

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

Tatiane Lais Pires Andreolla

**RIZOGÊNESE *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS
MICROPROPAGADAS DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL)
TAUBERT**

Santa Maria, RS
2019

Tatiane Lais Pires Andreolla

**RIZOGÊNESE *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS
DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

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

Santa Maria, RS
2019

Andreolla, Tatiane Lais Pires
RIZOGÊNESE in vitro E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS
MICROPROPAGADAS DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT
/ Tatiane Lais Pires Andreolla.- 2019.
62 f.; 30 cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2019

1. canafístula 2. vermiculita 3. ágar 4. pH 5. lote de
semente I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II. Título.

Tatiane Lais Pires Andreolla

**RIZOGÊNESE *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS
DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

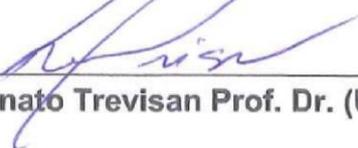
Aprovado em 22 de fevereiro de 2019



**Lia Rejane Silveira Reiniger Prof. Dr.^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**



Aline Ritter Curti Prof.^a Dr.^a (UFPEL)



Renato Trevisan Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,
Principalmente a minha mãe, avó e tias.

AGRADECIMENTOS

À minha família. A minha mãe, que sempre fez o possível por mim, pelo amor, pelo carinho. A minha irmã, com quem descobri mais uma forma de amor. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida;

Aos meus avós, tios, padrinhos e primos, pelo amor, cuidado, preocupação e carinho sempre dedicados a mim;

Ao Willian, pelo amor, parceria, compreensão e apoio;

Aos amigos, por todos os momentos de felicidade, apoio em todas as horas;

À professora Lia, pela oportunidade, ensino e a confiança que me concedeu e por toda a ajuda oferecida;

Aos colegas de Laboratório, sempre dispostos a ajudar, pelas dicas e pela convivência do dia-a-dia

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

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

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

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

RESUMO

RIZOGÊNESE *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

AUTORA: Tatiane Lais Pires Andreolla
ORIENTADORA: Lia Rejane Silveira Reiniger

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert, é uma espécie florestal nativa do Brasil, e devido a sua rusticidade e rápido crescimento apresenta grande importância ecológica para projetos de recuperação de áreas degradadas. O presente estudo propõe-se a otimizar as fases de rizogênese *in vitro* e de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium*. Na rizogênese *in vitro*, foram realizados quatro experimentos, em que as brotações micropropagadas foram avaliadas em relação ao efeito de meios de cultivo [compostos por meio nutritivo WPM reduzido à metade da concentração dos sais (WPM/2) na presença (30 g L⁻¹) ou ausência de vermiculita previamente autoclavada ou não], de valores de pH (4,8; 5,8; ou 6,8), de concentrações de ágar (4,0; 5,5 ou 7,0 g L⁻¹), e de dois lotes de sementes (lote 2010 ou lote 2012) doadores de explantes. Na aclimatização *in vitro* e *ex vitro* foram realizados dois experimentos, nos quais foram testados o efeito dos lotes doadores de explantes e do meio de cultivo utilizados na etapa de rizogênese. Os melhores resultados (média de 95%) de rizogênese ocorrem em meio de cultivo contendo vermiculita, indiferente de ser ou não previamente autoclavada, entretanto, nem os diferentes níveis de pH tampouco as concentrações de ágar testadas têm efeito significativo sobre a formação *in vitro* de raízes. Na aclimatização há diferenças no desempenho *in vitro* dos lotes de sementes que originaram os explantes iniciais, sendo o lote de 2012 o que mostra melhores resultados. A ausência de vermiculita no meio de cultivo da etapa de rizogênese propicia, na aclimatização, um maior incremento em altura e vigor, mas não interfere na sobrevivência das plantas. Dentre as conclusões obtidas podem-se destacar: o uso de vermiculita combinada ao meio nutritivo WPM/2 favorece a rizogênese *in vitro*; nem o pH nem o ágar influenciam a formação *in vitro* de raízes; a utilização do lote de sementes de 2012 possibilita maior desenvolvimento dos explantes comparado ao lote de 2010. Já na aclimatização, a ausência de vermiculita no meio de cultivo na etapa de rizogênese *in vitro* propicia um melhor desempenho, mas não interfere na sobrevivência das plantas micropropagadas; e há diferenças nos lotes de sementes que originaram os explantes iniciais, sendo o lote do ano 2012, superior. Finalmente, ressaltamos que, no presente trabalho, o incremento obtido na rizogênese em comparação aos trabalhos anteriores, além de ser consequência de uma acumulada experimentação, foi decorrente do emprego de um lote de sementes com desempenho superior e, talvez, da opção de não efetuar transferência das culturas para meio de cultivo fresco após os primeiros 30 dias de rizogênese *in vitro*, o que ocasionou, simultaneamente, maiores médias de formação e de comprimento das raízes formadas.

Palavras-chave: canafístula; vermiculita; ágar; pH; lote de sementes; rustificação.

ABSTRACT

RHIZOGENESIS *in vitro* AND ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED PLANTS OF *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

AUTHOR: Tatiane Lais Pires Andreolla

ADVISOR: Lia Rejane Silveira Reiniger

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert, is native forest species of Brazil, and due to its rusticity and fast growth presents great ecological importance for projects to recovery of degraded areas. The present study proposes to optimize the phases of *in vitro* rhizogenesis and *in vitro* and *ex vitro* acclimatization of *Peltophorum dubium* micropropagated plants. In the *in vitro* rhizogenesis, four experiments were carried out, in which the micropropagated buds were evaluated in relation to the effects of culture media [composed of WPM nutrient medium reduced to half the concentration of the salts (WPM/2) in presence (30 g L⁻¹) or absence of vermiculite previously autoclaved or not], of pH values (4,8; 5,8; or 6,8), in agar concentrations (4,0; 5,5 or 7,0 gL⁻¹), and two seed lots (lot 2010 or lot 2012) explants donors. Two experiments were performed in the *in vitro* and *ex vitro* acclimatization, in which the effect of explant donor lots and culture medium used in the rhizogenesis stage were tested. The best results (average of 95%) of rhizogenesis occur in culture medium containing vermiculite, regardless of whether or not it was previously autoclaved, however, neither the different pH levels nor the concentrations of agar tested have a significant effect on *in vitro* root formation. In acclimatization there are differences in the *in vitro* performance of the seed lots that originated the initial explants, being the 2012 lot the one that shows the best results. The absence of vermiculite in the culture medium of the rhizogenesis propitiate, in acclimatization, a greater increase in height and vigor, but does not interfere in the survival of the plants. Among the conclusions obtained, the following can be highlighted: the use of vermiculite combined with the nutritive medium WPM/2 favors *in vitro* rhizogenesis; neither the pH nor the agar influence the *in vitro* formation of roots; the use of the 2012 seeds lot allows greater development of the explants compared to the 2010 lot. In acclimatization, the absence of vermiculite in the culture medium in the *in vitro* rhizogenesis stage leads to a better performance, but does not interfere in the survival of the micropropagated plants; and there are differences in the seed lots that originated the initial explants, being the 2012 lot superior. Finally, we emphasize that, in the present work, the increment obtained in the rhizogenesis in comparison to previous works, besides being a consequence of an accumulated experimentation, was due to the use of a lot of seeds with superior performance and, perhaps, the option of not transferring the cultures to fresh culture medium after the first 30 days of *in vitro* rhizogenesis, which yielded, simultaneously, higher averages of formation and length of roots formed.

Keywords: canafistula; vermiculite; agar; pH; lot of seeds; rustification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -Formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo WPM/2 em função da ausência (A) ou presença (B) de vermiculita após 60 dias de cultivo *in vitro*.30
- Figura 2 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo WPM/2 acrescido de vermiculita após 60 dias de cultivo *in vitro*. Em A) Formação de raiz a partir do calo; em B) e C) formação de raízes secundárias com elevado comprimento.31
- Figura 3 -Formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo WPM/2, em função de diferentes lotes se sementes. Lote 2012 (A) lote 2010 (B) de vermiculita após 60 dias de cultivo *in vitro*.35
- Figura 4 -Sobrevivência em plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função do período de cultivo (7, 14, 21, 28, 35, 42, 42 ou 56 dias) independentemente do lote de sementes.42
- Figura 5 - Número de folhas formadas em plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre o lote de sementes e o período de cultivo (7, 14, 21, 28, 35, 42, 42 ou 56 dias). ...43
- Figura 6 -Porcentagem de folhas com sinais de senescência em plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função da interação entre o lote de sementes e o período de cultivo (7, 14, 21, 28, 35, 42, 42 ou 56 dias).44
- Figura 7-Etapas do processo de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. em função do lote de sementes, as quais originaram os explantes após germinação *in vitro*. A) 1º período de aclimatização *in vitro* (56 dias de cultivo), lote 2012; B) Comprimento de raiz de planta do lote 2012; C) Transferência das plantas do Lote 2012 para a casa de vegetação; D) 1º período de aclimatização *in vitro* (56 dias de cultivo), lote 2010; E) Comprimento de raiz de planta do lote 2010; F) Transferência das plantas do Lote 2010 para a casa de vegetação.47
- Figura 8 - Etapas do processo de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. A) 1º período de aclimatização *in vitro* (10 dias em sala de crescimento); B) 2º período de aclimatização *in vitro*, copos descobertos (20 dias em sala de crescimento); C) transferência das plantas micropropagadas para a casa de vegetação; D) 3º período de aclimatização *ex vitro* (plantas após 30 dias em casa de vegetação).52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias de porcentagem de formação de raízes, formação de raízes secundárias e formação de calos na base em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo in vitro, em função de diferentes meios nutritivos.....	28
Tabela 2 - Médias de porcentagem de comprimento de raízes, formação de raízes secundárias em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo in vitro, em função dos lotes de sementes.	34
Tabela 3 - Médias de porcentagem de sobrevivência e de número de folhas senescentes em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, em função dos lotes de sementes aos 30 dias de cultivo em casa de vegetação.....	45
Tabela 4- Médias de altura e número de folhas com sinais de senescência em plantas micropropagadas de <i>Peltophorium dubium</i> (Sprengel) Taubert no 1º período de aclimatização in vitro, após 10 dias em sala de cultivo com copos cobertos, em função dos meios de cultivo utilizados durante a rizogênese in vitro.	48
Tabela 5- Médias do número de folhas com sinais de senescência em plantas micropropagadas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert em função dos meios de cultivo utilizados durante o cultivo in vitro, após 10 dias em sala de cultivo com os copos plásticos descobertos e médias de altura em função dos meios de cultivo utilizados durante o cultivo in vitro, aos 30 dias de aclimatização em casa de vegetação.	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 A ESPÉCIE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT	14
2.2 CULTURA DE TECIDOS: MICROPROPAGAÇÃO	16
2.2.1 A micropropagação de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert	17
2.3 RIZOGÊNESE EM ESPÉCIES LENHOSAS	18
2.4 ACLIMATIZAÇÃO	21
3 CAPÍTULO I	23
RIZOGÊNESE <i>in vitro</i> EM BROTAÇÕES DE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.3.1 Obtenção dos explantes	24
3.3.2 Rizogênese <i>in vitro</i> em função da composição do meio de cultivo	25
3.3.3 Rizogênese <i>in vitro</i> em função do pH	25
3.3.4 Rizogênese <i>in vitro</i> em função do ágar	26
3.3.5 Rizogênese <i>in vitro</i> em função dos lotes de sementes	27
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
3.5.1 Rizogênese <i>in vitro</i> em função da composição do meio de cultivo	28
3.5.2 Rizogênese <i>in vitro</i> em função do pH	31
3.5.3 Rizogênese <i>in vitro</i> em função do ágar	32
3.5.4 Rizogênese <i>in vitro</i> em função do lote de sementes	33
3.6 CONCLUSÕES	35
4 CAPÍTULO II	36
ACLIMATIZAÇÃO <i>in vitro</i> E <i>ex vitro</i> DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT	36
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.3.1 Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> enraizadas em função dos lotes	37
4.3.2 Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> enraizadas em diferentes meios de cultivo	38
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.5.1 Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de brotações de <i>Peltophorum dubium</i> enraizadas em diferentes lotes de sementes	41
4.5.2 Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de plantas micropropagadas de <i>Peltophorum dubium</i> em função dos meios de cultivo	47
4.6 CONCLUSÕES	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Anteriormente à exploração, o bioma Mata Atlântica se estendia em toda a costa brasileira de forma contínua, tendo cerca de 1,3 milhões de quilômetros quadrados, e hoje apresenta somente 12,5% de sua cobertura vegetal original, a qual é encontrada na forma de pequenos fragmentos florestais isolados (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS – INPE, 2016). O bioma é constituído de uma vasta gama de ecossistemas diversos, sendo que cada um exerce uma função distinta, muito importante para a conservação da biodiversidade devido à combinação de riqueza de espécies e do alto número de espécies endêmicas (CUNHA; GUEDES, 2013).

