da coleta, período entre coletas e foi avaliado o número de miniestacas coletadas por minicepa em cada vaso. O intervalo entre coletas foi variável, pois, em alguns casos, a emissão de brotações (Figura 10 – C) levou um período maior para ocorrer e, conseqüentemente, o tempo para que as brotações atingissem o tamanho desejado (3 a 7 cm), foi maior.

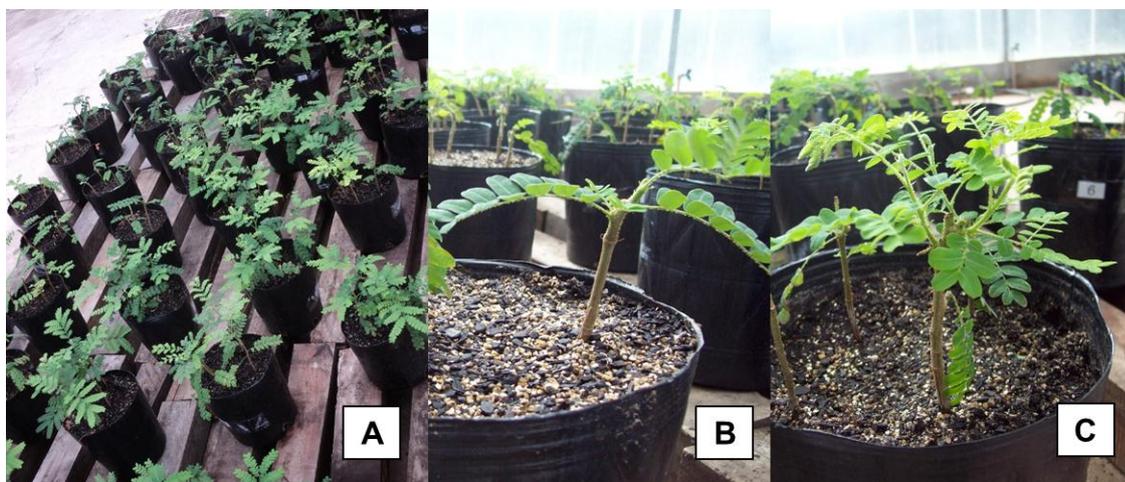


Figura 10 – A) Minicepas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, com aproximadamente 5 meses; B) Detalhe de uma minicepa após a 2ª coleta de brotações, efetuada em 18/06/12 e C) Detalhe de uma minicepa com a emissão de novas brotações, aproximadamente 30 dias após a coleta. Santa Maria, UFSM, 2012.

#### 4.2.5 Aclimatização de mudas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert produzidas via miniestaquia

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo trifatorial 4x3x3, em que o fator “A” consistiu das concentrações de AIB (0; 1000; 2000 ou 4000 mg L<sup>-1</sup>) utilizadas durante o período de formação de raízes nas miniestacas; o fator “B”, do período das avaliações (30, 60 ou 90 dias) e o fator “C”, das coletas das quais as miniestacas foram oriundas (Coleta 1: 09/05/12; Coleta 2: 18/06/12 e Coleta 3: 07/08/12), totalizando 36 tratamentos.

Foram utilizadas mudas de *Peltophorum dubium* produzidas a partir de miniestacas que foram enraizadas após imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 1000; 2000 ou 4000 mg L<sup>-1</sup>) e acondicionadas em bandejas contendo mistura de McPlant Misto® Classe “F” (composto de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais e vermiculita), areia e vermiculita extra fina na proporção 2:1:1 (v/v/v) por períodos de 90 (Coleta 1) ou 60 dias (Coletas 2 e 3). As mudas foram transferidas para vasos flexíveis com capacidade para 1L, contendo substrato composto pela mesma mistura descrita anteriormente, na fase de formação de raízes. Os vasos foram acondicionados em casa de vegetação e cobertos com sombrite por sete dias (Figura 11 - A), recebendo regas diárias, para manter o turgor hídrico das plantas, e reposição de substrato quando necessário.

Decorridos 30, 60 e 90 dias, as mudas (Figura 11 – B) foram avaliadas quanto à sobrevivência (%), número de folhas, altura (cm) e diâmetro do colo (mm). Para as medições de altura e diâmetro foram utilizadas régua e paquímetro digital.



Figura 11 – Aclimatização de mudas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert produzidas via miniestaquia, após permanência por 60 dias ou 90 dias na fase de formação de raízes. Em A) Fase inicial da aclimatização (aos 7 dias) em casa de vegetação sob sombrite; em B) Mudas após a retirada do sombrite, aproximadamente aos 30 dias após aclimatização. Santa Maria, UFSM, 2012.

#### 4.2.6 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 variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função  $\sqrt{x+0,5}$ , sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi realizado teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro para os tratamentos qualitativos e análise de regressão polinomial, para os quantitativos. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000). A precisão do experimento foi medida através da acurácia seletiva (AS) calculada por  $\sqrt{1-1/F_{cal}}$ , que corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos.

### 4.3 Resultados e discussões

#### 4.3.1 Enraizamento de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Para todas as variáveis avaliadas, os valores da acurácia seletiva (AS), estatística que mede a precisão do experimento, foram altos ou muito altos, indicando que os dados obtidos são confiáveis.

Para a variável sobrevivência houve efeito significativo apenas das concentrações de AIB testadas ( $p=0,0006$ ; AS= 0,92), sendo observado um ajuste linear decrescente (Figura 12 - A). A maior sobrevivência foi observada quando a auxina não foi utilizada na base das miniestacas, decrescendo em sua presença, à medida que aumentaram suas concentrações, provavelmente em decorrência do excesso da auxina. Há relatos de que a aplicação exógena de auxina pode ter efeito fitotóxico em ramos juvenis (BEZERRA *et al.*, 2002), os quais já contêm altas concentrações de AIA endógeno, o que justificaria decréscimos no enraizamento e aumento na mortalidade de propágulos. No entanto, mesmo com a utilização de  $4.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, as porcentagens de sobrevivência ainda podem ser consideradas satisfatórias, sendo comparáveis àquelas registradas na literatura para, por exemplo, a miniestaquia em cedro-rosa (*Cedrella fissilis*), onde a utilização das mesmas concentrações de AIB utilizadas no presente estudo com *Peltophorum dubium*, não exerceu efeito significativo sobre a sobrevivência das mudas, após 120 dias em casa de vegetação (XAVIER *et al.*, 2003).

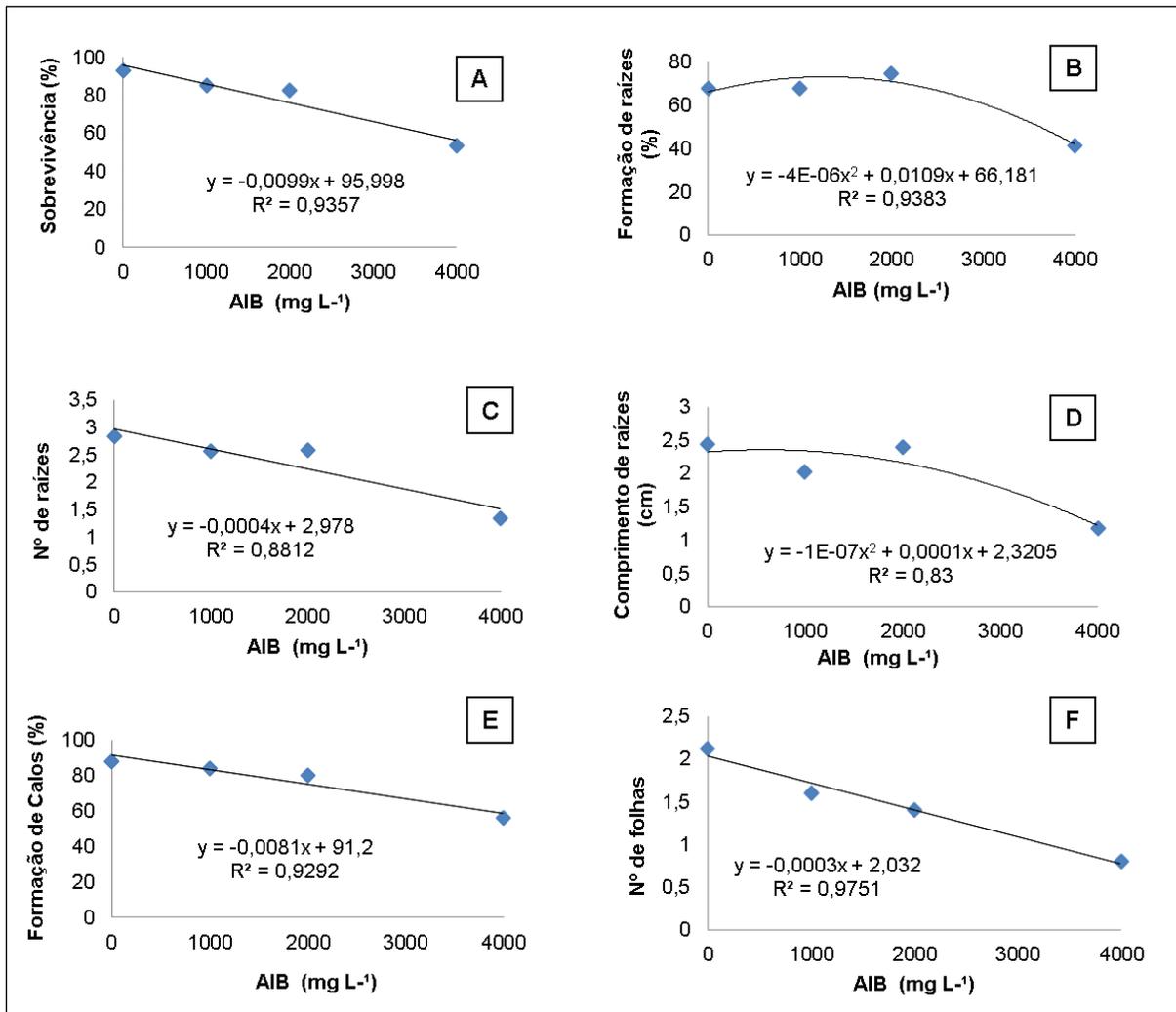


Figura 12 – Médias de sobrevivência (%), formação de raízes (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm), formação de calos (%) e número de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada; v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB em que foram imersas por 10s, ao longo de 90 dias de avaliações. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Para a formação de raízes nas miniestacas foi observado efeito significativo dos fatores concentrações de AIB ( $p=0,0100$ ;  $AS=0,87$ ) e dias de avaliação ( $p=0,0035$ ;  $AS=0,92$ ). Para a auxina foi observado um comportamento quadrático das concentrações de AIB em relação à formação de raízes, sendo que a formação de raízes aumentou até a concentração 2000 mg L<sup>-1</sup> de AIB e decresceu deste ponto em diante (Figura 12 – B), sendo que o ponto de máxima eficiência técnica (MET) seria obtido com a concentração de 1.362 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Mesmo na ausência da

auxina, os valores obtidos podem ser considerados satisfatórios e indicam que a espécie tem potencial para ser propagada via miniestaquia, inclusive sem a utilização de AIB. Em relação ao período de avaliação, a formação de raízes foi superior aos 60 dias, sendo que os valores obtidos diferiram da média observada aos 90 dias (Tabela 14). Isto indica que é necessário um período superior a 30 dias para que ocorra formação de raízes, em porcentagens satisfatórias, em *Peltophorum dubium* (Figura 13).

O período de permanência em casa de vegetação durante a fase de enraizamento é variável entre espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2001), sendo que já foram relatados períodos que vão desde poucas semanas, no caso do gênero *Eucalyptus*, até meses, no caso de grande parte das espécies florestais nativas (CUNHA *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2008; ENDRES *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2011; VALERI *et al.*, 2012; WENDLING *et al.*, 2005; ZIETEMANN; ROBERTO, 2007). Em estudo com clones híbridos de *Eucalyptus* sp. (FERREIRA *et al.*, 2004), buscando determinar o período ótimo de permanência na fase de enraizamento, sob o ponto de vista técnico para evitar a incidência de doenças, foi observada diferença entre a velocidade de enraizamento, inclusive entre clones da mesma espécie e, conseqüentemente, no tempo de permanência em casa de vegetação, que foi de 15 a 22 dias, tempo bastante inferior ao que foi necessário para o enraizamento em miniestacas de *Peltophorum dubium*, no presente estudo.