O desmatamento iniciou com a colonização do Brasil, tornando o que era vegetação nativa em áreas de agricultura, pecuária e construções civil, com isso, hoje essa vegetação apresenta grandes áreas de fragmentação, o que resulta em diversos impactos ambientais. Quando uma área perde sua capacidade de resiliência, após sofrer um grande impacto, pode ser considerada uma área degradada, somada à deficiência no banco e chuva de sementes, falta de vetores de dispersão e polinização (MARTINS, 2013). Após a área ser degradada e não demonstrar capacidade de se auto-recuperar mostra-se essencial a restauração ativa, com estratégias que auxiliem no processo restaurativo neste processo (MARTINS et al., 2015).

Atualmente, é possível contar com diversas técnicas de restauração florestal as quais visam acelerar o processo restaurativo e maximizar os benefícios como, por exemplo, a semeadura direta, a chuva de sementes, a colocação de poleiros artificiais, o plantio de materiais vegetativos, plantio de mudas entre outros (RODRIGUES et al., 2010). Em meio a estes métodos, o mais usual é o plantio de mudas, por apresentar como característica principal o acelerado processo de sucessão natural, controle sobre a densidade do plantio, além de proteger o solo contra a erosão e ter sucesso na recuperação (ALMEIDA, 2016). No entanto, a obtenção de mudas de espécies nativas e em quantidade suficiente, mostra-se como uma restrição à formação de plantios de elevada diversidade.

A micropropagação, em particular, entra como uma alternativa para a conservação e utilização de espécies nativas para recuperação de áreas degradadas, visto que pode contornar limitações da reprodução sexuada, dentre as quais se podem destacar: a baixa disponibilidade de sementes, sua dormência e/ou recalcitrância em

relação ao armazenamento. Essa técnica da Cultura de Tecidos visa cultivar células, órgãos e/ou tecidos isolados da planta mãe, sob condições controladas e assépticas. Permite a multiplicação de genótipos selecionados e o cultivo de espécies de ciclo longo em curto período de tempo. Contudo, para obter sucesso na utilização desta técnica, é preciso realizar estudos para obter ajustes em etapas específicas, sendo que, no presente estudo, o foco das pesquisas foram as etapas de rizogênese e aclimatização.

A rizogênese é considerada uma etapa complexa da micropropagação, abrangendo fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos, os quais se relacionam com os fatores externos (MEIRA, 1999). A aclimatização, por sua vez, depende não apenas do enraizamento adventício obtido, mas, também, do número e da qualidade das raízes formadas, o que propiciará maior êxito no estabelecimento das mudas (GEORGE et al., 2008) em condições *ex vitro*.

Há que considerar, contudo, que para o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação de espécies lenhosas, com foco na restauração de ambientes degradados, é fundamental fazer uso de explantes dotados de variabilidade genética, como é o caso daqueles originados a partir da germinação asséptica de sementes. Além da variabilidade genética característica de lotes de sementes de espécies alógamas ou com sistemas mistos de cruzamento, esses propágulos são dotados de maior vigor e sanidade, devido ao estágio juvenil em que se encontram. Essa reserva de variabilidade genética adicionalmente tem a vantagem de permitir obter protocolos de micropropagação mais amplamente ajustados a diferentes populações da espécie em estudo, resultando em maior probabilidade de sucesso do protocolo (GOLLE et al., 2014).

Uma espécie nativa do Brasil, em particular, que tem potencial para uso em projetos de restauração é *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert, conhecida popularmente como canafístula, e que tem sua ocorrência natural descrita desde o nordeste até o sul. É frequente em todo o domínio da Floresta Estacional semidecidual, assim encontrada abundantemente em formações secundárias, no entanto, com poucos indivíduos de grande porte em floresta primária abrangendo o estrato dominante do dossel (LORENZI, 1992; DURIGAN et al., 1997; CARVALHO, 2002). É uma árvore caducifólia e classificada como pioneira (MARCHIORI, 1997) no que diz respeito ao estágio sucessional.

Analisando-se a importância e a necessidade da produção de mudas de espécies nativas para programas de reflorestamentos e recuperação de áreas degradadas, aliadas à capacidade que a técnica de propagação vegetativa *in vitro* possui, o presente estudo propõe-se a otimizar as fases de rizogênese *in vitro* e de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ESPÉCIE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

A família Fabaceae, da qual é integrante a espécie objeto do estudo do presente trabalho é estimada ter, no Brasil, cerca de 200 gêneros e 1500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008). *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert tem sua ocorrência natural descrita 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). É frequente em todo o domínio da Floresta Estacional semidecidual, assim encontrada abundantemente em formações secundárias, no entanto, com poucos indivíduos de grande porte em floresta primária abrangendo o estrato dominante do dossel (LORENZI, 1992; DURIGAN et al., 1997; CARVALHO, 2002).

É uma árvore caducifolia e pioneira (MARCHIORI, 1997). Pode atingir de 10 a 20 m de altura e o diâmetro à altura do peito pode variar de 35 a 90 cm; tronco em formato cilíndrico, levemente curvo e achatado com base acanalada, cujo fuste pode alcançar até 15 m de comprimento. As folhas são compostas, bipinadas, alternas, cada pina possui pares de folíolos elípticos-oblongos, opostos. (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003). O processo reprodutivo inicia-se entre 8 e 12 anos, com o florescimento acontecendo nos meses de dezembro a fevereiro, com flores de coloração amarelo ou alaranjadas, em panículas terminais (CARVALHO, 2002). O florescimento inicia-se na base da inflorescência, tem duração de 2 a 3 dias, com grãos de pólen altamente viáveis, aumentando a probabilidade de germinação e fertilização dos óvulos (MORAES, 2009).

É uma planta hermafrodita, classificada como alógama quanto ao seu sistema reprodutivo (CARVALHO, 2002). No entanto, em um estudo realizado com populações naturais de *P. dubium* no Estado de São Paulo, foi observado que os cruzamentos não ocorrem de forma aleatória, e, além disso, como a espécie não é auto incompatível, o comportamento é classificado como mista, combinando cruzamentos com autofecundações (MORI et al., 2013).

A polinização é feita por abelhas e diversos insetos, em sua maioria *Apis mellifera* (CARVALHO, 2002). Os frutos se formam de maneira abundante, sendo classificados como sâmaras, secas e indeiscentes, geralmente com quatro sementes, de formato oblongo e coloração castanho-esverdeado-claro (DONADIO; DEMATTÊ,

2000). As sementes apresentam forte dormência tegumentar, a qual instala-se durante a fase de desenvolvimento e/ou de maturação, resultando em dormência. A dispersão dos frutos é feita pelo vento (anemocórica), no entanto, os frutos permanecem na árvore por um período maior mesmo estando maduros (DURIGAN et al., 1997; NAKAGAWA et al., 2010).

Quando a semente é dispersa em ambiente natural, a superação de dormência é estimulada pelo aumento da temperatura do solo, onde há abertura de clareiras na floresta. No caso da produção de mudas, é recomendado o emprego de tratamentos de escarificação mecânica, cortando-se o tegumento na região oposta àquela em que ocorre a protrusão da radícula (CARVALHO, 2003); ou, ainda, a imersão em água quente. Ambos os tratamentos de superação da dormência proporcionam um menor tempo de emergência das plântulas e mudas de melhor qualidade (DUTRA et al., 2013).

A espécie apresenta um bom desempenho silvicultural na produção de madeira, com uma produtividade volumétrica máxima registrada de 19,60 m³ ha/ano (CARVALHO, 2003). Sua densidade é de aproximadamente de 0,69 g/cm³, rígida e de longa durabilidade, possui moderada resistência ao apodrecimento e elevado poder calorífico (4.755 kcal/kg). Mostra potencial de uso em indústrias madeireiras, fabricação de móveis, construção civil, dormente, como também uma alternativa em projetos paisagísticos (REITZ et al., 1978; LORENZI, 2001), devido ao efeito ornamental de suas panículas amarelas, assim como, também, em decorrência da sombra produzida pela sua copa ampla e globosa.

Possui características como rápido crescimento e rusticidade (DONADIO; DEMATTÊ, 2000), ocorrendo em diversos tipos de solo, mostrando capacidade de fixação de nitrogênio na forma de resíduos vegetais compostos que disponibiliza para o ecossistema (MARCHIORI, 1997; BERTOLINI et al., 2015). Esses atributos a tornam uma ótima alternativa para a composição de reflorestamentos mistos de áreas degradadas e recomposição de mata ciliar (CARVALHO, 2002). Entretanto, para a implantação desses projetos é fundamental contar com mudas de espécies florestais nativas dotadas de qualidade genética, fisiológica e sanitária, as quais podem ser obtidas a partir do desenvolvimento de protocolos adequados. Nesse sentido, a micropropagação destaca-se como técnica que apresenta potencialidade para esse fim.

2.2 CULTURA DE TECIDOS: MICROPROPAGAÇÃO

As técnicas de Cultura de Tecidos possibilitam a manutenção, a propagação e a regeneração de algumas partes da planta, em ambientes livres de micro-organismos e em condições controladas (*in vitro*) (TERMIGNONI, 2005). Fundamentam-se na teoria da totipotência das células vegetais, em que os seres multicelulares possuem, em cada uma de suas células, toda a informação genética necessária para a formação de um indivíduo completo (RIBEIRO; BASTOS, 2008). Abrange várias técnicas mediante as quais um fragmento de tecido vegetal, denominado explante, é isolado e cultivado, de forma asséptica em um meio nutritivo sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade.

A micropropagação, em particular, é uma das técnicas mais difundidas da Cultura de Tecidos, sendo promissora para a clonagem massal de genótipos superiores, bem como para conservação *ex situ* de germoplasma de espécies em risco de extinção (JOHNSON et al., 2012; MA et al., 2012). Além disso, a técnica permite a propagação em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, além de assegurar um material livre de patógenos (SARTORETTO et al., 2008). Dentre as limitações são mencionadas, uma alta interferência de contaminantes (como bactérias e fungos), em alguns casos, em especial em lenhosas, oxidação dos explantes por compostos fenólicos e sensibilidade às trocas gasosas (RODRIGUES et al., 2012), além do custo relativamente elevado (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

A micropropagação envolve, em geral, quatro estágios de desenvolvimento, que consistem em: estabelecimento, multiplicação, rizogênese e aclimatização (BUNN; TAN, 2002). A fase de estabelecimento é iniciada com a seleção de explantes, sua desinfestação superficial e cultivo em meio nutritivo, sendo que a regeneração poderá ocorrer por duas vias principais: organogênese ou embriogênese somática (SNYMAN et al., 2011).

Para que haja êxito no cultivo *in vitro* dos explantes previamente selecionados, utilizam-se meios nutritivos que possam atender às necessidades de cada espécie vegetal, utilizando-se determinadas formulações, e, quando necessário, empregando-se reguladores de crescimento (DODDS; ROBERTS, 1995). As condições *in vitro* reproduzem àquelas necessárias para o desenvolvimento da planta no ambiente, como energia proveniente da luz, água, elementos minerais, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.2.1 A micropropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Nosso Grupo de Pesquisa (Desenvolvimento de Germoplasma) realiza desde meados dos anos 2000 estudos relacionados à micropropagação de *Peltophorum dubium*, contemplando todas as suas etapas (BASSAN et al., 2006; FLORES et al., 2011; CURTI et al., 2010 a; CURTI et al., 2010 b; CURTI, 2011; CANDIDO, 2013; CURTI, 2014; CURTI; REINIGER, 2014; REINIGER et al., 2016; GOMES, 2017), mostrando a viabilidade dessa técnica para a produção de mudas.

Os primeiros estudos foram focados no estabelecimento *in vitro*, sendo que, para esta etapa, o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi considerado mais eficiente que o “Woody Plant Medium – WPM” (LLOYD; MCCOWN, 1980), e em ambos, os segmentos apicais caulinares e nodais foram igualmente eficientes (BASSAN et al., 2006). A seguir, utilizando-se os segmentos apicais caulinares, foram testadas cinco concentrações do meio nutritivo MS (50, 75, 100, 125 e 150 %), sendo verificado que a concentração total de sais é mais adequada para o seu estabelecimento *in vitro* (FLORES et al., 2011).