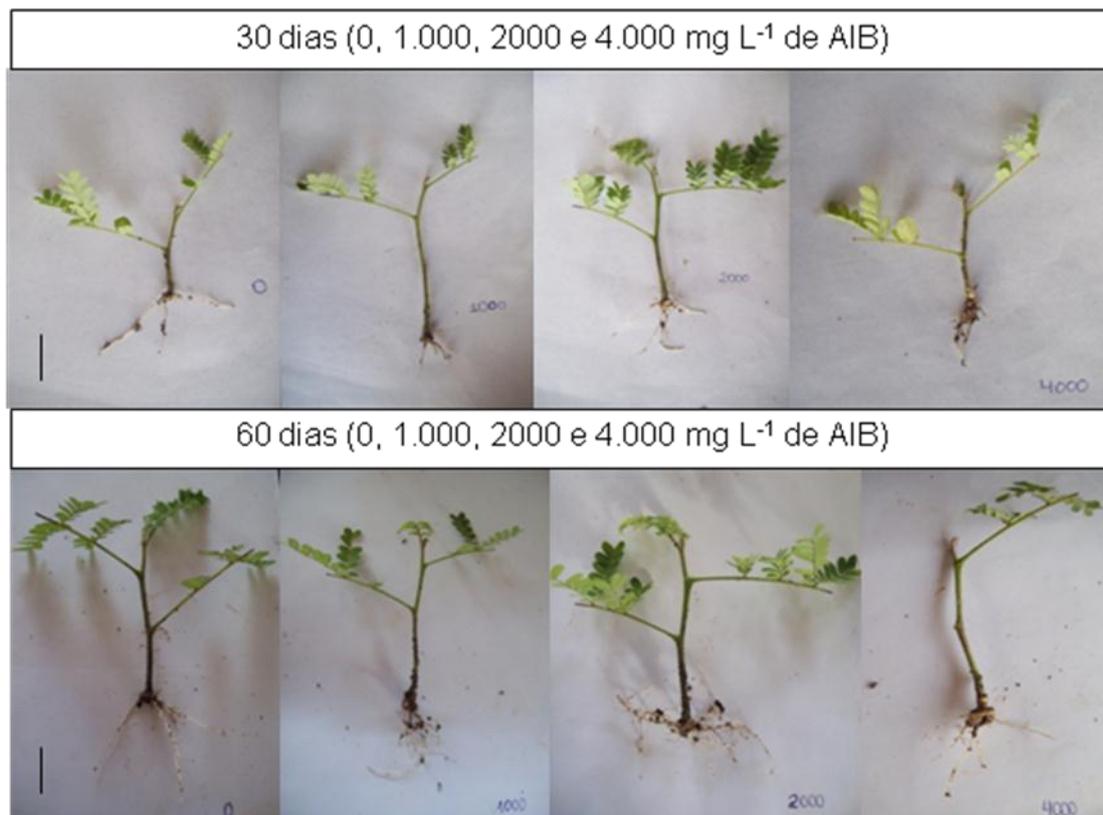


Figura 13 – Miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert enraizadas aos 30 e aos 60 dias após imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico - AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000mg L<sup>-1</sup>). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Para o número de raízes foi observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de AIB ( $p=0,0133$ ;  $AS=0,86$ ) e período de avaliação ( $p=0,000$ ;  $AS=0,96$ ). Para as concentrações de AIB houve um ajuste linear decrescente (Figura 12 – C), em que à medida que aumentaram as concentrações de AIB ocorreu uma redução no número de raízes nas miniestacas. Quanto ao período de avaliação, maior número de raízes (em torno de 3 raízes por miniestaca) foi obtido aos 60 e 90 dias, que não diferiram entre si, mas diferiram da média observada aos 30 dias, quando o número de raízes formadas foi inferior (Tabela 14). Estes resultados ratificam os resultados observados para a formação de raízes, apresentados anteriormente, em que o período de 30 dias não é suficiente para *Peltophorum dubium*, mas que não há necessidade de que o mesmo seja prolongado por 90 dias, uma vez que o período adicional de 30 dias não promoveu diferenças significativas em relação aos resultados obtidos até os 60 dias. Os

valores obtidos podem ser considerados satisfatórios, por se tratar de uma espécie florestal e por estar se aproximando daqueles que vêm sendo obtidos em estudos com outras espécies lenhosas (SOUZA, JUNIOR *et al.*, 2008; VALERI *et al.*, 2012) como grevílea (*Grevillea robusta*) (3,5 raízes por miniestaca com 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB) e pau-brasil (*Caesalpineia echinata* Lam) (4,2 raízes por estaca com 3.030 mg L<sup>-1</sup> de AIB).

Assim como foi observado para o número de raízes, para o comprimento de raízes, igualmente, foi observado efeito significativo dos dois fatores principais concentrações de AIB ( $p=0,0065$ ;  $AS=0,88$ ) e período de avaliação ( $p=0,000$ ;  $AS=0,96$ ). Para as concentrações da auxina foi observado comportamento quadrático, sendo que as maiores raízes foram observadas na ausência de AIB e na concentração 2000 mg L<sup>-1</sup> (Figura 12 – D), sendo que o ponto de máxima eficiência técnica (MET) seria obtido a 500 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Esses tratamentos foram, também, os que proporcionaram maiores porcentagens de formação de raízes e maiores números de raízes. No entanto, mesmo nos melhores tratamentos, o comprimento das raízes formadas (< 3,0 cm) em miniestacas de *Peltophorum dubium* foi inferior ao que tem sido observado para outras espécies, como cedro-australiano (*Toona ciliata*) e goiabeira (*Psidium guajava*) em que foram observadas raízes com até 10 cm (SILVA *et al.*, 2012; ALTOÉ; MARINHO, 2012). Esses resultados podem estar relacionados à época de coleta das miniestacas (outono), uma vez que, para *Pinus taeda*, por exemplo, quando foi avaliado o efeito da estação do ano no enraizamento de miniestacas (ALCANTARA *et al.*, 2007), o comprimento das raízes em miniestacas coletadas no outono foi inferior (1,05 cm) àquelas obtidas nas demais estações do ano (variando de 3 a 8 cm), sendo este efeito atribuído à redução na atividade metabólica nesta estação, decorrente do período de crescimento vegetativo intenso nas estações anteriores. Quanto ao período de avaliação, maiores raízes foram obtidas aos 60 e 90 dias, não diferindo entre si, mas diferindo da avaliação realizada aos 30 dias (Tabela 14), ratificando resultados apresentados anteriormente para as outras variáveis-resposta relacionadas à rizogênese.

Para a presença de raízes secundárias foi observado efeito significativo somente do fator principal período de avaliação ( $p=0,000$ ;  $AS=0,96$ ). Maiores porcentagens de miniestacas com desenvolvimento de raízes secundárias, novamente, foram observadas aos 60 e 90 dias, médias que não diferiram entre si, mas, sim, daquelas observadas na avaliação aos 30 dias (Tabela 14), indicando que

é necessário um período superior a 30 dias para que ocorra o desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, a formação de raízes secundárias de maneira mais expressiva. Isso ocorre porque a formação de raízes adventícias, sob o ponto de vista anatômico, envolve a formação de células meristemáticas, a sua diferenciação em primórdios de raiz reconhecíveis e, posteriormente, o desenvolvimento e a emergência de novas raízes, incluindo a ruptura de outros tecidos do caule e a formação de conexões vasculares com os tecidos condutores. Somente após a formação dos primórdios radiculares reconhecíveis é possível observar o surgimento de raízes (HARTMANN *et al.*, 1997).

Tabela 14 – Médias de formação de raízes (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm) e presença de raízes secundárias (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função do período de avaliação, independentemente da concentração da solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido indolbutírico - AIB (a 0; 1000; 2000 ou 4000 mg L<sup>-1</sup>), nas quais foram previamente imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Dias de cultivo	Formação de raízes (%)		Nº de raízes		Comprimento de raízes (cm)		Raízes secundárias (%)	
30	45,00	b*	1,09	b	0,97	b	2,10	b
60	74,00	a	3,03	a	2,37	a	50,00	a
90	70,00	a	2,89	a	2,68	a	65,00	a
Média	63,00		2,33		2,01		45,33	
AS**	0,92		0,96		0,96		0,96	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1-(1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Já para a formação de calos foi observado efeito significativo somente do fator principal concentração de AIB (p=0,0035; AS=0,90). Na ausência de AIB houve maior calogênese, que passou a decrescer com o aumento nas concentrações da auxina (Figura 12 – E). A menor porcentagem de formação de calos na maior concentração de AIB testada (4000 mg L<sup>-1</sup>) pode ser decorrente da menor sobrevivência observada neste tratamento, uma vez que, na ocasião da primeira avaliação (aos 30 dias), muitas miniestacas já haviam morrido antes mesmo de

ocorrer formação de calos. No entanto, nas miniestacas sobreviventes, a formação de calos foi intensa.

Comportamento semelhante foi observado para o número de folhas por miniestaca, em que houve efeito significativo somente da concentração de AIB ( $p=0,000$ ;  $AS=0,97$ ). Maior número de folhas foi obtido na ausência da auxina (Figura 12 – F) e, deste ponto em diante, quando AIB foi adicionado, observou-se um ajuste linear decrescente, em que, na presença da maior concentração de AIB avaliada ( $4000 \text{ mg L}^{-1}$ ), foi obtida uma média inferior a uma folha por miniestaca, provavelmente em decorrência do excesso de auxina, que pode ter causado efeito fitotóxico, como observado anteriormente, para a sobrevivência das miniestacas.

#### 4.3.2 Formação de raízes em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert após sucessivas coletas

Em todas as variáveis avaliadas no presente ensaio, os valores de acurácia seletiva (AS), estatística que mede a precisão do experimento foram altos (entre 0,7 e 0,9) ou muito altos ( $> 0,9$ ), indicando que os dados obtidos são confiáveis.

Para a sobrevivência houve efeito significativo do fator principal dias de avaliação ( $p=0,0260$ ;  $AS=0,89$ ) e interação entre os fatores período de coleta e concentração de AIB ( $p=0,000$ ;  $AS= 0,93$ ). A maior sobrevivência das miniestacas foi observada aos 30 dias de cultivo (90,71%), ocorrendo um decréscimo nas avaliações realizadas aos 60 dias (86,24% de sobrevivência). No entanto, a porcentagem de miniestacas sobreviventes no leito de enraizamento ainda pode ser considerada satisfatória, indicando que as condições em que os ensaios foram conduzidos foram adequadas e que o material vegetal utilizado tem potencial para ser utilizado na miniestaquia. Em relação às coletas, observou-se comportamento linear da sobrevivência em relação às concentrações de AIB para as coletas 1 e 2 (outono) (Figura 14), havendo um decréscimo na porcentagem de miniestacas sobreviventes com o aumento na concentração de AIB. Para a coleta 3 (inverno), o comportamento observado foi quadrático, sendo que o máximo de sobrevivência, de acordo com o cálculo da máxima eficiência técnica (MET), seria observado com a utilização de  $2.100 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB. De maneira geral, as porcentagens de

sobrevivência foram satisfatórias, com exceção das miniestacas oriundas da coleta 1 (outono) quando submetidas ao tratamento de imersão em solução de 4.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, as quais apresentaram sobrevivência inferior a 60%.

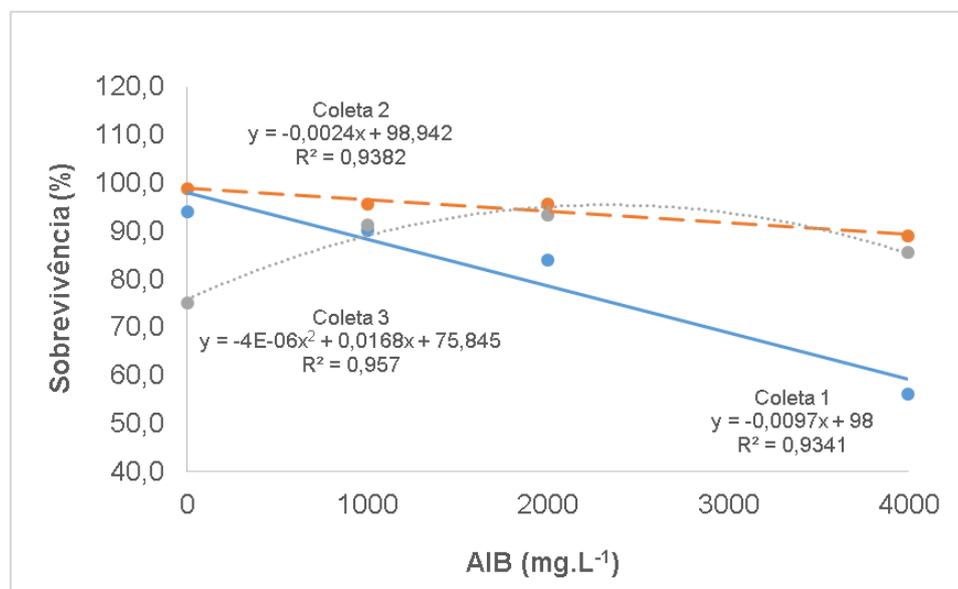


Figura 14 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, em função da coleta, independentemente da avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Na miniestaquia de leiteiro (*Sapium glandulatum* (Vell.) Pax) também houve aumento na mortalidade de miniestacas com o aumento das concentrações do fitorregulador (AIB e ANA), ao mesmo tempo em que houve decréscimo nas porcentagens de enraizamento (FERREIRA *et al.*, 2010). Resultado semelhante foi observado em miniestacas de *Eucalyptus grandis* em que a aplicação de 1.000 ou 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB proporcionou os melhores índices de sobrevivência, os quais decresceram a partir destes valores (TITON *et al.*, 2003). Há relatos de que a aplicação exógena de auxinas pode ser fitotóxica aos ramos juvenis, os quais contêm altas concentrações de ácido indol acético (AIA) endógeno. Esse efeito é verificado pelo aumento na mortalidade dos propágulos e decréscimo no enraizamento com a utilização de concentrações mais altas de auxinas (BEZERRA

*et al.*, 2002), assim como foi observado para *Peltophorum dubium* e nos estudos anteriormente apresentados.

Na miniestaquia de híbridos de *Eucalyptus* (BRONDANI *et al.*, 2010) e de cultivares de goiabeira (*Psidium guajava*) (ALTOÉ *et al.*, 2011(a)), avaliadas durante as quatro estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) também foram obtidas porcentagens satisfatórias de sobrevivência das miniestacas, sendo que os maiores valores foram obtidos no período de inverno e outono enquanto os menores, no verão, período em que há maior desidratação dos tecidos. No entanto, em outro estudo com cultivares de goiabeira (FREITAS *et al.*, 2013), a época de coleta das miniestacas não teve efeito sobre as porcentagens de sobrevivência.

Entre os fatores que podem ter contribuído para as altas porcentagens de sobrevivência das miniestacas de *Peltophorum dubium*, nos demais tratamentos, no presente ensaio, estão as condições fisiológicas das plantas matrizes, bem como a temperatura e o manejo dos propágulos durante o período em que permaneceram no leito de enraizamento, assim como foi observado na propagação de araçazeiro (*Psidium cattleianum*) e goiabeira (*Psidium guajava*) por miniestaquia, também, a partir de material juvenil (ALTOÉ *et al.*, 2011(b)).

Para a formação de raízes houve interação entre o fator principal coleta tanto com as concentrações de AIB ( $p=0,0001$ ;  $AS=0,89$ ) quanto com o período de avaliação ( $p=0,000$ ;  $AS=0,97$ ). Para todas as coletas, foi observado um comportamento quadrático da porcentagem de formação de raízes em relação às concentrações de AIB (Figura 15). Até a concentração de  $2.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB houve incremento na porcentagem de formação de raízes, que passou a decrescer deste ponto em diante, assim como foi observado para *Grevillea robusta* A. Cunn. (JUNIOR *et al.*, 2008), indicando que a aplicação de auxina exógena promove incrementos na formação de raízes até um certo ponto, mas que, em quantidades maiores, pode interferir negativamente nesta variável, comprometendo seu desenvolvimento (HARTMANN *et al.*, 2002). As maiores porcentagens seriam obtidas nas concentrações  $1.410 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2.750 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2.825 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, de acordo com os cálculos de MET para as coletas 1, 2 e 3 respectivamente. Para as miniestacas oriundas da primeira coleta, as porcentagens de formação de raízes podem ser consideradas satisfatórias, mesmo sem a aplicação de auxina exógena, provavelmente em decorrência da juvenildade dos propágulos, que apresentam maiores níveis de cofatores de enraizamento e menores conteúdos de inibidores

(ALTOÉ *et al.*, 2011(a); JUNIOR *et al.*, 2008). Propágulos jovens são mais responsivos ao enraizamento adventício, pois a auxina é formada, naturalmente, nas partes da planta com crescimento ativo, tais como meristema apical, gemas axilares e folhas jovens. Essas auxinas são transportadas, através do floema, para a base das estacas, onde se concentram e, deste modo, juntamente com outras substâncias nutritivas, são responsáveis pela formação de raízes, não necessitando de auxina exógena para a formação do sistema radicular (HARTMANN *et al.*, 2002).

No entanto, para as coletas 2 e 3, a aplicação de auxina exógena promoveu maiores incrementos na formação de raízes. Isso se deve, provavelmente, às condições nutricionais e fisiológicas das minicepas, que se alteram ao longo dos períodos de coletas e da mudança das estações do ano nas coletas 2 e 3 (transição de outono para inverno), quando as temperaturas estavam mais baixas. A temperatura possui função regulatória no metabolismo das plantas, afetando o enraizamento, uma vez que a divisão celular é favorecida com o aumento na temperatura e, conseqüentemente, auxilia a formação de raízes. No entanto, temperaturas muito altas, durante a fase de enraizamento, estimulam o desenvolvimento de gemas laterais antes do aparecimento de raízes (HARTMANN *et al.*, 2002). Em consequência disso, estacas muito tenras, formadas em períodos mais quentes, de maior crescimento das brotações, podem apresentar baixo enraizamento em virtude das multiplicação das células rizogênicas dependerem, entre outros fatores, da biossíntese de proteínas e ácidos nucléicos. Esse processo só é possível quando existe disponibilidade de energia e carbono estrutural para a formação de novas células (DIAS *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes aos obtidos para *Peltophorum dubium*, no entanto, independentes das concentrações de AIB utilizadas, foram observados na miniestaquia de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.), em que a formação de raízes apresentou melhores resultados na 1ª e 3ª coletas, também atribuídos ao fato de que a 2ª coleta foi realizada em um período de temperaturas mais baixas em relação àquelas observadas nas demais coletas, o que, provavelmente, proporcionou condições fisiológicas menos favoráveis ao crescimento e desenvolvimento de brotações, e, conseqüentemente, as suas respostas à formação de raízes (XAVIER *et al.*, 2003). No entanto, em miniestacas de origem seminal de cedro-australiano (*Toona ciliata*) (SOUZA *et al.*, 2009), aos 40 dias em casa de vegetação, e, também, em *Grevillea robusta* A. Cunn (JUNIOR *et al.*, 2008), não

houve diferença significativa entre coletas nem entre as concentrações de AIB avaliadas, sendo que, para cedro-australiano, foi observada uma média de 100% de enraizamento nas miniestacas nas três coletas e, para *Grevillea robusta*, mesmo sem a utilização de AIB, foram observadas altas porcentagens de formação de raízes (83 %).

As variações de resposta às condições a que as miniestacas de diferentes espécies são submetidas devem-se ao fato de que, além das condições climáticas, o enraizamento está diretamente ligado ao teor de carboidratos armazenado na matriz. Quanto maior o nível de reservas e maior a relação carbono/nitrogênio maior será o favorecimento da formação de raízes (SILVA *et al.*, 2012). No entanto, as variações das características observadas entre os propágulos de uma mesma espécie, devem-se, em parte, à variação genética existente, em decorrência de terem sido coletadas de plantas matrizes distintas de origem seminal. O potencial genético do vegetal é tido como o fator mais intimamente relacionado ao desenvolvimento de raízes (TAIZ & ZEIGER, 2004).

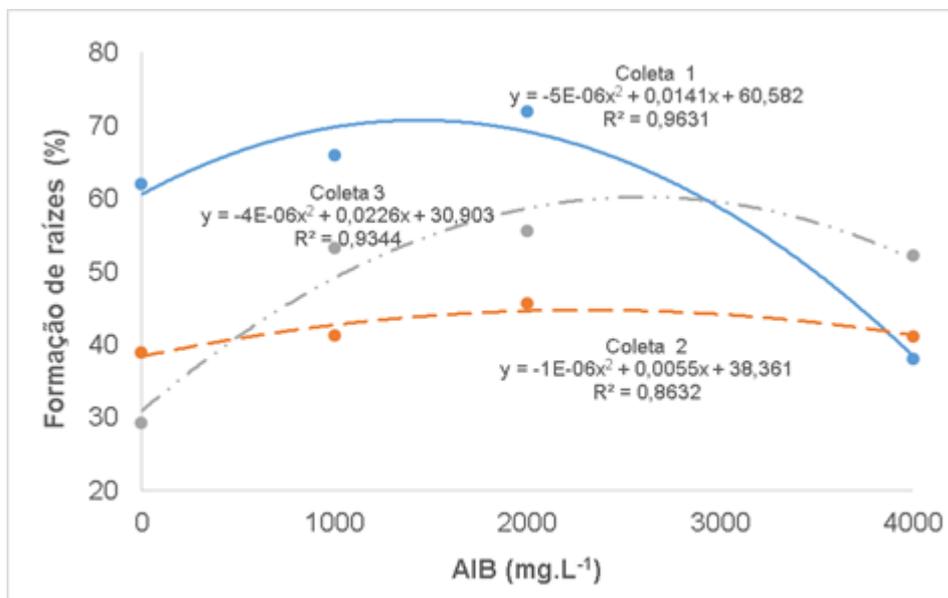


Figura 15 – Formação média de raízes (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, em função da coleta e independentemente da avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Ainda em relação à formação de raízes nas miniestacas, pode-se observar que, aos 30 dias, a formação de raízes em miniestacas oriundas da primeira coleta foi superior àquela observada nas demais coletas (Tabela 15). No entanto, aos 60 dias, não foram observadas diferenças significativas entre as coletas, somente foram observadas diferenças significativas em relação à formação de raízes aos 30 dias, indicando que, para que ocorra formação de raízes de maneira satisfatória, em miniestacas de *Peltophorum dubium*, é necessário conduzi-las no leito de enraizamento até os 60 dias.

O período de permanência dos propágulos em casa de vegetação para a formação de raízes é variável em função da espécie, da região onde o estudo está sendo desenvolvido e da época do ano, mas o período médio que tem sido observado tanto para espécies do gênero *Eucalyptus*, como para algumas florestais nativas é de 30 dias (CUNHA *et al.*, 2003; FERRIANI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2001; WENDLING *et al.*, 2005). Para dois clones de *Eucalyptus* spp., o tempo ótimo de permanência em casa de vegetação, sem a utilização de fitorreguladores, foi de 15 e 22 dias (FERREIRA *et al.*, 2004). Para corticeira-do-mato (*Erythrina falcata* Benth.), um período de 30 dias para indução do enraizamento, em sistema de hidroponia e de tubetes, produziu porcentagens satisfatórias (85,5%) de formação de raízes, também sem a utilização de fitorreguladores, indicando que a espécie apresenta boa aptidão natural ao sistema que foi testado com o uso de miniestacas de material juvenil (CUNHA *et al.*, 2008). No entanto, em miniestacas de (pau-brasil) *Caesalpineia echinata* Lam., o maior índice de enraizamento foi 16%, aos 120 dias, em substrato sólido, com 2.500 mg L<sup>-1</sup> de AIB ou ANA. Segundo os autores, como, nesse período, a maioria dos propágulos ainda não tinha sequer desenvolvido calos, deveriam permanecer mais tempo sob nebulização, a fim de induzir ao enraizamento (ENDRES *et al.*, 2007), indicando que algumas espécies, principalmente nativas, podem ser recalcitrantes ou demandar um tempo maior para a formação de raízes.

Tabela 15 – Formação média de raízes (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função do período de avaliação, independentemente da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) nas quais foram, previamente, imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Dias	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Média (%)
30	45,00	b* A	7,73	b C	18,13	b B	19,87
60	74,00	a A	75,41	a A	76,92	a A	75,7
Média (%)	59,5		41,75		47,53		47,84
AS**			0,97				

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna e maiúsculas na linha diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1 / Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para o número de raízes houve interação entre os três fatores estudados, período de coleta, concentração de AIB e dias de avaliação ( $p=0,0001$ ; AS= 0,89). De uma maneira geral, em todas as coletas, houve aumento no número de raízes aos 60 dias (Figura 16), ratificando os resultados obtidos para a variável formação de raízes, em que foi necessário um período superior a 30 dias para que fossem obtidos valores satisfatórios. No enraizamento de estacas lenhosas de 20 espécies florestais nativas, os melhores resultados obtidos para as médias de número de raízes também foi semelhante aos observados para a porcentagem de formação de raízes (SANTOS *et al.*, 2011).

Para a coleta 1, aos 30 dias, o maior número de raízes seria obtido com a utilização de 1.833 mg L<sup>-1</sup> de AIB, de acordo com o cálculo da MET. No entanto, aos 60 dias, houve mudança de comportamento no número de raízes em relação às concentrações de AIB, sendo que o máximo de raízes foi obtido na ausência desta auxina, decrescendo deste ponto em diante, semelhantemente ao que foi observado na segunda coleta, em que se observaria o mínimo de formação de raízes com a utilização de 2.250 mg L<sup>-1</sup> de AIB, de acordo com o cálculo de MET. Em relação à coleta 3, observou-se aumento no número de raízes em relação às concentrações de AIB, tanto aos 30 quanto aos 60 dias, destacando-se o período de 60 dias como aquele de maior número de raízes.

Na miniestaquia de goiabeira (*Psidium guajava*), o número de raízes também foi influenciado pela época de coleta das miniestacas, sendo que as menores médias foram observadas nas miniestacas coletadas em novembro (ALTOÉ *et al.*, 2011(a)). No entanto, em miniestacas de *Grevillea robusta* A. Cunn., em que foi observado efeito quadrático do número de raízes em função das concentrações de AIB, o maior número de raízes (3,5) foi obtido com a utilização de 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, independentemente da coleta (JUNIOR *et al.*, 2008), semelhante ao que foi observado em estacas herbáceas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), coletadas no verão, em que as concentrações de 1.500 e 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB mostraram-se superiores em relação a esta variável (ZIETEMANN; ROBERTO, 2007). Para *Pinus taeda* L., o maior número de raízes (7,4) foi observado em miniestacas coletadas no inverno, sem a utilização de fitorreguladores (ALCANTARA *et al.*, 2007). Por outro lado, em estacas de pau-brasil (*Caesalpineia echinata* Lam.), foram necessários 3.030 mg L<sup>-1</sup> de AIB para a obtenção de 4,2 raízes por estaca (VALERI *et al.*, 2012). De maneira geral, as médias obtidas em *Peltophorum dubium*, no presente estudo, foram inferiores. No entanto, ainda assim, podem ser considerados satisfatórios, uma vez que se trata de uma espécie florestal nativa, a qual tende a apresentar maiores dificuldades no que se refere à formação de raízes em propágulos vegetativos.