Seguindo com os estudos, passando para a fase da multiplicação *in vitro* de *Peltophorium dubium*, experimentos empregando 6-Benzilaminopurina (BAP), associada ou não a outras citocininas, em meio nutritivo MS, revelaram não haver efeito na emissão de brotações em segmentos apicais caulinares (CURTI et al., 2010 a). No entanto, em outro trabalho, a suplementação da citocinina Thiadiazuron (TDZ) a 10 μM , no meio nutritivo MS, associada a 0,015 μM da auxina Ácido α -Naftaleno Acético (ANA), resultou em 73 % de brotações adventícias, mas, simultaneamente, com 96,9 % de calogênese, o que, entretanto, não comprometeu o desenvolvimento das brotações (CURTI et al., 2010 b).

Estudos adicionais foram realizados, posteriormente, em relação à organogênese indireta, sendo que os maiores percentuais de calogênese foram encontrados em segmentos cotiledonares (100 %) e, depois, em hipocótilos (76,6 %) e, em ambos na concentração de 20 μM da auxina Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), já nos segmentos radiculares, as maiores porcentagens foram encontradas na concentração de 40 μM , resultando em 6,6 % de calogênese (CANDIDO, 2013).

Em relação à rizogênese *in vitro*, inicialmente o nosso grupo obteve uma média de apenas 36,78 % na formação de raízes a partir de explantes cultivados por 60 dias em meio de cultivo a base de meio nutritivo MS, suplementado com 10 μM da auxina ácido indolbutírico (AIB), vermiculita e ágá (CURTI; REINIGER, 2014). Posteriormente, houve um pequeno incremento na rizogênese (média de 44,43 %) mediante o uso do meio nutritivo WPM/2 acrescido de 30 cm^3 de vermiculita e 7 gL^{-1} de ágá, na ausência de sacarose ou auxina. Além disso, foi considerado que a adição de o ácido indol-3-butírico e ágá ao meio, na ausência de sacarose, resultaram em um sistema radicular de melhor qualidade nas brotações micropropagadas de *P. dubium* (REINIGER et al., 2016). Dando continuidade aos estudos relacionados à rizogênese, foi verificado que valores de pH e concentrações de ágá em meio nutritivo WPM/2 não exercem influência sobre a formação *in vitro* de raízes de *P. dubium*. Contudo, foi observado um considerável incremento na média de rizogênese (71,44 %) até então obtida, a qual foi registrada em meio nutritivo WPM/2 na ausência de sacarose e na presença de vermiculita (GOMES, 2017).

O presente trabalho constitui uma contribuição para o protocolo de micropropagação, mais especificamente na etapa de rizogênese e na aclimatização subsequente.

2.3 RIZOGÊNESE EM ESPÉCIES LENHOSAS

A eficiência na formação de raízes é controlada geneticamente, podendo haver diferenças entre espécies e dentro de espécies, tornando a capacidade natural de enraizamento adventício um processo complexo (DAMIANI et al., 2009). Além disso, é frequente não se ter conhecimento adequado dos fenômenos envolvidos no processo de formação de raízes adventícias, de como isolar e caracterizar os fatores que os controlam, em virtude de sua complexidade e da grande interação existente entre eles (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

No processo de micropropagação, igualmente, a rizogênese *in vitro* é bastante complexa, abrangendo fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos, os quais se relacionam com os fatores externos (MEIRA, 1999). Dessa maneira, efetua-se o redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais totipotentes para a formação de meristemas que resultarão no novo sistema radicial (ALFENAS et al., 2009).

Nos tecidos propagados vegetativamente pode haver dois tipos de formação de raízes adventícias: a organogênese direta, na qual a formação das raízes ocorre diretamente das células próximas do sistema vascular, e a organogênese indireta, na qual há formação de calos, antes da formação das raízes adventícias (HARTMANN et al., 2011).

A fase de enraizamento na micropropagação constitui-se em transferir as partes áreas produzidas na fase de multiplicação para um meio nutritivo que seja adequado para a indução de raízes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A seguir, o enraizamento ocorre de uma a três semanas, podendo ser dividido em três fases: indução, iniciação e alongamento das raízes. Na primeira fase, a capacidade para a formação da raiz é determinada; na segunda, são notórias as mudanças citológicas; e, em seguida, na última fase, é possível observar histologicamente o primórdio da raiz, sucedendo-se o desenvolvimento das raízes (GEORGE, 1996).

O obstáculo em desenvolver um protocolo eficiente de micropropagação está em definir as condições *in vitro* na qual as fases possam ocorrer e se desenvolver, sem precisar adicionar outra manipulação entre uma fase e outra (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Nesse sentido, vários fatores influenciam o enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, como a juvenilidade do material vegetal, as condições intrínsecas à planta matriz, o meio nutritivo, os níveis de auxina endógena, a presença de reguladores de crescimento, presença de poliaminas e de substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, a nutrição, as condições ambientais de crescimento das brotações *in vitro*, entre outros (SOUZA; PEREIRA, 2007).

A capacidade de enraizamento pode ser reduzida à medida que se utiliza material menos juvenil, já que essa capacidade diminui quando a planta se aproxima da fase adulta (HARTMANN et al., 2002). Ocorre devido as alterações na capacidade morfogenética dos tecidos quando passam do estado juvenil para o estado adulto, nas espécies lenhosas (SOUZA; PEREIRA, 2007). Em relação ao meio nutritivo, os sais mineirais empregados na sua composição podem influenciar no sistema de enraizamento. Os meios nutritivos mais utilizados na propagação *in vitro* de espécies lenhosas são os meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), o primeiro por conter uma maior concentração de sais pode inibir o enraizamento, enquanto o segundo por possuir uma menor concentração de sais, pode resultar em melhores resultados de enraizamento em algumas espécies lenhosas (ALOUFA, 2003).

O pH do meio nutritivo também pode influenciar nesse processo, dependendo da espécie em estudo (GEORGE et al., 2008). Os elementos minerais são absorvidos em diferentes quantidades dependendo das suas exigências nutricionais e quando bem ajustados, a acidez ou a basicidade, influenciam no maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante (RIBEIRO et al., 1997). Um valor de pH baixo conduz à competição do H^+ com os nutrientes catiônicos (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}) pelas células dos tecidos radiculares e, em valores mais elevados de pH, diminui a absorção de nutrientes aniônicos como o NO_3^- , $H_2PO_4^{2-}$, Cl^- , e MoO_4^{2-} (TORRES; CALDAS, 1990). O pH pode igualmente afetar a consistência do meio nutritivo; no momento em que é autoclavado, se o pH estiver abaixo de 4,5 sofre um processo de hidrólise do ágar, impedindo a polimerização ao esfriar (ROMBERGER; TABOR, 1971, GEORGE et al., 2008). O valor de pH mais utilizado é em torno de 5,7 para as culturas propagadas *in vitro* (XAVIER et al., 2009), pois é, um valor que favorece uma alta disponibilidade de nutrientes (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em condições naturais, esses valores são próximos aos que envolvem as células vegetais (CANHOTO, 2010).

Os nutrientes das plantas podem ser fornecidos por meio líquido. No entanto, o crescimento em meio líquido pode ser retardado e o desenvolvimento afetado devido à privação do oxigênio e hiperidratação (PIATCZAK et al., 2005). Existem produtos que podem deixar o meio de cultura semi-sólido, entre eles estão o ágar, agarose, gomas de gelado, entre outros. O ágar é o agente geleificante mais utilizado em meios de cultura semissólidos (XAVIER et al., 2013). É um polissacarídeo extraído de algas que forma um gel quando solubilizado, que pode se ligar à água e adsorver os compostos; quanto maior a concentração, maior será a ligação da água (PIERIK, 1997). Possui características que explicam a sua grande utilização nos meios de cultura, entre elas, a natureza não tóxica, estabilidade, transparência e é metabolicamente inativo (FERREIRA, 2015). Concentrações de ágar entre 5 e 7 g L⁻¹ são geralmente utilizadas, porém concentrações não adequadas podem levar a hiperidricidade do material (GEORGE et al., 2008).

No entanto, na sua presença tem-se observado, muitas vezes, a formação de um sistema radicular de baixa qualidade, raízes desprovidas de pelos radiculares (VIAGANÓ et al., 2007). Há que se considerar, também, que o ágar é um dos componentes de maior custo que são adicionados ao meio nutritivo, motivo pelo qual

é recomendado otimizar a quantidade utilizada ou sua substituição (LUCYSZYN et al., 2007).

Para superar essas dificuldades e obter um melhor desenvolvimento das raízes, são, muitas vezes, empregados substratos para melhorar a aeração e favorecer o desenvolvimento das raízes adventícias. O uso de materiais porosos melhora o ambiente no qual se encontra a raiz, aumenta a concentração de oxigênio ao redor do sistema radicular, absorção de nutrientes e absorção de água pelas plântulas, melhorando o desenvolvimento do sistema radicular (XIAO et al., 2011). Dentre esses substratos, tem sido avaliada a vermiculita, devido à elevada porosidade e boa retenção de umidade, uniformidade na composição química e granulométrica, além de ser inodora e atóxica (MARTINS et al., 2009). As raízes desenvolvidas nesse tipo de substrato possuem pêlos absorventes, córtex mais compacto e espaços intercelulares menores, possuindo semelhança com as raízes obtidas por meio de sementes, essas características se tornam importantes para garantir uma alta taxa de sobrevivência na aclimatização de plantas (SIMÕES, 2000; YU et al., 2000; VIEIRA et al., 2007). Assim, o êxito no enraizamento não depende apenas do percentual de raízes formadas, mas também do número e da qualidade dessas raízes, que irão garantir uma melhor aclimatização das mudas (GEORGE et al., 2008).

2.4 ACLIMATIZAÇÃO

O processo de transferência das plantas propagadas *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, demanda algumas alterações, que têm como propósito a redução no estresse causado pelas diferenças entre os ambientes (SILVEIRA et al., 2013). Por isso, é indispensável uma adaptação mais gradual para uma atmosfera mais natural, a qual é denominada aclimatização (DEB; IMCHEN, 2010).

É também considerada a passagem das plantas de uma condição heterotrófica para a condição autotrófica (HARTMANN et al., 2011). As plantas cultivadas no ambiente *in vitro* geralmente dispõem de alta umidade relativa, baixa intensidade de luz e têm as trocas gasosas reduzidas, o que ocasiona baixas taxas de transpiração e fotossíntese (SHIN et al., 2013). Adicionalmente, sofrem alterações na cutícula, nos depósitos de cera, e nas células do mesofilo e dos estômatos das folhas, tornando-se suscetíveis à rápida perda de água por transpiração (COSTA et al., 2009). Assim que passam para o ambiente *ex vitro* são expostas a fatores abióticos (intensidade de luz,

condições de umidade, alteração de temperatura) como também ao estresse biótico (microflora do solo), que afetam o vigor das plantas provocando o aumento na mortalidade no decorrer da aclimatização, e reduções no estabelecimento e na sobrevivência em ambiente natural (CHANDRA et al., 2010; DEB; IMCHEN, 2010; PÁDUA et al., 2014).

A mortalidade dá-se em virtude do sistema radicular das plantas produzidas *in vitro* ter sua funcionalidade limitada, apresentar poucos pelos radiculares, responsáveis pela absorção de íons e água do solo (DUTRA; WENDILING, 2010). Somado ao fato do contato entre o solo e a raiz poder vir a ser interrompido, agravando a perda de água das plantas recém transplantadas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

3 CAPITULO I

RIZOGÊNESE *IN VITRO* EM BROTAÇÕES DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com o protocolo de micropropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, otimizando a etapa de rizogênese *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da vermiculita sobre a rizogênese *in vitro*.
- Avaliar o efeito de diferentes valores de pH no meio nutritivo sobre a rizogênese *in vitro*.
- Estudar o efeito de diferentes concentrações de ágar no meio nutritivo sobre a rizogênese *in vitro*.
- Comparar dois lotes de sementes de *Peltophorum dubium* em relação à rizogênese *in vitro*.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no laboratório e estruturas de apoio do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS. Os lotes de sementes que foram utilizados foram coletados e armazenados pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, e são provenientes da produção dos anos de 2010 e 2012. Na UFSM, permaneceram armazenadas na geladeira sob temperatura de 8-10°C até seu emprego nos experimentos, que foram realizados em 2017 e 2018.