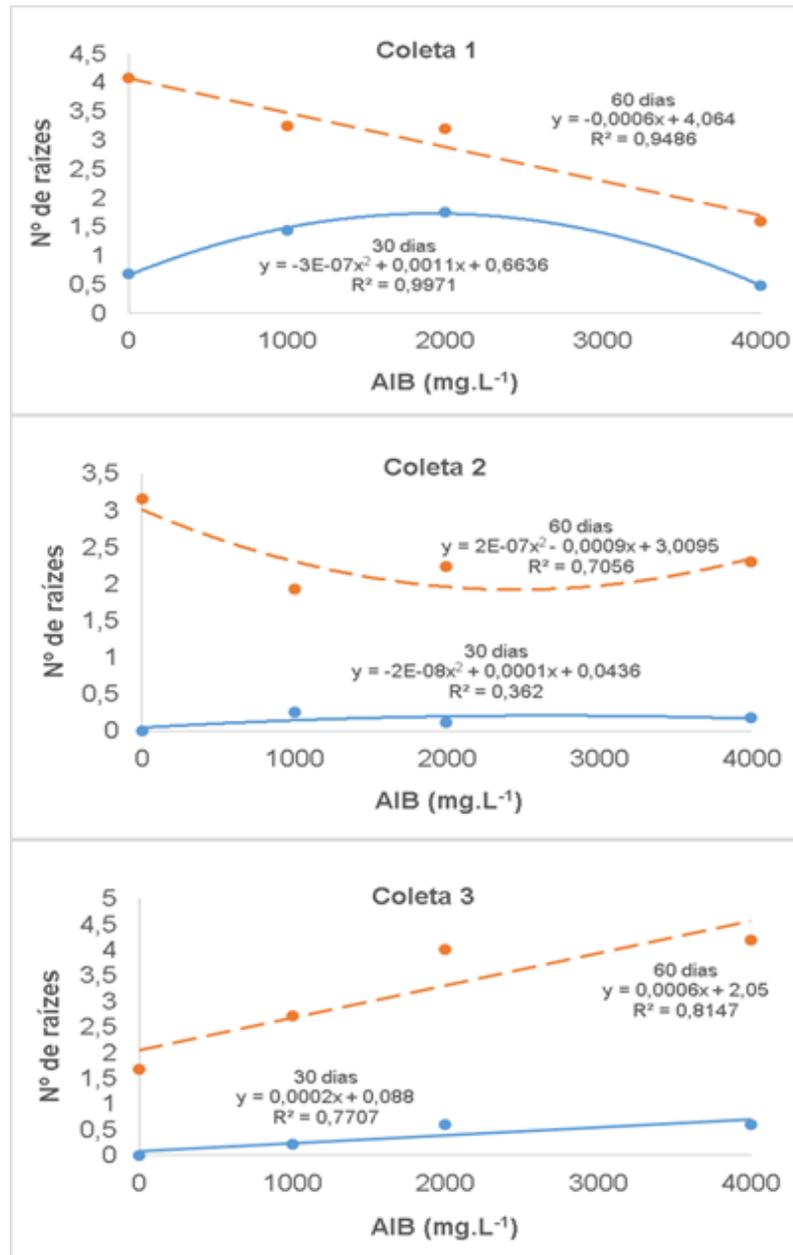


Figura 16 – Nº médio de raízes em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, oriundas de diferentes coletas (1, 2 e 3), em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg.L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, avaliados aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Para o comprimento de raízes, houve interação entre os fatores concentração de AIB e dias de avaliação ( $p=0,0010$ ;  $AS=0,90$ ) e, igualmente, entre os fatores coleta e dias de avaliação ( $p=0,000$ ;  $AS=0,98$ ). Tanto aos 30 quanto aos 60 dias, o comprimento das raízes em relação às concentrações de AIB apresentou

comportamento quadrático (Figura 17), sendo que os maiores comprimentos de raízes seriam obtidos nas concentrações 2.500 mg L<sup>-1</sup> e 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, respectivamente, de acordo com o cálculo da MET. Em relação ao período de avaliação, aos 60 dias foram observadas médias superiores para o comprimento de raízes (Tabela 16), independentemente da coleta, indicando, assim como foi observado nas variáveis formação de raízes e número de raízes, que é necessário um período superior a 30 dias para que se observem resultados satisfatórios. No enraizamento de estacas lenhosas de diversas espécies florestais, o comprimento da maior raiz, também, apresentou comportamento parecido com àquele observado nas demais características, ou seja, as espécies que mais enraizaram e emitiram mais raízes adventícias também apresentaram os sistemas radiculares mais longos (SANTOS *et al.*, 2011). Essa característica é importante, e isso foi confirmado na miniestaqueira de cedro-australiano (*Toona ciliata*), por exemplo, em que foi observado que, aos 40 dias em casa de vegetação, as miniestacas que emitiram raízes mais compridas e mais finas, as quais são responsáveis pela absorção de água e nutrientes, posteriormente, apresentaram crescimento mais acelerado (SOUZA *et al.*, 2009).

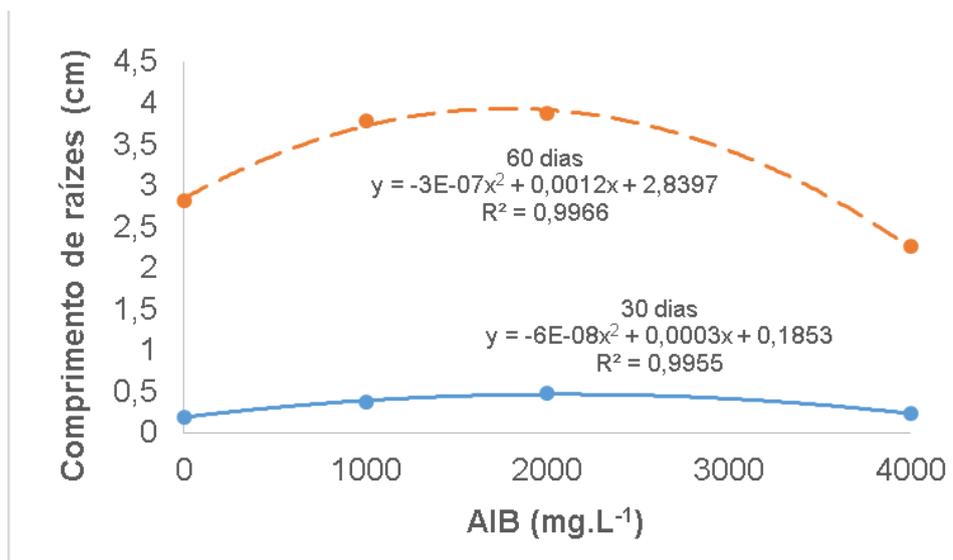


Figura 17 – Comprimento médio de raízes (cm) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, independentemente da coleta, nas avaliações efetuadas aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Tabela 16 – Comprimento médio de raízes em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes coletas e do período (em dias) em que foram efetuadas as avaliações, após tratamentos de imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) independentemente da concentração utilizada. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Dias	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Média (cm)
30	0,97	b* A	0,043	b B	0,23	b B	0,31
60	2,37	a B	2,68	a B	4,12	a A	3,18
Média (cm)	1,67		1,37		2,17		1,75
AS**			0,98				

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna e maiúsculas na linha diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1-(1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Quanto à presença de raízes secundárias, assim como para o número de raízes, houve interação entre os três fatores estudados, coleta, concentração de AIB e dias de avaliação ( $p=0,0349$ ;  $AS=0,75$ ). De maneira geral, em todas as coletas, a presença de raízes secundárias foi superior aos 60 dias (Figura 18), indicando, como já relatado anteriormente, que aos 30 dias já ocorreu a formação de raízes, mas é necessário um período adicional para que isso ocorra de maneira mais expressiva e para que ocorra, também, o seu desenvolvimento, incluindo a formação de raízes secundárias. O incremento na presença de raízes secundárias (raízes finas), que são responsáveis pela absorção de água e nutrientes, é um importante fator para o desenvolvimento das mudas. Mudanças com presença de raízes finas podem superar condições de estresse ambiental a que estão sujeitas no pós-plantio, as quais constituem um dos principais meios para acessar os recursos do solo, sendo o comprimento e número dessas raízes indicadores da capacidade de absorção de nutrientes (SILVA *et al.*, 2012).

Nas miniestacas oriundas da primeira coleta, a formação de raízes secundárias em relação às concentrações de AIB, aos 30 dias, ajustou-se a um comportamento quadrático, sendo que o máximo de raízes secundárias seria obtido na concentração 1.800 mg L<sup>-1</sup> de AIB. No entanto, aos 60 dias, houve mudança deste comportamento, sendo que com o aumento nas concentrações de AIB houve

um decréscimo na porcentagem de miniestacas com raízes secundárias presentes. Para as coletas 2 e 3, aos 30 dias, não houve ajuste da equação de regressão, sendo obtida uma média geral de 30 % de miniestacas em que ocorreu a formação de raízes secundárias. Aos 60 dias, houve um ajuste quadrático para ambas as coletas e o máximo de formação de raízes secundárias iria ocorrer na presença de concentrações  $2.260 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2.750 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, respectivamente, de acordo com o cálculo da MET, para as coletas 2 e 3. No entanto, nas miniestacas oriundas da coleta 3 (inverno) foram observadas maiores porcentagens de formação de raízes secundárias (chegando a 80%). Possivelmente, este resultado esteja relacionado ao fato de que as brotações que originaram essas miniestacas, estiveram expostas, anteriormente à instalação do experimento, a um período de repouso vegetativo, ocasionado pelos meses do inverno, o que causou um acúmulo de carboidratos favoráveis à formação de raízes, assim como foi observado na miniestaquia de *Pinus taeda* L. (ALCANTARA, *et al.*, 2007) e de vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia*) (FERRIANI *et al.*, 2011). As reservas parecem ser indispensáveis à sobrevivência do propágulo até o seu enraizamento e posterior desenvolvimento, uma vez que, em níveis convenientes, não só facilitam a emissão de raízes e aumentam o aparato fotossintético, como, também, elevam as taxas de fotossíntese. Boa parte das reservas se transfere para a base do propágulo, contribuindo para a formação dos primórdios radiculares (PAIVA; GOMES, 1995).

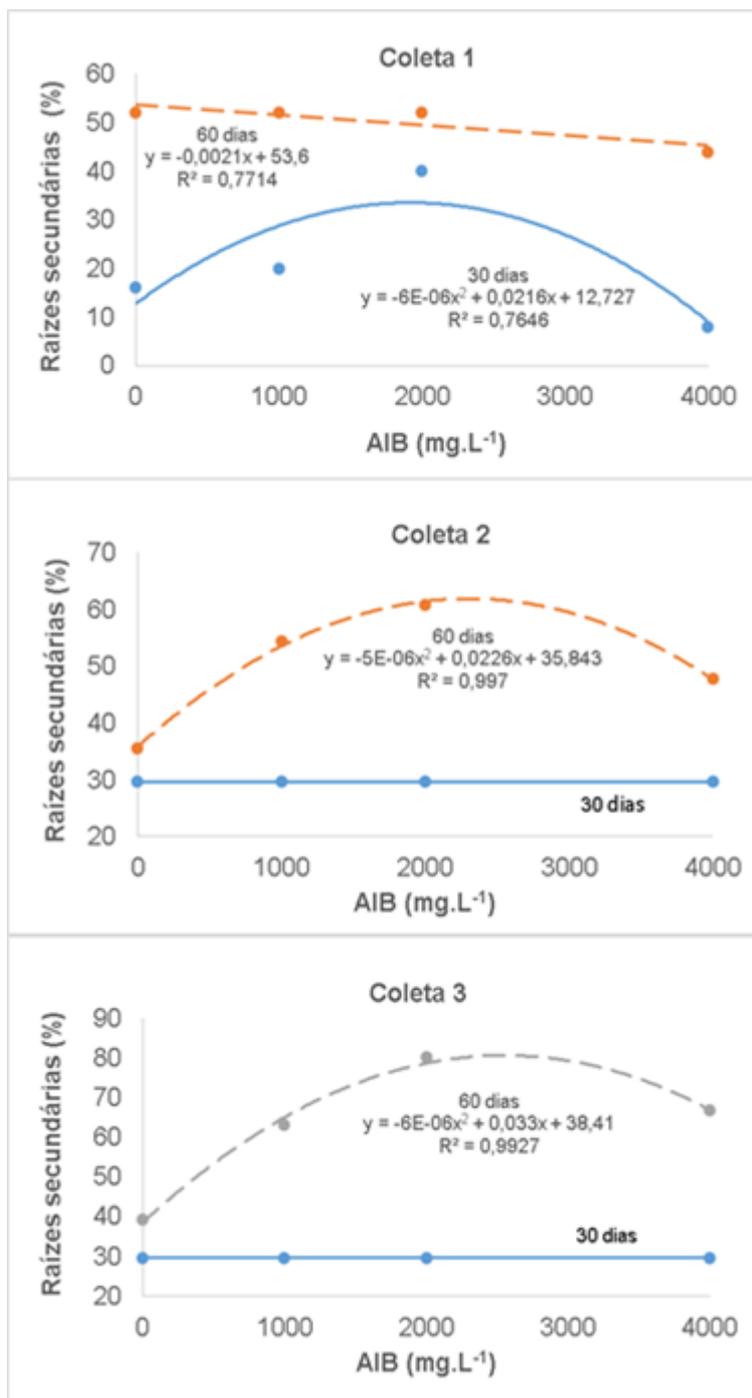


Figura 18 – Presença de raízes secundárias (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 10s, nas diferentes coletas e nas avaliações efetuadas aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Para a formação de calos, foram observadas interações duplas das coletas com as concentrações de AIB ( $p=0,000$ ;  $AS=0,96$ ) e das coletas com os dias de avaliação ( $p=0,000$ ;  $AS=0,96$ ). Nas coletas 1 e 2 observaram-se intensa formação de calos na ausência da auxina AIB, a qual decresceu, de maneira linear, à medida em que aumentou a concentração de AIB (Figura 19). No entanto, esse efeito pode estar associado à menor sobrevivência das miniestacas nas concentrações testadas, o que fez com que, por ocasião das avaliações, fossem observadas, também, menores porcentagens de formação de calos. Na coleta 3, a formação de calos em relação às concentrações de AIB ajustou-se a um comportamento quadrático, sendo que o ponto de máxima formação de calos para esta coleta seria a concentração  $2.100 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, de acordo com o cálculo da MET. Entretanto, em miniestacas de leiteiro (*Sapium glandulatum* (Vell.) Pax) foram observadas baixas porcentagens de formação de calos (inferiores a 5%), independentemente da estação do ano em que foram coletadas, mesmo com a utilização de até  $8.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB ou ANA (FERREIRA *et al.*, 2010).

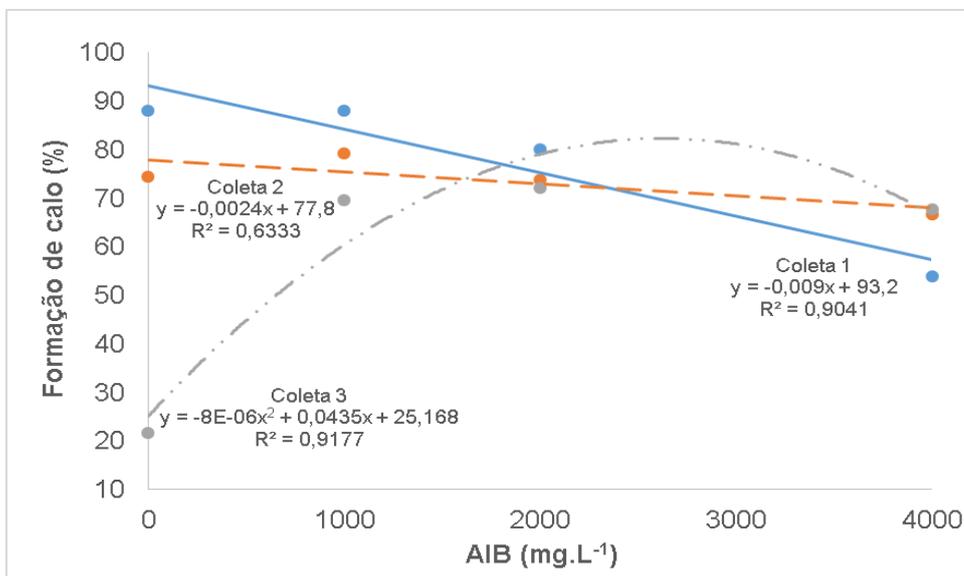


Figura 19 – Formação média de calos (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função das concentrações de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000  $\text{mg L}^{-1}$ ) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s, nas diferentes coletas e independentemente da avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Ainda em relação à formação de calos, nas coletas 2 e 3, foram observadas diferenças significativas entre os períodos de avaliação, sendo mais expressiva a formação de calos aos 60 dias, diferentemente do que foi observado na coleta 1, em que, aos 30 dias, a formação de calos já ocorrera de maneira mais intensa (Tabela 17). Esses resultados podem ser decorrentes do balanço hormonal que se estabeleceu nas miniestacas por ocasião das coletas que ocorreram em períodos distintos e, provavelmente, resultaram em propágulos com variados teores endógenos de hormônios, os quais, em contato com a aplicação da auxina exógena, promoveram resultados diferenciados. Em miniestacas de vassourão-branco (*Piptocarpa angustifolia*), em função de um grande número de miniestacas apresentarem formação de calos, o período de permanência em casa de vegetação foi ampliado para 90 dias, no intuito de promover a formação de raízes. No entanto, ocorreu a morte dos propágulos sem que fosse obtido o resultado esperado (FERRIANI *et al.*, 2011). Entretanto, no presente estudo, com *Peltophorum dubium*, apesar de ter sido observada intensa formação de calos nas miniestacas, essas estruturas parecem não ter interferido de maneira negativa na formação de raízes, já que, em geral, se observou a presença das duas estruturas simultaneamente.

Tabela 17 – Formação média de calos (%) em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes coletas e o período de avaliação (em dias), após tratamentos de imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg.L<sup>-1</sup>) independentemente da concentração utilizada. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Dias	Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3			Média (%)
30	78,00	a*	C	55,25	a	B	42,86	a	A	55,29
60	77,00	a	A	91,80	b	B	72,53	b	A	81,07
Média (%)	77,5			73,63			57,69			68,21
AS**				0,96						

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna e maiúsculas na linha diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Em relação ao número de folhas houve interação entre os fatores coleta e concentrações de AIB ( $p=0,000$ ;  $AS=0,93$ ); entre coleta e dias de avaliação ( $p=0,0008$ ;  $AS=0,93$ ) e, também, entre dias de avaliação e as concentrações de AIB avaliadas ( $p=0,0278$ ;  $AS= 0,82$ ). Tanto aos 30 quanto aos 60 dias, observou-se um decréscimo no número de folhas com o aumento nas concentrações de AIB (Figura 20), semelhantemente ao que foi observado nas coletas 1 e 2 (Figura 21). Na coleta 3, o número de folhas em relação às concentrações de AIB ajustou-se a um comportamento quadrático, sendo que o número máximo de folhas ocorreria com a utilização de  $1.428 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, de acordo com o cálculo da MET. Tanto aos 30 quanto aos 60 dias, as miniestacas oriundas da coleta 2 revelaram-se superiores àquelas das coletas 1 e 3 quanto ao número de folhas (Tabela 18). No entanto, somente na coleta 3 o período de avaliação diferiu significativamente, sendo obtido maior número de folhas aos 30 dias.

A presença de folhas e de brotações no propágulo vegetativo é importante para o processo de enraizamento, o que se deve à produção e translocação de substâncias como carboidratos durante a fotossíntese, bem como à síntese de auxinas responsáveis pelos efeitos correlatos no enraizamento, 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).

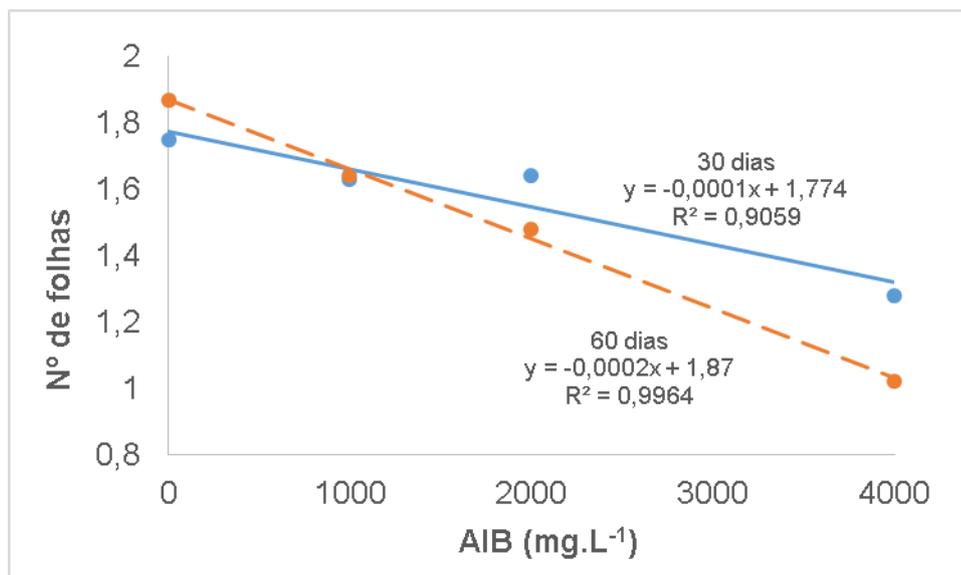


Figura 20 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s, Independentemente da coleta, na avaliação efetuada aos 30 e aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

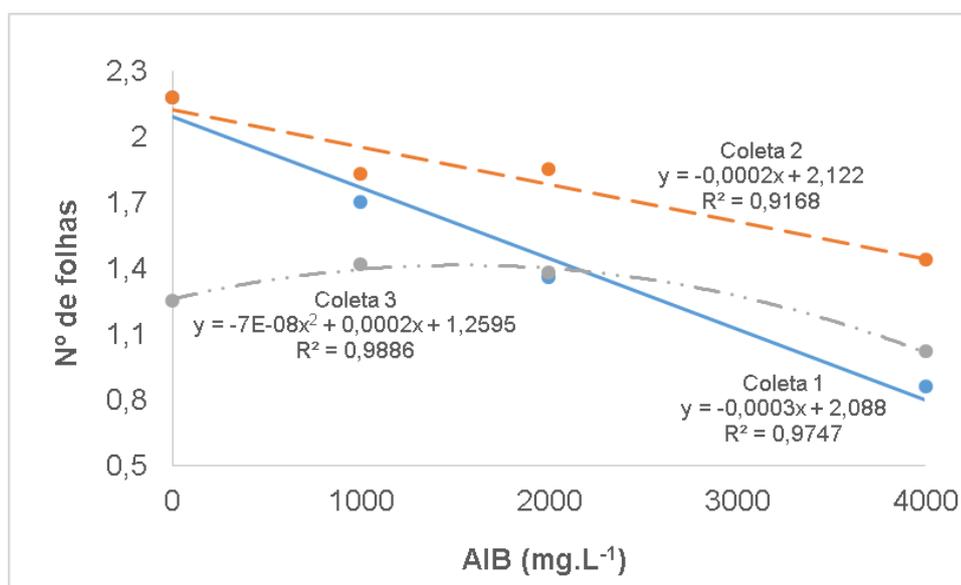


Figura 21 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s, em função da coleta e independentemente da avaliação ter sido efetuada aos 30 ou aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Tabela 18 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes coletas e o período de avaliação (em dias), após tratamentos de imersão em solução hidroalcoólica (50% etanol, 50% água destilada, v/v) de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) em que foram, previamente, imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Dias	Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3			Média
30	1,56	a*	B	1,75	a	A	1,40	a	B	1,58
60	1,49	a	B	1,89	a	A	1,13	b	C	1,5
Média	1,52			1,82			1,27			1,54
AS**				0,93						

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna e maiúsculas na linha diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

#### 4.3.3 Produtividade do minijardim clonal

Para a produtividade do minijardim clonal houve efeito significativo das coletas ( $p=0,000$ ;  $AS=0,98$ ), sendo que a última coleta foi superior às demais em relação ao número de miniestacas produzidas (Tabela 19). O número de miniestacas produzidas por minicepa ainda não pode ser considerado satisfatório pois é inferior ao que vem sendo obtido para outras espécies florestais, a exemplo de vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia*) com valores variando de 1,1 a 3,2 brotações por minicepas em sistema semi-hidropônico (FERRIANI *et al.*, 2011), leiteiro (*Sapium glandulatum*) com 1,4 a 2,2 miniestacas por minicepas em sistema de tubetes (FERREIRA *et al.*, 2010) e de corticeira-do-mato (*Erythrina falcata*) com 2,9 e 1,3 miniestacas por minicepa por coleta, em canaletão e tubetes respectivamente (CUNHA *et al.*, 2008). No entanto, a continuidade de produção de novas brotações ao longo das coletas indica que a espécie adaptou-se bem ao sistema e pode ser promissora para a produção de mudas via miniestaquia.

A menor produção de miniestacas por minicepa ocorreu na primeira coleta, semelhantemente ao que foi observado na miniestaquia de cedro rosa (*Cedrella fissilis*), onde foram obtidas, em média, 1,3 miniestaca por minicepa em cada coleta (XAVIER *et al.*, 2003). Esse resultado foi atribuído ao fato de que na primeira coleta

a minicepa ainda não se encontrava com a sua formação ideal, ou seja, com maior número de gemas capazes de produzir miniestacas. O mesmo foi relatado na miniestaquia de cedro australiano (*Toona ciliata*) onde, após a primeira coleta, com a quebra da dominância apical houve estímulo à brotação das minicepas (SOUZA *et al.*, 2009). Após a decepa, as gemas dormentes tornam-se reativas, resultando em maior estímulo ao crescimento (SILVA *et al.*, 2012; WENDLING; JUNIOR, 2003). Na miniestaquia de araçazeiro (*Psidium cattleianum*) e goiabeira (*Psidium guajava*) também ocorreu a menor produção de miniestacas na primeira de sete coletas, a qual foi associada ao menor acúmulo de reservas no início de cultivo (ALTOÉ *et al.*, 2011(b)).