3.3.1 Obtenção dos explantes

Primeiramente, as sementes de ambos os lotes 2010 e 2012 foram submetidas à superação de dormência através de um corte feito na região oposta ao embrião, após passaram por processo de desinfestação superficial em câmara de fluxo laminar, composto por imersão em solução de etanol a 70 % (v/v) por 30 s e, após, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 % (v/v) por 15 min, seguindo-se, então, um triplo enxágue em água destilada e autoclavada. Na germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio ágar-água a 0,7 % (p/v), previamente autoclavado por um período de 40 min a 120 °C e 1 atm. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

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

Para os experimentos: rizogênese *in vitro* em função da composição do meio de cultivo, rizogênese *in vitro* em função do pH e rizogênese *in vitro* em função do ágar foi utilizado somente o lote de sementes do ano de 2012.

3.3.2 Rizogênese *in vitro* em função da composição do meio de cultivo

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, sendo os tratamentos constituídos por três meios de cultivo, a saber: meio nutritivo WPM/2 + 30 cm³ de vermiculita não autoclavada, meio nutritivo WPM/2 + 30 cm³ de vermiculita autoclavada ou somente meio nutritivo WPM/2 (ausência de vermiculita). Cada tratamento foi aplicado em oito repetições, cada uma composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo WPM/2 e três brotações obtidas a partir dos explantes conforme descrito anteriormente (3.3.1).

O meio nutritivo foi acrescido de 50 mgL⁻¹ de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão de 7 gL⁻¹ de ágar, e, posteriormente, adicionada a vermiculita conforme o tratamento. A seguir, os frascos contendo os meios de cultivo foram esterilizados por meio da autoclavagem a 120°C e 1 atm de pressão por 15 min. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel-alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

3.3.3 Rizogênese *in vitro* em função do pH

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, sendo os tratamentos constituídos pelos valores de pH (4,8; 5,8; ou 6,8) a que o meio nutritivo foi ajustado, na presença (30 cm³) de vermiculita. Cada tratamento foi aplicado em oito repetições, cada uma composta por um frasco

de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo WPM/2 e três brotações obtidas a partir dos explantes conforme descrito anteriormente (3.3.1).

O meio nutritivo foi acrescido de 50 mgL^{-1} de mio-inositol, sendo o pH ajustado conforme o tratamento antes da inclusão de 7 gL^{-1} de ágar, e, posteriormente, adicionada a vermiculita. A seguir, os frascos contendo os meios de cultivo foram esterilizados por meio da autoclavagem a 120°C e 1 atm de pressão por 15 min. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel-alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

3.3.4 Rizogênese *in vitro* em função do ágar

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, sendo os tratamentos constituídos pelas concentrações de ágar (4,0; 5,5 ou $7,0 \text{ gL}^{-1}$) a que o meio nutritivo foi ajustado, na presença (30 cm^3) de vermiculita. Cada tratamento foi aplicado em oito repetições, cada uma composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo WPM/2 e três brotações obtidas a partir dos explantes conforme descrito anteriormente (3.3.1).

O meio nutritivo foi acrescido de 50 mgL^{-1} de mio-inositol, sendo o pH ajustado a 5,8 antes da inclusão de ágar conforme o tratamento, e, posteriormente, adicionada a vermiculita. A seguir, os frascos contendo os meios de cultivo foram esterilizados por meio da autoclavagem a 120°C e 1 atm de pressão por 15 min. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel-alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

3.3.5 Rizogênese *in vitro* em função dos lotes de sementes

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso em arranjo unifatorial, sendo os tratamentos dois lotes de sementes (Lote 2010; Lote 2012). Cada tratamento foi aplicado a 25 repetições, cada uma composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo WPM/2 e uma brotação obtida a partir dos explantes conforme descrito anteriormente (3.3.1).

Ao meio nutritivo utilizado foi acrescido 50 mgL^{-1} de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de 7 gL^{-1} de ágar, e, posteriormente, adicionada a vermiculita. Os frascos contendo os meios nutritivos foram esterilizados por meio da autoclavagem a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, sendo analisadas as seguintes variáveis: formação *in vitro* de raízes (%), comprimento de raízes (cm), formação de raízes secundárias (%) e brotações que formaram calo na base (%).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.5.1 Rizogênese *in vitro* em função da composição do meio de cultivo

Em relação à formação *in vitro* de raízes ($p = 0,02424$; $IV = 2,98\%$) houve efeito significativo da vermiculita. O tratamento contendo vermiculita (30 cm^3) previamente autoclavada forneceu o melhor resultado e diferiu significativamente da testemunha (Tabela 1). O mesmo comportamento foi verificado na formação de raízes secundárias ($p = 0,0000$; $IV = 3,68\%$), porém neste caso a presença de vermiculita, independentemente da autoclavagem, foi superior à ausência (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias de porcentagem de formação de raízes, formação de raízes secundárias e formação de calos na base em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes meios nutritivos.

Tratamento	Formação de raízes (%)	Raízes secundárias (%)	Calos na base (%)
WPM/2+VA***	95,75 a*	83,00 a	57,75 b
WPM/2+VN	91,90 ab	79,00 a	61,87 b
WPM/2	66,37 b	24,75 b	28,87 a
Média	84,46	62,25	49,49
IV**	2,98	3,68	3,78

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. ** IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições. ***WPM/2+VA = 30 ml de meio nutritivo + 30 cm^3 de vermiculita pré-autoclavada; WPM/2+VN = 30 ml de meio nutritivo + 30 cm^3 de vermiculita não autoclavada.

A maior formação de raízes primárias e secundárias obtida no presente ensaio pode ser explicada pela presença da vermiculita, que proporciona uma maior aeração no meio, alta capacidade de troca catiônica e retenção de água, contribuindo para uma formação de raízes mais satisfatória (CALDAS, 1990). A melhor formação de raízes na presença do substrato pode também ser observada na Figura 1.

De maneira semelhante, outro estudo que analisou a rizogênese *in vitro* de *P. dubium*, a maior porcentagem de formação de raízes foi obtida com a combinação de

vermiculita e ágar adicionados ao meio nutritivo MS, após 60 dias de cultivo *in vitro* das brotações, condição que resultou em uma média de apenas 36,78 % de brotações com raízes. Além da maior formação de raízes, essa combinação proporcionou melhor qualidade do sistema radicular, pela maior formação de raízes secundárias (CURTI; REINIGER, 2014). A seguir, em outro estudo realizado pelo nosso grupo, também analisando a rizogênese *in vitro* de *P. dubium*, porém com o meio nutritivo WPM/2 acrescido de vermiculita e ágar, foram obtidas médias de 44,43 % de formação de raízes e de 27,40 % de formação de raízes secundárias (REINIGER et al., 2016) decorridos de cultivo *in vitro*.

Igualmente, a formação de calos na base do explante ($p = 0,0050$; $IV = 3,78\%$) foi afetada significativamente pela vermiculita, no entanto, sendo que o melhor resultado ocorreu na ausência do substrato (Tabela 1), independentemente da autoclavagem. Assim, a vermiculita favoreceu tanto a calogênese como o enraizamento *in vitro*. A ocorrência simultânea de calos e raízes, pode ser explicada pelo fato de ambos envolverem o processo de divisão celular e dependerem de condições ambientais favoráveis (HARTMANN et al., 2002).

Em outro estudo sobre a rizogênese *in vitro* nessa espécie, foi obtida ainda maior calogênese (média geral de 96,22 %), a qual ocorreu, porém, tanto na ausência como na presença de vermiculita no meio de cultivo que incluía o meio nutritivo MS (CURTI; REINIGER, 2014). Por outro lado, em outro trabalho, em que foi utilizado, desta feita, o meio nutritivo WPM/2 também acrescido de vermiculita, foi observada menor formação de calos (33,94 %) (REINIGER et al., 2016). As diferenças de magnitude observadas nas médias dos dois trabalhos podem ser atribuídas tanto ao meio nutritivo como aos lotes de *P. dubium* testados.

Figura 1 - Formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo WPM/2 em função da ausência (A) ou presença (B) de vermiculita após 60 dias de cultivo *in vitro*.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.
Barra = 1 cm.

Para a variável comprimento médio de raízes ($p = 0,2861$; $IV = 7,59\%$), não foi verificado efeito da vermiculita, sendo obtida uma média geral de 3,09 cm. Esse tamanho de raiz pode ser considerado excessivo haja vista dificultar a manipulação das plantas micropropagadas. Nesse sentido, alguns estudos têm indicado que o comprimento médio adequado de raízes é em torno de 2 a 3 cm, porém havendo possibilidade das raízes enovelarem-se entre si, dependendo do diâmetro do frasco e do número de explantes cultivados (ROCHA et al., 2006). De maneira semelhante, foi obtida uma média igualmente elevada (3,78 cm) de comprimento da raiz em outro estudo com *P. dubium*, durante um cultivo de 60 dias, em que foi também empregada a combinação de vermiculita e ágar adicionados ao meio nutritivo WPM/2 (REINIGER et al., 2016). Já em trabalho realizado com *Handroanthus chrysotrichus*, em que também foi utilizado o meio WPM/2 acrescido de vermiculita, foi obtida uma média de comprimento de raiz de 2,13 cm (RABAIOLLI et al., 2017).

3.5.2 Rizogênese *in vitro* em função do pH

Não houve efeito significativo do pH sobre nenhuma das variáveis avaliadas, observando-se uma elevada formação de raízes principais (88,75 %), de raízes secundárias (60,70 %) e de calos (66,29 %) na base das brotações (Figura 2 – A). As brotações apresentaram uma média de 2,62 cm de comprimento das raízes, o que proporcionou também um adequado desenvolvimento da parte aérea (Figura 2 - B e C).

Conforme o resultado das variáveis analisadas, a espécie se comporta de maneira satisfatória no intervalo de pH de 4,8 a 6,8 que abrange a faixa do ácido ao neutro, em decorrência disso a espécie pode ser indicada para solos apresentando diversos níveis de pH. Isso confere labilidade a *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, fazendo com que possa ser utilizada tanto na recuperação de áreas degradadas, como naquelas com altos teores elementos tóxicos.

Figura 2 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo WPM/2 acrescido de vermiculita após 60 dias de cultivo *in vitro*. Em A) Formação de raiz a partir do calo; em B) e C) formação de raízes secundárias com elevado comprimento, independentemente do pH utilizado.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.
Barra = 1 cm.

Em outro trabalho com *P. dubium* (GOMES, 2017) em que foi empregado o mesmo lote de sementes (lote 2012), também não houve efeito significativo dos

valores de pH sobre as variáveis avaliadas, no entanto, foram observadas médias muito reduzidas de formação de raízes principais (3,99 %), secundárias (0,79 %) e de comprimento de raízes (0,12 cm), comparadas àquelas obtidas no presente estudo. Provavelmente, essas diferenças se devem ao fato de que, no presente estudo, optou-se por não realizar transferência das brotações para meio nutritivo fresco após os primeiros 30 dias de cultivo *in vitro*, por que se observou que as raízes já estavam demasiadamente compridas e que uma manipulação poderia acarretar em quebras das raízes.

Por fim, no estabelecimento *in vitro* de explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), o pH 5,0 foi mais adequado para o crescimento *in vitro*, proporcionando formação de maior número de médio de gemas (CABRAL, 2012).

3.5.3 Rizogênese *in vitro* em função do ágar

As diferentes concentrações de ágar que foram analisadas no presente experimento não tiveram efeito significativo sobre as variáveis analisadas. Como observado no experimento anterior, houve médias elevadas nas variáveis formação de raízes (95,75 %), formação de raízes secundárias (77,41 %), comprimento das raízes (2,93 cm) e formação de calos (69,04 %) na base das brotações.

Em outro estudo realizado com *P. dubium*, no qual foram estudadas diferentes concentrações de ágar na presença ou ausência de vermiculita, as concentrações de ágar também não mostraram efeito sobre a formação de raízes e de raízes secundárias, contudo foram obtidas médias inferiores àquelas observadas no presente trabalho (3,17 % na ausência e 17,46 % na presença de vermiculita em relação às raízes principais, e 4,76 % de raízes secundárias) (GOMES, 2017). Igualmente, em *Handroanthus chrysotrichus*, o ágar foi dispensável na indução das raízes, em especial as secundárias (RABAIOLLI et al., 2017).

De maneira contrária, em estudos anteriores efetuados com *P. dubium*, os melhores resultados indicaram que a combinação mais eficiente para a rizogênese (média de 44,43 %) é aquela que inclui 7 g L⁻¹ de ágar adicionados ao meio nutritivo WPM/2 combinados com 30 cm³ de vermiculita, na ausência de sacarose e da auxina AIB, a qual promove, simultaneamente, melhor qualidade do sistema radicular (REINIGER et al., 2016). Igualmente, na multiplicação *in vitro* de *Eremanthus incanus*

(Candeia), os melhores resultados foram verificados na presença de 6 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose (MIRANDA et al., 2018).