A diferença na produtividade das minicepas de *Peltophorum dubium* pode estar relacionada, ainda, à sazonalidade, uma vez que a última coleta foi realizada na primavera e há relatos de que o aumento da produção de miniestacas em determinado período pode estar associado à elevação da temperatura (FERRIANI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012), a qual proporciona condições fisiológicas mais favoráveis ao crescimento e desenvolvimento das brotações (CUNHA *et al.*, 2008). Este efeito tem sido observado, por exemplo, em clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* onde foi avaliada a produção de miniestacas nas quatro estações do ano, com destaque de produção de miniestacas na primavera e no verão (BRONDANI, 2008). Resultado semelhante foi observado na miniestaquia de leiteiro (*Sapium glandulatum*), no entanto, a estação de maior produção de miniestacas não coincidiu com a estação mais promissora para o enraizamento adventício das miniestacas, que ocorreu de maneira mais satisfatória no inverno (FERREIRA *et al.*, 2010).

Tabela 19 – Produtividade (nº médio de miniestacas coletadas por minicepa) de minicepas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert mantidas em casa de vegetação, em vasos flexíveis com capacidade para 4L, contendo uma mistura de substrato McPlant Misto® - Classe “A” (casca de pinus, corretivo de acidez e fertilizantes minerais) e Carolina Soil® (turfa, vermiculita, calcário, NPK e casca de arroz) na proporção 1:1 (v/v) em função das diferentes coletas, data das coletas, estação do ano e intervalo entre coletas. Santa Maria, RS, UFSM, 2012.

Coleta	Data	Estação do ano	Dias entre coletas	Produtividade (Nº miniest/minicepa)
1	09/05/2012	Outono	56	0,55 c*
2	18/06/2012	Outono	40	0,95 b
3	07/08/2012	Inverno	50	0,96 b
4	04/09/2012	Inverno	28	1,03 b
5	24/10/2012	Primavera	50	1,03 b
6	19/12/2012	Primavera	56	1,2 a
Média			0,95	
AS**			0,98	

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1-(1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

#### 4.3.4 Aclimatização de mudas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert produzidas via miniestaquia

Em todas as variáveis avaliadas no presente ensaio, os valores de acurácia seletiva (AS), estatística que mede a precisão do experimento, foram altos (entre 0,7 e 0,9) ou muito altos (> 0,9), indicando que os dados obtidos são confiáveis.

Para a variável sobrevivência houve interação entre os fatores dias de avaliação e concentrações de AIB (p=0,000; AS= 0,89); coleta e concentrações (p=0,000; AS=0,95); e coleta e dias de avaliação (p=0,0031; AS=0,87). De maneira geral, apesar de ter ocorrido um decréscimo nas porcentagens de sobrevivência em decorrência, simultaneamente, do período de avaliação (Figura 22) e do aumento nas concentrações de AIB a que as miniestacas foram submetidas durante o período de enraizamento em casa de vegetação, estes resultados podem considerados

satisfatórios, uma vez que foram obtidas médias superiores a 75% de sobrevivência das mudas.

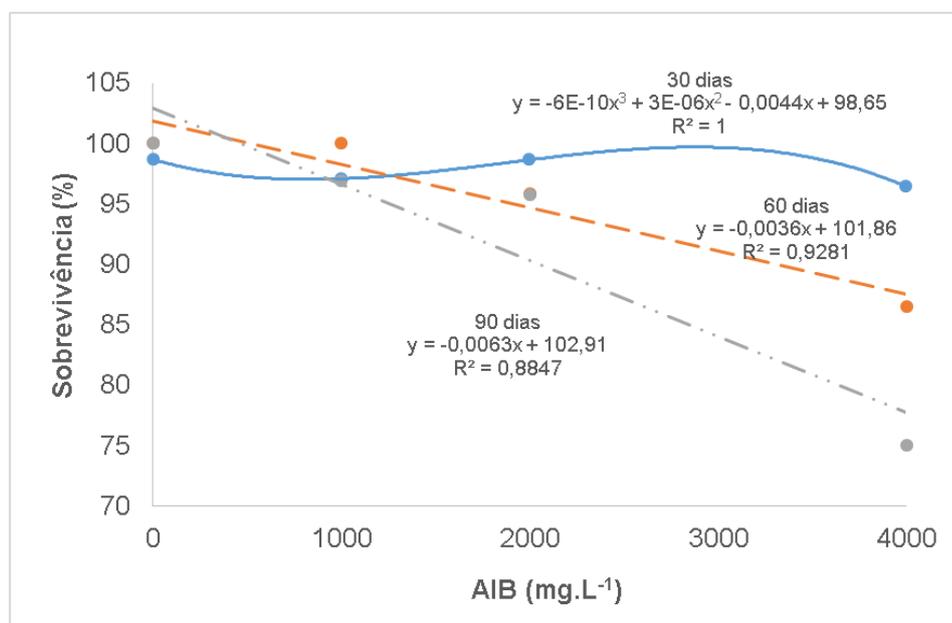


Figura 22 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, durante o período de aclimatização em casa de vegetação, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas por 10s, e do período de avaliação (30, 60 ou 90 dias) independentemente do período de coleta das miniestacas. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Em relação às coletas, foram obtidas maiores porcentagens de sobrevivência, durante a aclimatização, para as mudas oriundas das coletas 1 e 3 (Figura 23), sendo que o ponto de MET para a coleta 1, a única que apresentou ajuste a uma equação quadrática, seria a 1.928 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Para as mudas oriundas da coleta 2, houve um decréscimo na sobrevivência das mudas em função do aumento nas concentrações de AIB, da mesma maneira que foi observado com o aumento no período de aclimatização (Tabela 20). Para as demais coletas, as porcentagens de sobrevivência das mudas não diferiram significativamente ao longo dos 30, 60 ou 90 dias de avaliação.

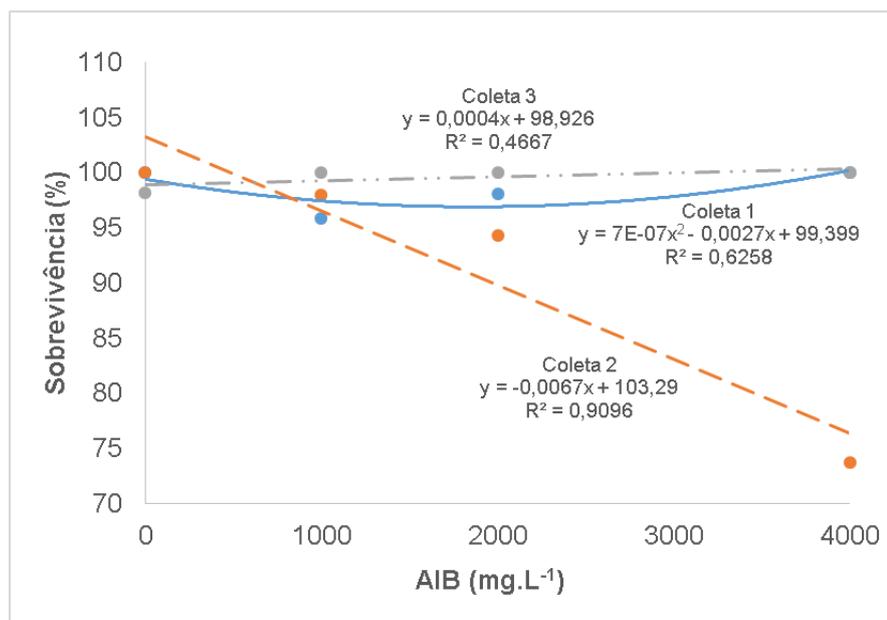


Figura 23 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, durante o período de aclimatização em casa de vegetação, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, e da coleta, independentemente do período em que foi efetuada a avaliação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Tabela 20 – Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre as diferentes coletas e o período (em dias) de aclimatização em casa de vegetação, independentemente da concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente, imersas por 10s. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Dias	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Média (%)
30	96,77	a* A	97,67	a A	98,75	a A	97,78
60	98,50	a A	93,08	b B	100,00	a A	96,17
90	100,00	a A	86,92	c B	100,00	a A	93,36
Média (%)	98,42		92,54		99,52		95,81
AS**			0,87				

\* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna e maiúsculas na linha diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. \*\* AS (Acurácia Seletiva) =  $\sqrt{1 - (1/Fc)}$ , em que Fc= valor de F calculado. AS ≥ 0,9 = muito alta; AS entre 0,7 e 0,9 = alta; AS entre 0,5 e 0,7 = moderada; e ≤ 0,5 = baixa.

Para as variáveis número de folhas ( $p=0,0009$ ;  $AS=0,80$ ), altura ( $p=0,0004$ ;  $AS=0,81$ ) e diâmetro do colo ( $p=0,0063$ ;  $AS=0,75$ ) houve interação entre os três fatores estudados, período de coleta, concentração de AIB e dias de avaliação. Em todas estas variáveis, observou-se que as curvas, em relação às concentrações de AIB, foram deslocadas, com o passar do tempo, indicando que houve incremento nessas variáveis e, conseqüentemente crescimento das mudas aclimatizadas.

Em relação ao número de folhas (Figura 24), nas mudas produzidas a partir de miniestacas oriundas da coleta 1, aos 30 e 60 dias, observou-se comportamento quadrático decrescente em relação às concentrações de AIB, sendo que o número mínimo de folhas seria obtido a  $3.500 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2.750 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB respectivamente. Aos 90 dias houve mudança nesse comportamento e o número de folhas observado distribuiu-se uniformemente ao longo das concentrações de AIB. Nas mudas produzidas a partir de miniestacas oriundas da coleta 2 observou-se comportamento linear decrescente do número de folhas com o aumento nas concentrações de AIB, em todos os períodos avaliados. Nas mudas produzidas a partir de miniestacas oriundas da coleta 3, observou-se comportamento semelhante à coleta anterior, com exceção da avaliação realizada aos 90 dias, em que se observou maior número de folhas nas concentrações  $1.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB e  $4.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

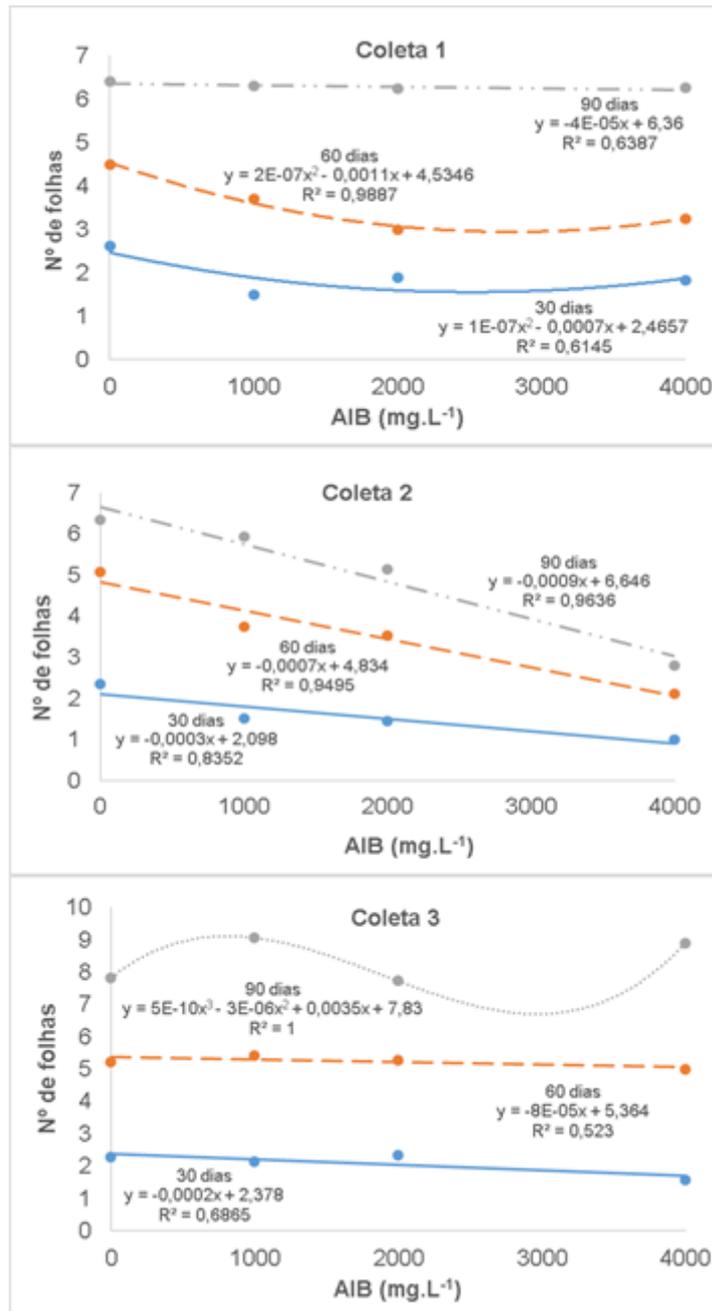


Figura 24 – Nº médio de folhas em miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, a coleta e o período de aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Para o diâmetro do colo das mudas aclimatizadas, oriundas da coleta 1, aos 30 e 90 dias, observou-se um comportamento quadrático negativo (Figura 25) em

que o menor diâmetro, obtido a partir de cálculo, seria obtido com a utilização de  $3.016 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3.750 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB respectivamente. Aos 60 dias, observou-se comportamento linear decrescente do diâmetro das mudas aclimatizadas com o aumento nas concentrações de AIB. Nas mudas provenientes da coleta 2, aos 30 e 60 dias, observou-se um comportamento quadrático do diâmetro em relação às concentrações de AIB, sendo que os valores máximos seriam obtidos a  $1.520 \text{ mg L}^{-1}$  e  $714 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, respectivamente, de acordo com o cálculo da MET. No entanto, aos 90 dias, observou-se um comportamento linear decrescente com o aumento nas concentrações de AIB. Resultados semelhantes foram obtidos para as mudas aclimatizadas originárias da coleta 3, no entanto, o comportamento quadrático observado aos 30 e 60 dias foi negativo, sendo que os menores diâmetros seriam obtidos nas concentrações  $1.167 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1.333 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB respectivamente. Aos 90 dias, observou-se um comportamento linear crescente do diâmetro do colo das mudas aclimatizadas com o aumento nas concentrações de AIB.

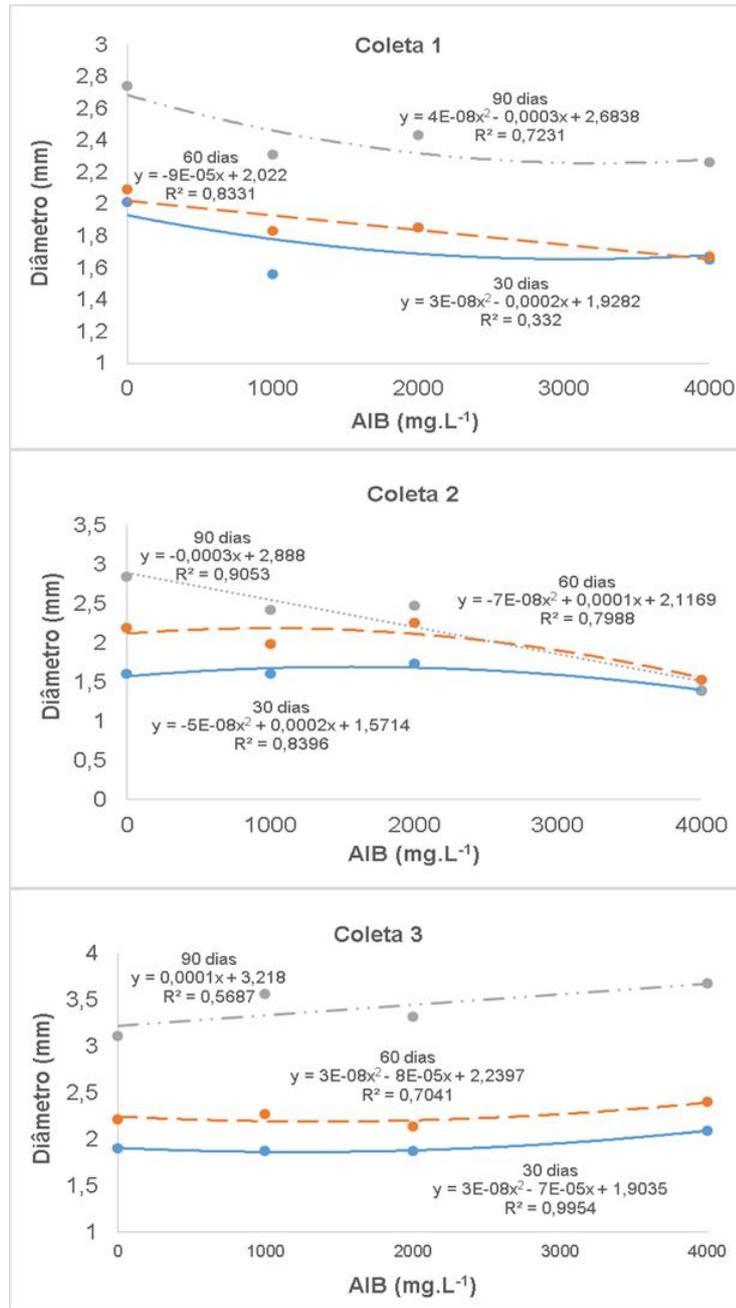


Figura 25 – Diâmetro médio (mm) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, do período de coleta e das avaliações efetuadas aos 30, 60 ou 90 dias de aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

No que se refere à altura das mudas aclimatizadas (Figura 26), naquelas produzidas a partir de miniestacas oriundas das coletas 1 e 2, observou-se, aos 30

dias, um comportamento quadrático em relação às concentrações de AIB, em que seriam obtidas mudas maiores nas concentrações  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB e  $1.250 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB respectivamente. Em ambos os casos, ainda, mas referente aos 60 e 90 dias, observou-se um comportamento linear decrescente em que, nas maiores concentrações de AIB, foram observadas mudas com as menores alturas. No entanto, na coleta 3, observou-se um comportamento oposto em que, aos 30 e 60 dias, o aumento nas concentrações de AIB resultou em um pequeno incremento na altura das mudas. No entanto, aos 90 dias, observou-se comportamento quadrático em que mudas maiores seriam obtidas na concentração  $2.625 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

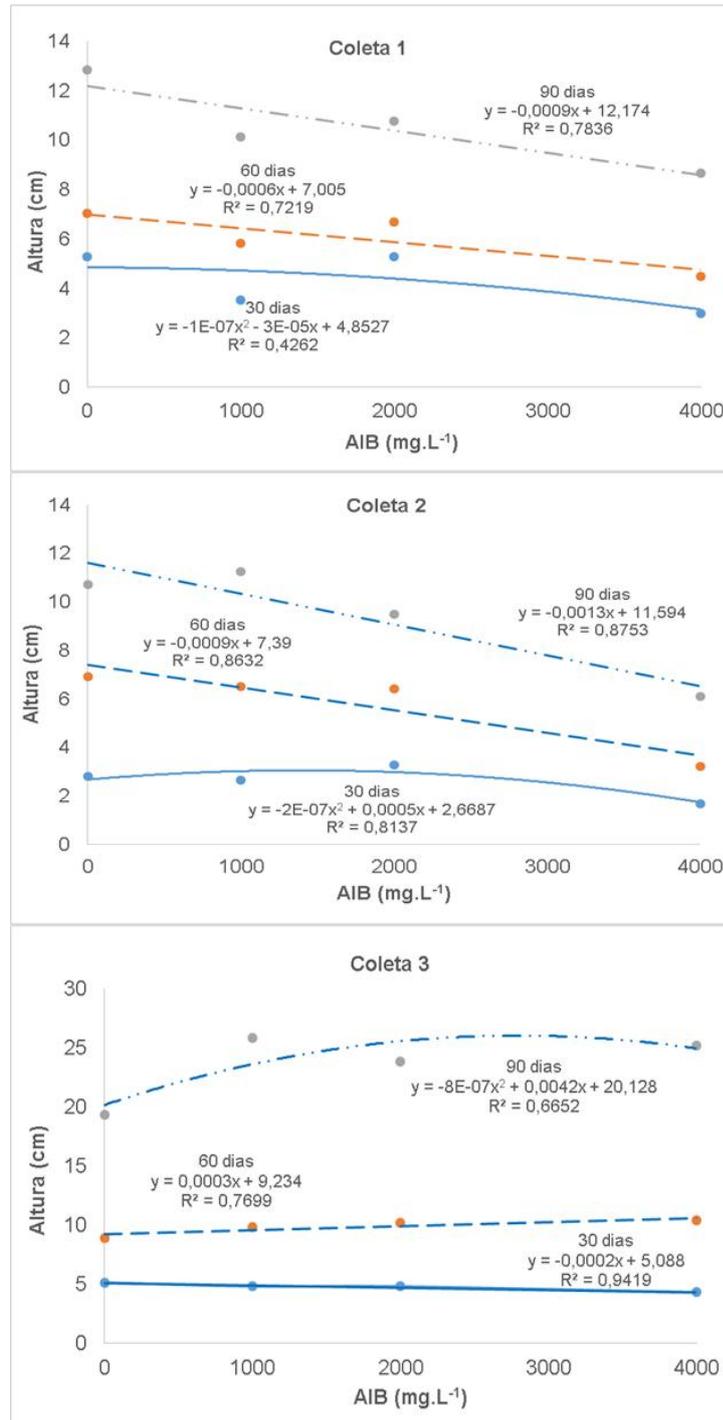


Figura 26 – Altura média (cm) de miniestacas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre a concentração de ácido 3-indolbutírico – AIB (0; 1.000; 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup>), das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram, previamente imersas, por 10s, do período de coleta e das avaliações efetuadas aos 30, 60 ou 90 dias de aclimatização em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

As características de uma muda de boa qualidade podem variar entre espécies, de acordo com o material genético utilizado e a técnica de propagação adotada. No entanto, para o padrão de mudas clonais de *Eucalyptus*, produzidas via miniestaquia, os critérios para seleção de mudas incluem altura entre 20 e 40 cm, diâmetro do coleto igual ou superior a 2 mm, quatro ou mais pares de folhas, sistema radicular contendo, pelo menos, quatro raízes, bem distribuídas e com presença de radículas, sem enovelamento. Além disso, devem ser considerados os aspectos de sanidade, rusticidade e integridade das mudas e, em um intervalo de 70 a 90 dias, as mudas devem ser expedidas para o campo (ALFENAS *et al.*, 2009).

Na miniestaquia e microstaquia de três clones de *Eucalyptus*, em que as miniestacas foram tratadas com 0, 1.000, 2.000 ou 4.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, não foram observadas diferenças entre as concentrações de AIB no momento de avaliação do crescimento das mudas produzidas, aos 50 dias. No entanto, os clones apresentaram crescimento diferenciado, sendo que o diâmetro de coleto das mudas variou entre 1,5 e 2,5 mm e a altura, entre 10 a 20 cm, dependendo do clone (TITON *et al.*, 2003). Essa diferença entre clones também foi observada na miniestaquia de *Ilex paraguariensis* (erva-mate), porém para o número de folhas, que variou entre 2,7 e 4,8, aos 150 dias (BRONDANI *et al.*, 2008). Na miniestaquia de araçazeiro (*Psidium guineense* e *Psidium cattelyanum*) e goiabeira (*Psidium guajava*), o número de folhas e a altura das mudas que permaneceram 62 dias no leito de enraizamento, no momento da repicagem, variaram de 5,75 a 8,25 e de 14,42 cm a 29,24cm respectivamente. O diâmetro do caule, medido a cada 15 dias, até os 140 dias após a repicagem, aumentou gradativamente em função do tempo, partindo de 2 mm no início e atingindo 8 mm ao final das avaliações (ALTOÉ *et al.*, 2011(b)).

Em *Peltophorum dubium*, no presente estudo, de maneira geral, aos 90 dias as mudas apresentaram em torno de 3 pares de folhas e diâmetro do coleto superior a 2mm. No que se refere à altura das mudas, naquelas oriundas das coletas 1 e 2, a altura não foi superior a 12 cm, enquanto que, nas mudas provenientes da coleta 3, a altura atingida foi superior a 20 cm. Deve-se considerar, no entanto, que se trata de uma espécie lenhosa nativa, não melhorada e com estudos incipientes quanto à sua propagação via assexuada, o que dificulta o estabelecimento de padrões. O que se observou nas mudas produzidas é que se apresentaram bastante vigorosas e com sinais de adequado crescimento e desenvolvimento, bem como demonstraram estar adaptadas às condições em que estavam sendo cultivadas, o que foi

evidenciado pelo incremento em altura, diâmetro e número de folhas ao longo das avaliações. Esses resultados permitem inferir, inicialmente, que o sistema radicular formado foi capaz de suprir e sustentar as mudas produzidas. No entanto, seriam necessárias avaliações do sistema radicular no momento de expedição das mudas para comprovar a qualidade das raízes formadas.

#### 4.4 Conclusões

- A formação de raízes adventícias em miniestacas de *Peltophorum dubium* ocorre mesmo sem a utilização de AIB e, na maioria das vezes, é acompanhada pela formação de calos na base das miniestacas. No entanto, concentrações até 2.000 mg L<sup>-1</sup> da auxina mostram-se benéficas à formação de raízes, a qual ocorre de maneira satisfatória em um período de 60 dias em casa de vegetação.

- É possível obter raízes em miniestacas de *Peltophorum dubium* após sucessivas coletas sem a adição de auxina. No entanto, a partir da primeira coleta, a formação de raízes é incrementada com a utilização de até 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

- A manutenção da produtividade das minicepas de *Peltophorum dubium* ao longo de sucessivas coletas, apesar de não atingir valores satisfatórios, indica que a espécie tem potencial para a produção de mudas via miniestaquia.

- A sobrevivência das mudas produzidas via miniestaquia e seu posterior desenvolvimento, ao longo do período de aclimatização em casa de vegetação, indicam que a miniestaquia é uma técnica viável de produção de mudas de *Peltophorum dubium*.

## CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho trouxe importantes contribuições para a propagação vegetativa de *Peltophorum dubium*. A utilização do meio nutritivo WPM reduzido à metade da sua concentração de sais (WPM/2), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de vermiculita e na presença de 7 g L<sup>-1</sup> de ágar possibilita que ocorra a formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* mesmo sem a utilização de auxina exógena. No entanto, na presença de AIB, ocorre maior formação de raízes e a presença de raízes secundárias. Além disso, nessa condição, o uso de sacarose é dispensável e resulta em melhor qualidade do sistema radicular em *Peltophorum dubium*. As médias obtidas para a formação *in vitro* de raízes ainda são relativamente inferiores em comparação ao que tem sido registrado em outras espécies na micropropagação. No entanto, por se tratar de uma espécie florestal que ainda carece de informações quanto à produção de mudas via assexuada, os resultados já podem ser considerados promissores e constituem um grande avanço para o cultivo *in vitro* da espécie. São necessários estudos adicionais visando otimizar a fase de enraizamento e sua subsequente aclimatização no que se refere ao percentual de raízes formadas e ao tempo necessário para a produção de mudas micropropagadas.

No que se refere à miniestaquia, as altas percentagens de enraizamento das miniestacas, a formação de raízes em miniestacas mesmo sem a necessidade de auxina exógena, a produtividade das minicepas nas sucessivas coletas e o desempenho satisfatório das mudas produzidas durante a aclimatização, revelam que a miniestaquia a partir de material juvenil é uma técnica viável para a propagação de *Peltophorum dubium*. No entanto, assim como para a micropropagação, estudos adicionais devem ser desenvolvidos visando à diminuição no tempo de produção das mudas, além de estudos sobre a viabilidade da técnica na produção de mudas em todas as estações do ano.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, G. B. *et al.* Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L.. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 31, n. 3, p. 399-404, 2007.

ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV. 2009. 500p.

ALTOÉ, J. A. *et al.* Multiplicação de cultivares de goiabeira por miniestaquia. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 801-809, 2011a.

ALTOÉ, J. A. *et al.* Propagação de araçazeiro e goiabeira via miniestaquia de material juvenil. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 312-318, 2011b.

ALTOÉ, J. A.; MARINHO, C. S. Miniestaquia seriada na propagação da goiabeira 'Paluma'. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP, v. 34, n. 2, p. 576-580, jun. 2012.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa CNPH, v. 1, p. 261-296, 1998.

BASSAN, J. S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)]**. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.

BEZERRA, J. E. F. *et al.* Enraizamento de estacas herbáceas de acerola com ácido indol-butírico e ácido alfa-naftaleno acético a baixas concentrações em duas épocas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 1-6, dez. 2002.

BRACHTVOGEL, E. L.; MALAVASI, U. C. Volume do recipiente, adubação e sua forma de mistura ao substrato no crescimento inicial de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert em viveiro. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n. 2, p. 223-232, 2010.

BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden.** 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2008.

BRONDANI, G. E. *et al.* Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 57, p. 29-38, jul-dez, 2008.

BRONDANI, G. E. *et al.* Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*: Sobrevivência e enraizamento em função das coletas e das estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 453-465, 2010.

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

CANDIDO, D. F. **Cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert: Multiplicação, senescência foliar e calogênese.** 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

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

COSTA, F. H. S. *et al.* Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 031-037, Março 2008.

CUNHA, A. C. M. C. da *et al.* Influência da presença ou ausência de folhas no enraizamento de miniestacas de corticeira-do-mato (*Erythrina falcata* Bentham) obtidas em sistema hidropônico. **Comunicado técnico**, Colombo, n. 89, p. 1-5, dez. 2003.

CUNHA, A. C. M.; WENDLING, I.; JUNIOR, L. S. Miniestaquia em Sistema de hidroponia e em tubetes de corticeira-do-mato. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.18, n.1, p. 85-92, jan-mar, 2008.

CURTI, A. R. *et al.* Efeito de BAP, isolado ou em combinação com outras citocininas, na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Resumos Congresso de Iniciação Científica e Pós-Graduação - Sul Brasil.** Florianópolis, 2010a.

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

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), 2014.

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

DIAS, P. C. *et al.* Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, out./dez. 2012.

DUTRA, T. R. *et al.* Substratos alternativos e métodos de quebra de dormência para produção de mudas de canafístula. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 1, p. 072-078, jan/fev, 2013.

ENDRES, L. *et al.* Enraizamento de estacas de Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) tratadas com ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 886-889, maio/jun. 2007.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1443-1449, set/out, 2004.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/ DEX/SISVAR, 2000. 145p.

FERREIRA, M. E. *et al.* Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp.. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2004.

FERREIRA, M. E. *et al.* 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, jan.-mar., 2010.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. **Miniestaquia aplicada a espécies florestais**. Revista Agro@mbiente On-line, Boa Vista, RR, v. 4, n. 2, p. 102-109, jul-dez, 2010.

FERRIANI, A. P. *et al.* Produção de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, n. 67, p. 257-264, jul/set. 2011.

FREITAS, J. A. A.; MARINHO, C. S. & FERREIRA, I. J. L. Goiabeiras Paluma, Pedro Sato e Cortibel 6 propagadas por miniestaquia e miniestaquia seriada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n.8, p. 1351-1356, agosto, 2013.

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

GROUT, B. W. W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and stress of transplanting. **Acta Horticulturae**, n. 230, p. 129-135, 1988.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice – Hall, 880 p., 2002.

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

JUNIOR, L. S. **Tipo de minijardim clonal e efeito do ácido indolbutírico na miniestaquia de *Grevillea robusta* A. Cunn. (Proteaceae)**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

JUNIOR, L. S.; QUOIRIN, M.; WENDLING, I. Miniestaquia de *Grevillea robusta* A. Cunn. a partir de propágulos juvenis. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 455-460, out-dez, 2008.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

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

LUDWIG-MULLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, 32:219–230, 2000

LUDWIG-MULLER, J.; VERTOCNIK A.; AND TOWN, C. D. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 56, No. 418, pp. 2095–2105, August 2005.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997. 200p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n. 1, p. 437-496, 1962.

NAKAGAWA, J. *et al.* Maturação e secagem de sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert (canafístula). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n. 1, p. 49-56, 2010.

NEWELL, C.; GROWNSI, D.; McCOMB, J. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 75: 131–142, 2003.

OLIVEIRA, M. C. de *et al.* Enraizamento de estacas para a produção de mudas de espécies nativas de mata de galeria. **Recomendação Técnica**, Brasília, n. 41, p. 1-4, out. 2001.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 40p.

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

POLETTI, I. *et al.* Uso de diferentes qualidades de turfa para produção de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, fev. 2007.

PORTELA, R. C. Q.; SILVA, I. L.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M. crescimento inicial de mudas de *Clitoria fairchildiana* Howard e *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taub. em diferentes condições de sombreamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 163-170, 2001.

PUROHIT, V. K., *et al.* *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69: 121–133, 2002.

ROCHA, M. A.C. *et al.* Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de Jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 30, n. 3, p. 769-774, set. 2008.

SANTOS, G. A. dos; XAVIER, A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M. L. de Uso da miniestaquia na propagação clonal de *Cedrela fissilis* (Cedro-rosa). In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTAS, 6., 2000, Porto Seguro. **Resumos técnicos...** Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera, 2000 a. p. 203.

SANTOS, G. A.; XAVIER, A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestacas de Jequitibá rosa, Sete cascas e Mogno (Resultados Preliminares). In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2000, Viçosa, MG. **Anais ...** Viçosa, MG : UFV, 2000b. p. 63.

SANTOS, G. A.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M. L.; WENDLING, I.; TITON, M. Miniestaquia na clonagem de Jequitibá rosa (*Cariniana estrellensis*). In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL, 1., 2001, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS: UFSM, 2001. p. 56-66. 1 CD-ROM.

SANTOS, J. P. *et al.* Enraizamento de estacas lenhosas de espécies florestais. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 293-301, jul./set., 2011.

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

SCHMILDT, E.R. *et al.* Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010.

SILVA, P. H. M. da; WICHERT, M. C. P.; GONÇALVES, J. L. de M. **Indicadores estatísticos sobre viveiros florestais no Brasil**. Piracicaba: IPEF, 2008. Disponível em: <<http://www.ipef.br/silvicultura/indicadores.asp>>.

SILVA, M. P. S *et al.* 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, out.-dez., 2012.

SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. for Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-231, 1957.

SOUZA, J. C. A. V. de. *et al.* Propagação Vegetativa de Cedro Australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 205-213, 2009.

SOUZA JUNIOR, L. *et al.* Miniestaquia de *Grevillea robusta* A. Cunn. a partir de propágulos juvenis. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 455- 460, out./dez. 2008

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2001.

TITON, M. *et al.* Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

VALERI, S. V. *et al.* Enraizamento de estacas de *Caesalpinea echinata* Lam. em hidroponia. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 2, abril-jun, p. 241-250, 2012.

VARSHNEY, A.; ANIS, M. Improvement of shoot morphogenesis *in vitro* and assessment of changes of the activity of antioxidant enzymes during acclimation of micropropagated plants of Desert Teak. **Acta Physiological Plant**, n. 34, p. 859–867, 2012.

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

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 (*Malus pumilla*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 128-132. 2007.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus spp.* por miniestaquia**. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa, 1999. 68 f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais).

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiro e produção de mudas**. Embrapa Florestas. Documentos, 79. Colombo, PR. 2002, 48p.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de corticeira-do-banhado por miniestaquia a partir de propágulos juvenis. **Comunicado técnico**, Colombo, n. 130, p. 1-5, out. 2005.

WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVA-MATE, 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Epagri, 2003. 1 CD-ROM.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A. *et al.* Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, 403-411, 2001.

XAVIER A., *et al.* Propagação vegetativa de Cedro rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, 27(2):139-143, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. Viçosa – MG: Ed UF.V, 2009. 272 p.

ZIETEMANN, C. & ROBERTO, S. R. Efeito de diferentes substratos e épocas de coleta no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. Paluma e Século XXI. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 29, n. 1, p. 031-036, abril, 2007.

## **ANEXOS**



## Anexo A – Síntese da metodologia do Capítulo I

Metodologia	Capítulo I					
	Rizogênese <i>in vitro</i> e aclimatização de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT					
	Efeito do AIB	Aclimatização	Meios nutritivos e AIB	Efeito AIB em WPM/2	Efeito sacarose, AIB e ágar	Aclimatização experim. Sacarose, AIB e ágar
<i>Delineamento experimental</i>	DIC <sup>1</sup>	DIC	DIC	DIC	DIC	DIC
<i>Arranjo fatorial</i>	Unifatorial	Bifatorial	Bifatorial	Bifatorial	Bifatorial	Unifatorial
<i>Tratamentos</i>	0, 5, 10 ou 20 µM AIB	0, 5, 10 ou 20 µM AIB Dias de cultivo (7, 14 e 21 dias)	MS, MS/2, WPM ou WPM/2  0 ou 10 µM AIB	0, 10 ou 20 µM AIB  Dias de cultivo (30 ou 60 dias)	0, 15 ou 30 g L <sup>-1</sup> sacarose  0 ou 10 µM AIB  0 ou 7g L <sup>-1</sup> ágar	Combinações entre concentrações de sacarose (0, 15 ou 30 g L <sup>-1</sup> ), ausência ou presença de AIB (0 ou 10 µM) e ausência ou presença de ágar (0 ou 7g L <sup>-1</sup> ) n fase de enraizamento <i>in vitro</i> (excetuando-se o tratamento com 10 µM AIB, 30 g L <sup>-1</sup> sacarose, sem ágar)
<i>Total de tratamentos</i>	4	12	8	6	12	11
<i>Nº de Repetições</i>	10	20	10	7	6	Variável (no mínimo 3 por tratamento)
<i>Explante (s)</i>	Brotações multiplicadas <i>in vitro</i>	Brotações enraizadas <i>in vitro</i>	Brotações multiplicadas <i>in vitro</i>	Brotações multiplicadas <i>in vitro</i>	Brotações multiplicadas <i>in vitro</i>	Brotações enraizadas <i>in vitro</i>
<i>Meio nutritivo</i>	MS + 30 g L <sup>-1</sup> vermiculita	Vermiculita + Mc Plant (1:1, v/v)	Conforme tratamento + 30 g L <sup>-1</sup> vermiculita	WPM/2 + 30 g L <sup>-1</sup> vermiculita	WPM/2 + 30 g L <sup>-1</sup> vermiculita	Vermiculita + Mc Plant (1:1, v/v)
<i>Avaliação efetuada ao(s)</i>	35 dias	7, 14 e 21 dias	30 dias	30 e 60 dias	30 e 60 dias	Semanal (até 56 dias)
<i>Variáveis-resposta analisadas</i>	Sobrevivência (%) Calos (%) Formação de raízes (%)	Sobrevivência (%) Nº folhas Nº folhas senescentes	Sobrevivência (%) Calos (%) Form. de raízes (%) Comp. Raízes (cm) Nº folhas	Form. de raízes (%) Comp. Raízes (cm) Raízes sec (%) Calos (%)	Sobrevivência (%) Form. de raízes (%) Nº raízes Comp. Raízes (cm) Raízes sec (%) Calos (%) Nº folhas Nº folhas senescentes	Sobrevivência (%) Nº folhas Nº folhas senescentes
<i>Teste de médias</i>	Tukey	Tukey	Scott-Knott	Scott-Knott	Scott-Knott	Scott-Knott