3.5.4 Rizogênese *in vitro* em função do lote de sementes

Para as variáveis formação de raízes ($p = 0,0848$; $IV = 2,86 \%$) não houve efeito significativo, no entanto, pode-se verificar uma média geral elevada (88 %) de formação de raízes. Foi observada uma média elevada em relação aos trabalhos anteriores, onde o lote 2012 foi observada 59,86% de formação de raízes (GOMES, 2017). Enquanto, o lote 2010 houve 44,43% de formação de raízes (REINIGER et al., 2016).

Houve efeito significativo do lote para a variável comprimento de raízes ($p = 0,002$; $IV = 7,00 \%$), sendo verificado um maior desenvolvimento do lote 2012 comparativamente ao da produção 2010 (Tabela 2). Os dois lotes já haviam sido avaliados em trabalhos anteriores (GOMES, 2017; CURTI, 2014) realizados pelo nosso grupo com a espécie, nas mesmas condições ambientais e composição de meio nutritivo, contudo, as melhores médias observadas (2,79 e 1,00 cm respectivamente) foram inferiores àquela registrada no presente trabalho.

Provavelmente, a diferença observada em relação à primeira média (2,79 cm) se deve ao fato de que, no presente estudo, optou-se por não realizar transferência das brotações para meio nutritivo fresco após os primeiros 30 dias de cultivo *in vitro* haja vista que as raízes já estavam demasiadamente compridas e a manipulação poderia acarretar em quebras. Já a reduzida média (1,00 cm) observada no trabalho de 2014 pode ser atribuída ao lote empregado (2010), cujo desempenho *in vitro* demonstrou ser inferior ao da produção de 2012. Conforme será apresentado na sequência, foi possível observar, em todas as variáveis, que as maiores médias foram obtidas com os explantes provenientes do lote de sementes do ano de 2012.

Para a presença de raízes secundárias ($p = 0,0014$; $IV = 4,91 \%$) também houve efeito significativo do lote de sementes, sendo igualmente observada uma maior média de raízes secundárias no lote 2012 (Tabela 2). Trabalho anterior (GOMES, 2017), já mencionado, realizado com o mesmo lote resultou em média inferior (19,16 %) de formação de raízes secundárias. Contudo, no trabalho de 2014 - também já mencionado - e realizado com explantes provenientes da germinação *in vitro* de sementes do lote de 2010, foi obtida uma média semelhante (27,40 %) de raízes

secundárias formadas em relação ao presente estudo (REINIGER et al., 2016). Os resultados apresentados demonstram a superioridade do lote 2012 quando comparado ao lote 2010, o que pode ser atribuído aos diferentes genótipos bem como a qualidade fisiológica e idade cronológica das plantas matrizes, fatores que podem interferir na produção de sementes.

Tabela 2 - Médias de porcentagem de comprimento de raízes, formação de raízes secundárias em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em função dos lotes de sementes.

Lote	Comprimento de raízes (cm)	Raízes secundárias (%)
2012	4,30 a*	72,00 a
2010	1,77 b	28,00 b
Média	3,03	50,00
IV**	7,04	4,91

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

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

Para a variável formação de calos ($p = 0,5805$; $IV = 5,31\%$) também não houve diferença significativa para os lotes de sementes, foi observada uma média de 52 % de formação de calos. Assim como para outro estudo, utilizando o lote 2012 como fonte de explantes foi obtido uma média geral de 23,9 % de formação de calos, indiferente de concentração de ágar, com a utilização do meio de cultivo WPM com redução à metade dos sais combinado com vermiculita (GOMES, 2017). Porém com a utilização do lote 2010 na rizogênese *in vitro* de *P. dubium* obteve uma média de 33,94 % de formação de calos nas brotações, com a mesma condições de cultivo (CURTI, 2014).

Figura 3 - Formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo WPM/2, em função de diferentes lotes de sementes. Lote 2012 (A) lote 2010 (B) após 60 dias de cultivo *in vitro*.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.
Barra = 1 cm.

3.6 CONCLUSÕES

A utilização do meio nutritivo WPM reduzido à metade da sua concentração de sais (WPM/2), combinado com 30 cm³ de vermiculita, independentemente de ser autoclavada previamente ou não, possibilita que ocorra maior formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium*.

Nem os valores de pH do meio nutritivo, nem a presença de ágar, influenciam a formação *in vitro* de raízes de *Peltophorum dubium* em meio WPM/2 contendo vermiculita (30 cm³).

A utilização do lote de sementes do ano de 2012 possibilitou maior desenvolvimento das plântulas comparadas ao lote de sementes do ano 2010.

4 CAPÍTULO II

ACLI MATI ZAÇÃO *in vitro* E *ex vitro* DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi contribuir para a etapa de aclimatização da micropropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito do lote de sementes sobre a aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium*.
- Analisar o efeito do meio de cultivo empregado durante a etapa de rizogênese *in vitro* na aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium*.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS.

4.3.1 Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* enraizadas em função dos lotes

1º período de aclimatização *in vitro* (56 dias em sala de crescimento)

As plantas cultivadas no ensaio anterior, conforme descrito no item 3.5.4, após 60 dias de cultivo *in vitro* foram submetidas à aclimatização *in vitro*, sendo avaliadas em diferentes períodos. O experimento foi conduzido em delineamento blocos ao acaso, em arranjo bifatorial 2x8, em que o fator A foi constituído pelos lotes de sementes (lote 2010 ou 2012) e o fator B, pelos diferentes períodos de aclimatização (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 ou 56 dias), totalizando 16 tratamentos. Cada tratamento foi aplicado a 25 repetições, cada uma composta por um copo plástico, contendo uma planta.

Após realizada a última avaliação do ensaio de rizogênese, as plantas foram transferidas para copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 300 mL contendo 250 mL de substrato [mistura de vermiculita e substrato comercial, à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais, na proporção 1:1 (v/v)]. Cada copo plástico foi coberto 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, promovendo um microclima adequado à aclimatização.

Em seguida, os copos plásticos com as plantas foram distribuídos em bandejas plásticas contendo, em sua base, uma lâmina de água destilada de 10mm. As bandejas foram dispostas em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h, 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 10 mL de água destilada para manter o turgor hídrico das plantas.

Em cada período considerado foram avaliados: porcentagem de sobrevivência, o número total de folhas por planta, o número de folhas com sinais de senescência (%). Ao final dos 56 dias de aclimatização, as plantas foram também avaliadas quanto à presença de raízes (%), comprimento de raiz (cm) e presença de raízes secundárias (%).

2º período de aclimatização *ex vitro* (30 dias em casa de vegetação)

Decorrido o primeiro período de aclimatização, as plantas, de acordo com o lote foram transferidas para a casa de vegetação, onde foram acondicionadas em vasos plásticos, com capacidade para 1 L, os quais foram totalmente preenchidos com substrato [mistura de vermiculita e substrato comercial, à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais, na proporção 1:1 (v/v)].

Os vasos foram dispostos em delineamento blocos ao acaso, onde permaneceram por mais 30 dias, quando, então, foi realizada a avaliação do 2º período de aclimatização *ex vitro*. As fontes de variação e o arranjo fatorial foram os mesmos considerados no 1º período de aclimatização, descrito anteriormente, sendo avaliadas as variáveis: sobrevivência (%), número total de folhas por planta, número de folhas senescentes (%) e incremento em altura das plantas (cm).

4.3.2 Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* enraizadas em diferentes meios de cultivo

1º período de aclimatização *in vitro* (10 dias em sala de crescimento, com os copos cobertos)

As plantas cultivadas no ensaio de rizogênese *in vitro*, conforme descrito no item 3.3.2, ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* foram submetidas à aclimatização *in vitro* e *ex vitro* e avaliadas em diferentes períodos. As plantas foram transferidas para copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 300 mL contendo 250 mL de substrato [mistura de vermiculita e substrato comercial, à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais, na proporção 1:1 (v/v)]. Cada copo plástico foi coberto 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, promovendo um microclima adequado à aclimatização.

Em seguida, os copos plásticos com as plantas foram distribuídos em bandejas plásticas contendo, em sua base, uma lâmina de água destilada de 10mm. As

bandejas foram dispostas em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h 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 acrescentados 10 mL de água destilada para manter o turgor hídrico das plantas.

2º período de aclimatização *in vitro* (10 dias em sala de crescimento, com os copos descobertos)

Nesta etapa, que foi realizada em um período de 10 dias, os copos plásticos contendo as plantas foram descobertos e novamente distribuídos em bandejas plásticas contendo, em sua base, uma lâmina de 10mm de água destilada. As bandejas foram dispostas em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h 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 acrescentados 10 mL de água destilada para manter o turgor hídrico das plantas.

3º período de aclimatização *ex vitro* (30 dias em casa de vegetação)

Finalizado o 2º período de aclimatização, as plantas foram transferidas para casa de vegetação em condições de temperatura (25°C) e irrigação controladas (por gotejamento, quatro vezes ao dia), sendo resguardado o tratamento do qual foram provenientes. Ao final de 30 dias foi efetuada a avaliação.

Variáveis avaliadas

Nos três períodos de avaliação da aclimatização foram consideradas as seguintes variáveis: sobrevivência (%), número total de folhas por planta, número de folhas senescentes e incremento em altura das plantas (cm).

4.4 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. Quando o valor de F foi significativo, para tratamento qualitativos foi

realizado, sempre que necessário, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e, para tratamentos quantitativos, a análise de regressão polinomial. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.6 (FERREIRA, 2011). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

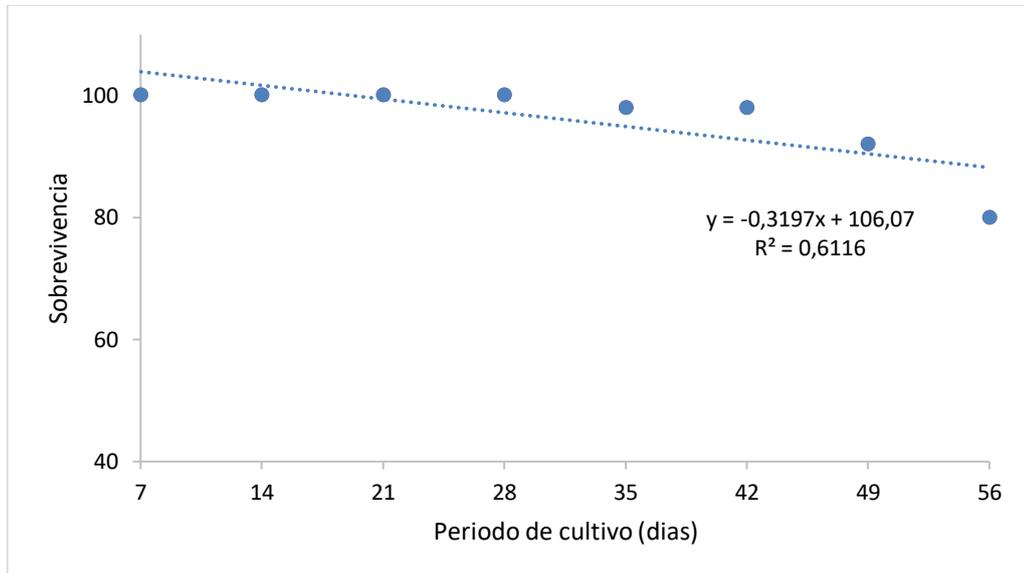
4.5.1 Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de brotações de *Peltophorum dubium* enraizadas em diferentes lotes de sementes

1º período de aclimatização *in vitro* (56 dias em sala de crescimento)

Para a variável sobrevivência houve efeito significativo apenas do fator período de cultivo ($p = 0,000$, $IV = 1,614\%$), sendo ajustada uma equação linear na qual se observou 100 % de sobrevivência até 28 dias de cultivo, e a partir dos 35 dias de cultivo, a média decresceu atingindo 80 % aos 56 dias (Figura 4). Essa redução pode ser decorrência da própria transferência das plantas para condições *ex vitro*, uma vez que, pelo cultivo *in vitro*, podem apresentar os estômatos não funcionais, sistema radicular frágil e/ou cutícula pouco desenvolvida (MATHUR et al., 2008). Além disso, o esgotamento das reservas pode ter contribuído para a mortalidade observada, principalmente naquelas plantas com ausência de raízes secundárias, as quais podem não ter sido capazes de se nutrir com o avanço do período de cultivo.

O resultado obtido foi semelhante ao que foi registrado em *Cariniana legalis* (jequitibá-rosa): 100% de sobrevivência após 30 dias de cultivo e redução para 80 % a partir desse momento (SANTOS, 2016). Por outro lado, em um estudo realizado com *P. dubium*, foi obtida média inferior à observada no presente estudo (em torno de 50 % de sobrevivência ao final do período de cultivo, 56 dias de cultivo) a qual foi verificada no tratamento em que a auxina e a sacarose estavam ausentes na fase de rizogênese, conduzida em meio nutritivo WPM/2 combinado com vermiculita (REINIGER et al., 2016).

Figura 4 - Sobrevivência em plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função do período de cultivo (7, 14, 21, 28, 35, 42, 42 ou 56 dias) independentemente do lote de sementes.

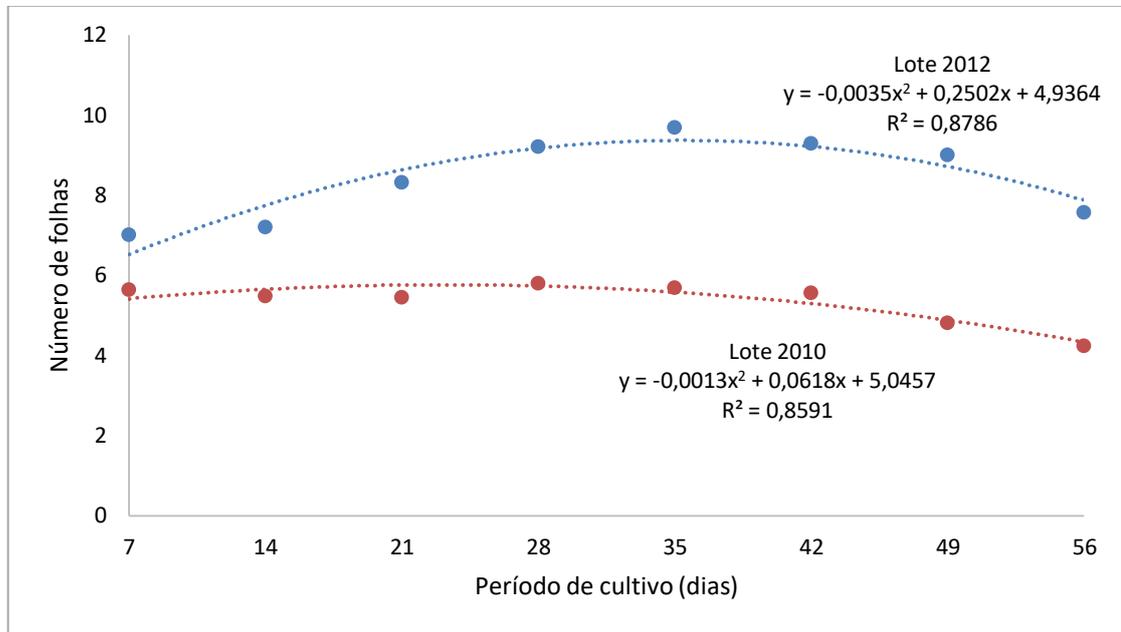


Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Quanto ao número de folhas formadas (IV = 3,99%) houve efeito significativo do lote ($p = 0,0000$), do período de cultivo ($p = 0,0000$) e, também, da interação entre eles ($p = 0,0028$). Foi observado um comportamento quadrático do número de folhas formadas em ambos os lotes, sendo que a maior média (9,68) seria observada aos 35,74 dias para o lote 2012, enquanto que, para o lote 2010, o maior número de folhas (5,80) seria observado aos 23,73 dias de cultivo, de acordo com o cálculo da máxima eficiência técnica (MET) (Figura 5).

Já em *Cariniana legalis* (jequitibá-rosa), após 30 dias de cultivo foi obtida uma média inferior (7,6 folhas por planta) (SANTOS, 2016), assim como também em outro estudo efetuado com *P. dubium*, com 5,18 folhas por planta, ao final de 30 dias, que se reduziu para 3 aos 56 dias (REINIGER et al., 2016).

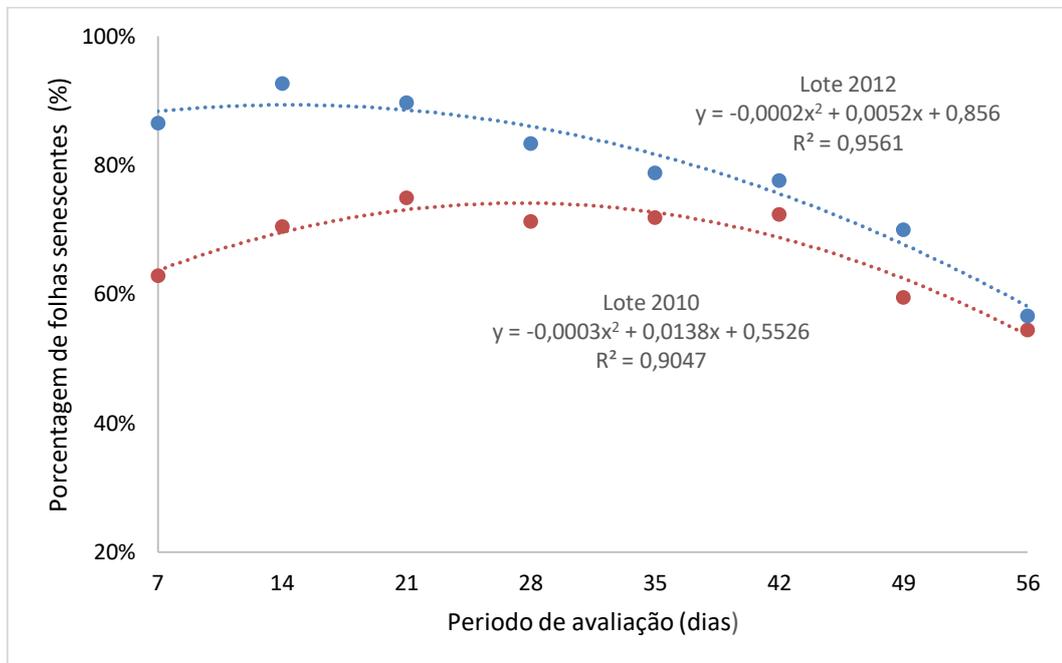
Figura 5 - Número total de folhas formadas em plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função do lote de sementes e o período de cultivo (7, 14, 21, 28, 35, 42, 42 ou 56 dias).



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

O mesmo foi observado para porcentagem de folhas senescentes (IV = 4,07 %), observando-se efeito significativo do lote de sementes ($p = 0,0000$), do período de cultivo ($p = 0,0000$) e também da interação entre eles ($p = 0,0002$). Em ambos os lotes foi observado comportamento quadrático em relação a porcentagem de folhas senescentes. Observou-se que, durante o período de cultivo, o lote 2012 apresentou maior porcentagem de folhas com sinais de senescência, quando comparado ao lote 2010. Decorridos 21 dias, o lote 2012 teve a senescência reduzida (Figura 6). Isso talvez possa ser explicado pelo fato de que as folhas que estavam em processo de formação, por ocasião das duas primeiras avaliações (7 e 14 dias) realizadas começaram a apresentar sinais de senescência e, após, abscisão foliar. De acordo com o histórico de trabalhos realizados em nosso grupo com *Peltophorum dubium* (BASSAN, 2006; CURTI, 2011), a senescência foliar é frequente na espécie (BASSAN, 2006) e está diretamente relacionada ao período de cultivo, o que também foi observado no presente trabalho.

Figura 6 – Porcentagem de folhas com sinais de senescência em plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função do lote de sementes e o período de cultivo (7, 14, 21, 28, 35, 42, 42 ou 56 dias).



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Por outro lado, em outro estudo realizado com *P. dubium*, foi observada moderada senescência (18,37 %), aos 42 dias, a qual não foi observada ao final do período de cultivo, não havendo mais folhas com sinais de senescência (REINIGER et al., 2016), as quais, provavelmente, foram substituídas por folhas novas.

Decorridos 56 dias de cultivo, tanto a presença de raízes ($p = 0,5342$, $IV = 3,79$) como de raízes secundárias ($p = 0,0733$, $IV = 4,28$) não foram afetadas de maneira significativa pelo lote de sementes, observando-se médias gerais de 79,59 % e 71,42 % respectivamente. Já o comprimento de raízes ($p = 0,0047$; $IV = 9,28$) apresentou efeito significativo do lote de sementes, sendo observada maior média no lote 2012 (11,95 cm - Figura 7-B), comparada ao lote 2010 (6,34 cm - Figura 7-E).

Já em *Vaccinium spp* (mirtilo), plantas cultivadas em sala de crescimento por um período de 60 dias apresentaram apenas 55 % de enraizamento e 1,5 cm de comprimento das raízes (DAMIANI; SCHUCH, 2009). Porém em *Rubus sp.* (Amoreira-preta 'Xavante'), ao final de 75 dias de aclimatização *in vitro* em sala de crescimento com o substrato o Tecnomax®, todas as plantas sobreviventes emitiram raízes

indiferentemente da concentração de AIB, enquanto que o comprimento das raízes (média de 5,5 cm), foi influenciado pela adição de 600 mg L⁻¹ dessa auxina (PELIZZA et al., 2013).

2º período de aclimatização *ex vitro* (30 dias em casa de vegetação)

Quando transferidas para casa de vegetação, apenas as variáveis sobrevivência ($p = 0,0333$; IV= 4,23%) e número de folhas com sinais de senescência ($p = 0,0126$; IV=8,11%) apresentaram efeito significativo do lote de sementes (Tabela 3). Foi verificada uma maior média de sobrevivência no lote 2012 em comparação ao lote 2010, possivelmente devido aos resultados observados na rizogênese *in vitro* em relação à formação de raízes e de raízes secundárias, as quais dão suporte ao desenvolvimento das plantas na aclimatização, resultando em maior sobrevivência. Por outro lado, a menor porcentagem de folhas com sinais de senescência foi observado no lote 2010, possivelmente resultante do menor número de plantas avaliadas desse lote em relação ao 2012.

Tabela 3 - Médias de porcentagem de sobrevivência e de folhas senescentes em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em função dos lotes de sementes aos 30 dias de cultivo em casa de vegetação.

Lote	Sobrevivência (%)	Folhas senescentes (%)
2012	84,0 a*	40,6 b
2010	55,0 b	12,9 a
Média	69,50	1,24
IV**	4,23	8,11

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

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

Para o número de folhas ($p = 0,3489$; IV=8,80%) e para a altura ($p = 0,6824$; IV=9,15 %) não houve efeito significativo do lote, obtendo-se médias de 4,62 e 4,65 cm respectivamente.

Já em plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa*) mantidas em casa de vegetação por 120 dias, com auxílio de câmara úmida, a média de sobrevivência foi inferior (42,1 %), ao passo que o número de folhas e a altura de planta foram superiores (9,12 e 10,50 cm respectivamente) (CABRAL, 2016) às observadas no presente estudo. Os resultados obtidos podem estar relacionados com a maior exigência de umidade pelas mudas de mangabeira, em comparação as mudas de *P. dubium* que mostraram um bom desenvolvimento sem necessitar de uma câmara úmida na aclimatização em casa de vegetação, mostrando que, possivelmente, não são sensíveis à desidratação.

Por sua vez, os resultados registrados para teca (*Tectona grandis* L.) foram superiores na sobrevivência e número de folhas (100 % e 9,12 respectivamente) porém inferiores em relação à altura (1,2 cm) após cultivo durante 30 dias em casa de vegetação (FERMINO-JÚNIOR et al., 2011). Igualmente, em plantas de pinus (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) cultivadas por 30 dias de em casa de vegetação houve 100% de sobrevivência (4,9 µM) (NUNES et al., 2018).

Ao longo de todo o processo de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* avaliado no presente trabalho (Figura 7), as plantas micropropagadas de *P. dubium* apresentaram um bom desenvolvimento, possivelmente por terem desenvolvido um sistema radicular funcional que proporcionou um maior desenvolvimento e adaptação na fase de aclimatização, além das condições de cultivo foram adequadas para o desenvolvimento das plantas.

Figura 7 - Etapas do processo de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. em função do lote de sementes, as quais originaram os explantes após germinação *in vitro*. A) 1º período de aclimatização *in vitro* (56 dias de cultivo), lote 2012; B) Comprimento de raiz de planta do lote 2012; C) Transferência das plantas do Lote 2012 para a casa de vegetação; D) 1º período de aclimatização *in vitro* (56 dias de cultivo), lote 2010; E) Comprimento de raiz de planta do lote 2010; F) Transferência das plantas do Lote 2010 para a casa de vegetação.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

4.5.2 Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* em função dos meios de cultivo

1º período de aclimatização *in vitro* (10 dias em sala de crescimento, com os copos cobertos)

No primeiro período de aclimatização *in vitro*, em que foram transferidas para copos plásticos com substrato somente as plantas de *P. dubium* propagadas no experimento 3.5.1 que apresentaram raízes bem formadas, as variáveis sobrevivência ($p = 0,0000$) e número de folhas ($p = 0,2821$; IV = 2,67 %) não foram afetadas de maneira significativa pelo meio de cultivo, apresentando médias elevadas de 100 % e 7,1 folhas por planta respectivamente.

Já sobre as variáveis altura de plantas ($p = 0,0451$; $IV = 2,92\%$) e senescência foliar ($p = 0,0063$; $IV = 7,67\%$) houve efeito significativo dos diferentes meios de cultivo. Os melhores resultados para ambas as variáveis foram observados na ausência de vermiculita, sendo que em relação à altura, esse tratamento diferiu apenas daquele com vermiculita autoclavada previamente (Tabela 4). Já no que diz respeito às folhas com sinais de senescência, o tratamento ausência de vermiculita diferiu da presença do substrato.

Pode-se observar, entretanto, que mesmo tendo ocorrido diferenças significativas entre os tratamentos avaliados para algumas variáveis, que as plantas responderam de maneira positiva ao processo de aclimatização (Figura 8 A) a que foram submetidas.

Tabela 4-Médias de altura e número de folhas com sinais de senescência em plantas micropropagadas de *Peltophorium dubium* (Sprengel) Taubert no 1º período de aclimatização *in vitro*, após 10 dias em sala de cultivo com copos cobertos, em função dos meios de cultivo utilizados durante a rizogênese *in vitro*.

Tratamento	Altura (cm)	Folhas com senescência
WPM/2+VA***	2,71 b*	3,37 b
WPM/2+VN	2,86 ab	3,75 b
WPM/2	3,48 a	1,25 a
Média	3,01	2,79
IV**	2,92	7,67

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. ** IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições. ***WPM/2+VA = 30 ml de meio nutritivo + 30 cm³ de vermiculita pré-autoclavada; WPM/2+VN = 30 ml de meio nutritivo + 30 cm³ de vermiculita não autoclavada.

Contudo, os resultados observados neste período de aclimatização são opostos àqueles obtidos aos 60 dias de indução *in vitro* de raízes (Experimento 3.5.1), haja vista que, na ocasião, os melhores resultados foram justamente aqueles que continham vermiculita incluída no meio, os quais apresentaram melhor

desenvolvimento da raiz e maior porcentagem de formação de raízes secundárias (neste experimento não foram avaliadas variáveis relacionadas à parte aérea).

As médias obtidas no presente trabalho são semelhantes às registradas em *Handroanthus chrysotrichus* (Ipê-amarelo) na primeira etapa de aclimatização *in vitro* (aos 7 dias de cultivo e com os copos cobertos), em que houve 100% de sobrevivência das brotações, formação de 7,55 folhas por brotação e altura de 3,29 cm. Entretanto, essas médias ocorreram nos tratamentos que utilizaram o meio de cultivo constituído por meio nutritivo WPM/2 combinado a 30 mL de vermiculita, independentemente da presença ou não do ágar (RABAIOLLI et al., 2017). Já em *Luehea divaricata* (Açoita-cavalo), na aclimatização *in vitro* das brotações, os melhores resultados foram observados com o emprego do substrato MecPlant® e com adição de sacarose na micropropagação das brotações, sendo observadas médias de 96,29 % de sobrevivência, 1,21 cm de altura e 4,56 folhas por brotação (SILVA, 2016).

2º período de aclimatização *in vitro* (10 dias em sala de crescimento, com os copos descobertos)

Neste período, as variáveis sobrevivência ($p = 0,0000$), número de folhas ($p = 0,3720$; IV = 2,33 %) e altura das plantas ($p = 0,0556$; IV = 3,35 %) não foram afetadas significativamente pelo meio de cultivo, sendo obtidas médias elevadas de 100 %, 7,79 folhas por planta e 3,29 cm de altura respectivamente. Já a variável folhas com sinais de senescência ($p = 0,0022$; IV = 5,96%) sofreu efeito significativo do meio de cultivo (Tabela 5).

O segundo período mostra ainda alta adaptação das plantas micropropagadas à aclimatização conforme pode ser observado na Figura 8 B.

Para *H. chrysotrichus* (Ipê-amarelo) na segunda etapa de aclimatização *in vitro*, com 14 dias de cultivo e com os copos descobertos, a sobrevivência foi também de 100 % e com média de 9,85 folhas por planta, porém esses resultados foram obtidos nos tratamentos que utilizavam o meio de cultivo constituído por WPM/2 e 30 cm³ de vermiculita, na ausência do ágar (RABAIOLLI et al., 2017).

Da mesma maneira, em *Cydonia oblonga* Mill (Marmeleiro), foi observada uma média de 81,8% de sobrevivência das mudas propagadas e aclimatizadas no período de 30 dias com a utilização de substrato comercial combinado com vermiculita (v/v 1:1) (ERIG et al., 2004). Igualmente em *Azadirachta indica* A. Juss (Nim), a combinação de solo com a vermiculita na proporção (3:1, v/v) proporcionou 80 % de

sobrevivência das brotações após 30 dias de aclimatização *in vitro* (REDDY et al., 2006).

No entanto, para *Apuleia leiocarpa* (Grápia), aos 30 dias de cultivo em sala de crescimento foi observada uma média de 73,4 % de sobrevivência, além de médias reduzidas de altura (1,2 cm) e número de folhas por brotação (3,1) indiferentemente do substrato usado (LENCINA et al., 2017). Resultado semelhante a esse foi relatado em *Pterocarpus santalinus* L. (Sândalo-vermelho): média de 73 % de sobrevivência das brotações durante a aclimatização *in vitro* cultivadas sob a combinação de adubo orgânico com areia (1:1, v/v) (BALARAJU et al., 2011). Médias inferiores (sobrevivência de 41 %), em relação as demais espécies florestais anteriormente citadas foram registradas, ainda, em plantas de *Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville (Barbatimão-verdadeiro) aclimatizadas *in vitro* por 30 dias em substrato comercial combinado com vermiculita (1:1, v/v) (NICIOLI et al., 2008).

3º período de aclimatização *ex vitro* (30 dias em casa de vegetação)

A aparência das plantas micropropagadas no terceiro período aclimatização *ex vitro* pode ser observada na Figura 8 C.

Neste período, as variáveis sobrevivência ($p = 0,0000$), número de folhas ($p = 0,0581$; IV = 3,03 %), folhas com sinais de senescência ($p = 0,1282$; IV = 9,46 %) não foram afetadas significativamente pelo meio de cultivo, sendo obtidas médias elevadas de 100 %, 8,66 folhas por planta e 2,75 de folhas com senescência respectivamente. Já a variável altura ($p = 0,0081$; IV = 2,58%) apresentou efeito significativo do meio de cultivo, sendo a maior média (7,25 cm) observada novamente nas plantas provenientes do tratamento em que a vermiculita não foi adicionada ao meio nutritivo (Tabela 5).

Tabela 5-Médias do número de folhas com sinais de senescência em plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert em função dos meios de cultivo utilizados durante o cultivo *in vitro*, após 10 dias em sala de cultivo com os copos plásticos descobertos e médias de altura em função dos meios de cultivo utilizados durante o cultivo *in vitro*, aos 30 dias de aclimatização em casa de vegetação.

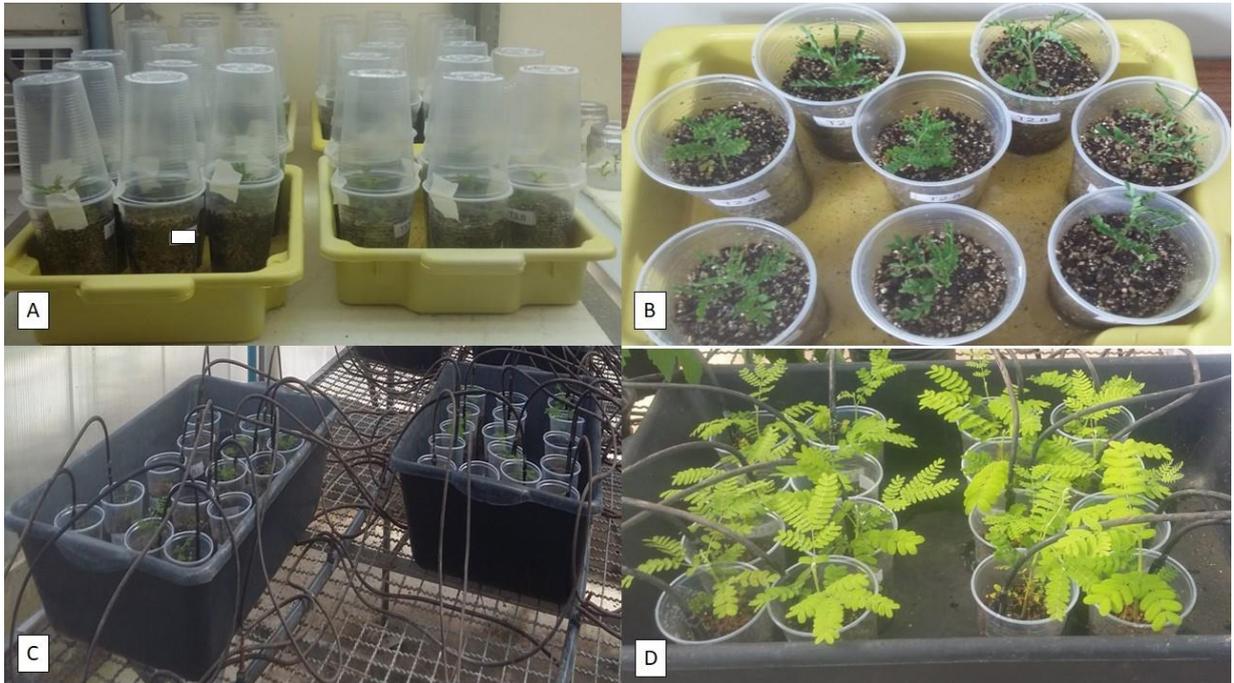
Tratamento	Folhas com senescência	Altura (cm)
WPM/2+VA***	4,5 b	5,93 b
WPM/2+VN	5,0 b	5,60 b
WPM/2	2,25 a*	7,25 a
Média	3,91	6,26
IV**	5,96	2,58

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. ** IV (Índice de variação) = CV/\sqrt{N} , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições. ***WPM/2+VA = 30 ml de meio nutritivo + 30 cm³ de vermiculita pré-autoclavada; WPM/2+VN = 30 ml de meio nutritivo + 30 cm³ de vermiculita não autoclavada.

De maneira semelhante, em *Tectona grandis* (teca), tanto a sobrevivência como a rizogênese *ex vitro*, as médias não diferiram entre o substrato vermiculita (85 %) e Plantmax® (95 %), após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação (FERMINO-JÚNIOR et al., 2011). Por outro lado, em *Amburana acreana* (cerejeira) cultivada *in vitro* em meio nutritivo WPM/2 foi registrada uma taxa reduzida de sobrevivência (54 %), quando aclimatizada em casa de vegetação por 30 dias em vermiculita (FERMINO-JUNIOR; PEREIRA, 2012). Igualmente ocorreu em plantas de *Genipa americana* L. (Jenipapeiro), após 30 dias aclimatização, em que a maior porcentagem de sobrevivência (50 %) ocorreu em substrato Ecoterra® (ROCHA et al., 2008).

Figura 8 - Etapas do processo de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. A) 1º período de aclimatização *in vitro* (10 dias em sala de crescimento); B) 2º período de aclimatização *in vitro*, copos descobertos (20 dias em sala de crescimento); C) transferência das plantas micropropagadas para a casa de vegetação; D) 3º período de aclimatização *ex vitro* (plantas após 30 dias em casa de vegetação).



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

4.6 CONCLUSÕES

Na aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de *Peltophorum dubium* há diferenças no desempenho *in vitro* dos lotes de sementes que originaram os explantes iniciais, sendo lote do ano 2012 o que mostra melhores resultados.

A vermiculita compromete a altura das plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* na etapa de aclimatização *in vitro* e *ex vitro*, mas não interfere na sobrevivência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho constitui-se em uma relevante contribuição para as etapas de rizogênese e aclimatização do protocolo de micropropagação de *Peltophorum dubium*, cujas pesquisas foram iniciadas pelo nosso grupo em meados dos anos 2000.

Dentre as conclusões obtidas destacamos,

a) na rizogênese:

- o uso de vermiculita combinada ao meio nutritivo WPM/2 no cultivo *in vitro* favorece a rizogênese *in vitro*.

- nem os valores de pH nem as concentrações de ágar do meio nutritivo WPM/2 contendo vermiculita influenciam a formação *in vitro* de raízes de *P. dubium*.

- a utilização do lote de sementes do ano de 2012 possibilita maior desenvolvimento dos explantes comparado ao lote de sementes de 2010.

b) já na aclimatização *in vitro* e *ex vitro*:

- a ausência de vermiculita no meio de cultivo na etapa de rizogênese *in vitro* propicia uma maior incremento em altura, mas não interfere na sobrevivência das plantas micropropagadas; e

- há diferenças no desempenho *in vitro* dos lotes de sementes que originaram os explantes iniciais, sendo o lote do ano 2012 o que mostra melhores resultados.

Conseqüentemente, considerando-se conjuntamente as conclusões obtidas em ambas as etapas, recomendam-se:

- pode-se ajustar o pH do meio nutritivo WPM/2 à faixa entre 4,8 a 6,8 e acrescentar apenas, 4,0 gL⁻¹ de ágar na rizogênese *in vitro*, ao invés das usuais 7,0 gL⁻¹, implicando em redução dos custos da micropropagação.

- adicionar vermiculita não autoclavada previamente ao meio nutritivo;

- testar previamente os lotes de sementes doadores de explantes em relação ao desempenho *in vitro* das culturas.

Adicionalmente, ressaltamos que, no presente trabalho, conseguimos obter um incremento considerável na rizogênese *in vitro* em comparação aos trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo, sendo atingida a média recorde de 95%. Esse resultado foi consequência de uma experimentação intensiva e cuidadosa, realizada ao longo dos anos, em que ajustes foram sendo somados ao protocolo de micropropagação após avaliação e seleção de procedimentos. Também contribuiu para o sucesso a atenta observação realizada ao longo dos experimentos, haja vista

que creditamos esse resultado, além do emprego do lote de sementes com desempenho superior, à opção pela não transferência das culturas para meio de cultivo fresco após os primeiros 30 dias de cultivo *in vitro*.

Quando o experimento de rizogênese foi realizado pela primeira vez observou-se que, na hora da transferência, as raízes compridas rompiam-se, o que poderia comprometer os resultados do ensaio. Assim, na segunda tentativa, optou-se por não efetuar a transferência das culturas após os 30 dias iniciais, independentemente da presença ou do tamanho das raízes. E decorridos 60 dias, observou-se que esse procedimento favoreceu a formação e, também, o aumento no comprimento das raízes formadas.

O cultivo continuado por 60 dias, sem realizar transferência das culturas para meio fresco, provavelmente também explica a maior calogênese observada no presente trabalho, haja vista que, nos trabalhos anteriores, no momento da transferência, aos 30 dias de cultivo, realizava-se a eliminação ou redução das calosidades, o que pode ser reduzido a 45 dias sem a transferência. Entretanto, deve-se destacar que a expressiva calosidade observada nas plantas micropropagadas não comprometeu a rizogênese *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.
- ALMEIDA, DS. Modelos de recuperação ambiental. In: **Recuperação ambiental da Mata Atlântica**. 3rd ed. rev. and enl. Ilhéus, BA: Editus, 2016, p. 100-137. Disponível em: <http://www.uesc.br/editora/livrosdigitais2016/recuperacao_ambiental_da_mata_atlantica_nova.pdf>. Acesso em: 29 set. 2018.
- ALOUFA, M.A.I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: Congresso Brasileiro De Floricultura E Plantas Ornamentais, 14., Congresso Brasileiro De Cultura De Tecidos De Plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais**. p.3-5.
- 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, 1998. p. 261-296.
- BALARAJU, K., P. et al. A rapid *in vitro* propagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using shoot tip explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 2501-2510, 2011.
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390. 2006.
- BERTOLINI, I. C. et al. Caracterização silvicultural da canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)". **Scientia Agraria Paranaensis**, vol. 14, n. 2, p. 67-76. 2015.
- BUNN, E.; TAN, B. Microbial contaminants in plant tissue culture propagation. In: **Microorganisms in plant conservation and biodiversity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 307-335.
- CABRAL, J. **Otimização de parâmetros físico-químicos e microbiológicos no estabelecimento *in vitro* de explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e na sua promoção do crescimento**. 2012. 182 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2012.
- CABRAL, J. **Aclimatização de plântulas micropropagadas e produção de mudas de mangabeira utilizando microrganismos promotores do crescimento**. 2016. 153 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Engenharia, São Paulo, 2016.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990.p. 340-345.
- CANDIDO, D. F. **Cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert: Multiplicação, senescência foliar e calogênese**. 2013. 120 p. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

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

CARVALHO, P. E. R. **Circular Técnica 64: Canafístula**. Colombo, Pr: Embrapa, 2002. 15 p.

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

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue culture plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32. P. 1199-1205, 2010.

COSTA, F. H. S.; et al. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.

CUNHA, A. A; GUEDES, F. B. **Mapeamentos para a conservação e recuperação da biodiversidade na Mata Atlântica: em busca de uma estratégia espacial integradora para orientar ações aplicadas**. Brasília: MMA, p. 2016, 2013.

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

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

DAMIANI, C. R. et al. Luminosidade e IBA no enraizamento de microestacas de mirtilheiro dos grupos Rabbiteye e Southern Highbush. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, Jaboticabal , v. 31, n. 3, p. 650-655, 2009.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. *In vitro* rooting of blueberry under photoautotrophic conditions. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 39, n. 4. 2009.

DEB, C. R.; IMCHEN, T. An eficiente *in vitro* hardening of tissue culture raised plants. **Biotechnology**. v. 9, p. 79-83, 2010.

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

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiment in plant tissue culture**. 3rd ed. NewYork: Cambridge University Press, 1995. 256 p.

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

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, 2013.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Micropropagação e microestaquia de eucalipto. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Cap. 3, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.83-120.

ERIG, A. C., et al. 2004. Enraizamento in vitro e aclimatização de mudas de marmeleiro Cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, p. 61-68, 2004.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 215-231, 2002.

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

FERREIRA, D.M.O. **Extração de agar de algas vermelhas do género Gracilaria**. 2015. 91 p. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biológicos). Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Coimbra, 2015.

FERMINO-JUNIOR, P. C. P. et al. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. **Floresta**, v. 41, n. 1, p.79-86, 2011.

FERMINO-JUNIOR, P. C. P.; PEREIRA S. J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p.1-9, 2012.

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

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2014-2015**. Fundação Sos Mata Atlântica e INPE, São Paulo, 2016. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/>>. Acesso em: 29 de Setembro de 2018.

GEORGE, E. F. **Plante propagation by tissue culture**,: the technology. 2.nd. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574p.

GEORGE, E. F. Plant tissue procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; GEORGE, E. F.; DEBERGH. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. **Dordrecht: Springer**, v. 1, 2008.p. 29-64.

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

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

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, 1998. p. 183-260.

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

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. Jr.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th. ed. Boston: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

JOHNSON, T. et al. Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. **In Vitro Cell Dev Bio Plant**. v.48, n. 3, p. 369-376, 2012.

LENCINA, et al. Rooting and acclimatization of *Apuleia leiocarpa*. **Agrociencia**. México, v. 51, n. 8, p. 909-920, 2017.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, 1992.161 p.

LORENZI, H. **Plantas ornamentais no Brasil**. 3. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2001. 791 p.

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.

LUCYSZYN, N. et al. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, 173-176, 2007.

MA, X. et al. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v.48, n.3, p. 324-334, 2012.

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

MARTINS, C. C. et al. Umedecimento do substrato na emergência e vigor de plântulas de pupunheira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 224 - 230, 2009.

MARTINS, S. V. **Recuperação de áreas degradadas: Ações em áreas de preservação permanente, voçorocas, taludes rodoviários e de mineração / 3**. Ed. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2013. p. 264

MARTINS, S. V. et al. Uma abordagem sobre a diversidade e técnicas de restauração ecológica. In: **Restauração Ecológica de Ecossistemas Degradados**. 2 ed. – Viçosa, MG: UFV, p. 19-41, 2015.

MATHUR, A. et al. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. **African Journal Biotechnology** 7:1046–1053, 2008.

MEIRA, Z. Developmental and structural patterns of in vitro plants. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S. (Ed.). Morphogenesis in plant tissue cultures. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, 1999. p. 235-254.

MIRANDA, N. A. et al. ANTIOXIDANTS, SUCROSE AND AGAR IN THE *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Eremanthus incanus*. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 48, n. 3, p. 311-320, 2018.

MORAES, M. M. B. **Entomofauna visitante de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Leguminosae- Caesalpinoideae) na região de Dourados, Mato Grosso do Sul**. 2009. 51 p. Dissertação. (Mestrado em Entomologia e conservação da biodiversidade) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2009.

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.

MORI, E. S. S. et al. Sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*. **Scientia Forestalis** p. 307-317, 2013.

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.

NICIOLI, P. M. et al 2008. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, v. 38, p. 685-689. 2008.

NUNES, S. et al., Efficient protocol for in vitro mass micropropagation of slash pine. **Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. n. 54, p. 175–183, 2018.

PÁDUA, M.S.S.; PAIVA, L.V.; DA SILVA, L.G.T.; SILVA, L.C; STEIN, V.C. *In vitro* development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*). **Revista Árvore**, v. 38, n. 6, p. 1095-1102, 2014.

PELIZZA, T. G. et al. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta 'xavante'¹. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 333 - 337, 2013.

PIATCZAK, E.; WIELANEK, M.; WYSOKINSKA, A. Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, p. 431-437, 2005.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. 4.ed. Netherlands: Kluweer Academic Publishers, 1997, 348 p.

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

RABAIOLLI, S. M. S. et al. Agar does not affect *in vitro* rhizogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. **Cerne**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 185-192, 2017.

REDDY, A. R. et al. 2006. Micropropagation of *Azadirachta indica* A. Juss. via cotyledonary nodes. **Indian Journal Biotechnology**. v. 5, p. 309-311, 2006.

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

REITZ, R. et al. Projeto Madeira de Santa Catarina. **Sellowia**, Itajaí, n. 28-30, p. 1-320, 1978.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 26 p

RIBEIRO, V.G. et al. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranjeira 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p.1147-1152, 1997.

ROCHA, P. S. G. et al. Efeito do ágar, vermiculita e sacarose no enraizamento do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 11, n. 1, p. 54-59, 2006.

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, 2008.

RODRIGUES, R. R. et al. Atividades de adequação ambiental e restauração florestal do LERF/ESALQ/USP. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 55, p. 7, jun. 2010. Disponível em: <<https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/113/73>>. Acesso em: 29 set. 2018.

RODRIGUES, M. et al. Effects of flask sealing and growth regulators on in vitro propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2012.

ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.58, p.131-140, 1971.

SANTOS, P. M. D. **Biometria, conservação de germoplasma e multiplicação *in vitro* de jequitibás-rosa do sul de Minas Gerais**. 2016. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

SARTORETTO, M.L. et al. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.861-871, 2008.

SHIN, K.; PARK, S.Y.; PAEK, K. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 4, p. 445-454, 2013.

SILVA, K. **Rizogênese *in vitro* e aclimatização de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.** 2016. 84 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

SILVEIRA, D.G.; VIDAL, A.M.; LEDO, C.A.S.; DE SANTANA, H.R.F.; SOUZA, F.V.D. Aspectos morfofisiológicos na pré- aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, n. 3, p. 544-553, 2013.

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

SNYMAN, S. J. et al. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 47, n. 2, p. 234-249, 2011.

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

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 640p.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 182 p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EmbrapaCNPq, 1990. 433p.

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, 2007.

VIEIRA, R. L. et al. 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.

YU, T. et al. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.61, n.1, p.29-35, 2000.

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

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura Clonal: princípios e Técnicas**. Ed. UFV, Viçosa, 2013. 279 p.

XIAO, Y. NIU, G. KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. n. 105, p. 149–158, 2011.