

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

Ana Cristina da Fonseca Ziegler

**RIZOGÊNESE *in vitro*, ACLIMATIZAÇÃO E DESEMPENHO INICIAL A
CAMPO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS E TOLERÂNCIA *in
vitro* DE GENÓTIPOS DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart.
& Zucc) AO ALUMÍNIO**

Santa Maria, RS
2020

Ana Cristina da Fonseca Ziegler

RIZOGÊNESE *in vitro*, ACLIMATIZAÇÃO E DESEMPENHO INICIAL A CAMPO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS E TOLERÂNCIA *in vitro* DE GENÓTIPOS DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc) AO ALUMÍNIO

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 a obtenção do grau de **Mestra em Engenharia Florestal**

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS
2020

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

Ziegler, Ana Cristina da Fonseca
RIZOGÊNESE in vitro, ACLIMATIZAÇÃO E DESEMPENHO
INICIAL A CAMPO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS E TOLERÂNCIA
in vitro DE GENÓTIPOS DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata*
Mart. & Zucc) AO ALUMÍNIO / Ana Cristina da Fonseca
Ziegler.- 2020.
100 p.; 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, 2020

1. cultura de tecidos 2. seleção in vitro 3.
micropropagação 4. espécie florestal I. Silveira
Reiniger, Lia Rejane II. Título.

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

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

Ana Cristina da Fonseca Ziegler

RIZOGÊNESE *in vitro*, ACLIMATIZAÇÃO E DESEMPENHO INICIAL A CAMPO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS E TOLERÂNCIA *in vitro* DE GENÓTIPOS DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc) AO ALUMÍNIO

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 a obtenção do grau de **Mestra em Engenharia Florestal**

Aprovado em 21 de fevereiro de 2020



Lia Rejane Silveira Reiniger Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Aline Ferreira Paim Dra.



Candida Elisa Manfio Dra. (EPAGRI)

Santa Maria, RS
2020

*Dedico esse trabalho a mim mesmo,
pelo meu esforço, minha dedicação e perseverança...*

*Com o mesmo amor, dedico à minha família e
a todos os que acreditaram em mim.*

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.”

Ana Vilela.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do caminho percorrido até aqui, trilhei lindas histórias ao lado de pessoas que estou aqui para agradecer. Acredito que agradecer também não é uma tarefa fácil, mas faz parte do respeito mútuo, do carinho e do reconhecimento a cada um. Agradeço primeiramente a Deus, por permitir que eu pudesse chegar até aqui e por sempre me guiar. Aos meus pais, Leci Nunes da Fonseca e João Elíbio Ziegler que sempre estiveram ao meu lado me dando suporte para seguir em frente ao decorrer desta jornada que totaliza 18 anos de estudo, entre ensino fundamental, médio, graduação e pós-graduação. Aos meus irmãos, Ana Justina da Fonseca Ziegler e João Elíbio da Fonseca Ziegler, pela irmandade e por estarem ao meu lado apesar das distâncias ocasionadas pelo tempo. A minha professora, orientadora, amiga e que sempre terá um espaço em meu coração, Lia Rejane Silveira Reiniger, que abriu as portas do seu laboratório em 2016, ainda na graduação, que sempre me incentivou a percorrer a minha jornada e, sempre me mostrou que o melhor caminho é aquele traçado pelo coração e pela paz. Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Silvia, Tatiane, Leandro, Cláudia, Matheus, Larissa, Clarissa, Saulo e Iana, que já concluíram seus estudos ou aos que já não pertencem mais ao grupo, tenham a certeza que marcaram minha trajetória e têm minha gratidão. Agradeço também aos que permanecem ao grupo e estão sempre dispostos a troca de conhecimentos, as bolsistas Isadora Cocco e Thalyne Salles, sempre comprometidas e empenhadas em me auxiliar nas pesquisas, aos colegas da pós-graduação Caetano, Charlene e em especial a Karol, que sempre me estendeu a mão e me ajudou a compreender a estatística dos dados, as suas interpretações, e me guiou durante a graduação e nas dúvidas da pós-graduação. Obrigada! Aos meus amigos da Coordenação da Agronomia, Andreia Lima e Rogério Castro, que sempre estiveram ao meu lado e ajudaram como meus pais durante esta caminhada percorrida na UFSM. Ao Eduardo Almeida da Silva, por ter acompanhado os experimentos e auxiliado em algumas avaliações que eram para durar meia hora e se estendiam para o dia inteiro. A minha família e aos meus amigos que sempre me desejaram o melhor e torceram pelo meu sucesso. E, por fim, pelo apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, para a realização do presente trabalho.

RESUMO

RIZOGÊNESE *in vitro*, ACLIMATIZAÇÃO E DESEMPENHO INICIAL A ÇAMPO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS E TOLERÂNCIA *in vitro* DE GENÓTIPOS DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc) AO ALUMÍNIO

AUTOR: Ana Cristina da Fonseca Ziegler
ORIENTADOR: Lia Rejane Silveira Reiniger

Originária da América do Sul, o açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), é uma espécie nativa que compõe os biomas Pampa e Mata Atlântica, e que tem apresentado redução e fragmentação de suas populações naturais. Ela possui características relevantes em sua madeira, principalmente para o uso em técnicas de vergamento, e por esta razão esta espécie durante um longo período sofreu uma intensa exploração que reduziu drasticamente seus exemplares no Rio Grande do Sul. Dessa maneira, em virtude de apresentar grande importância silvicultural, ecológica e econômica, justifica-se a realização de estudos relacionados a garantir a sua perpetuação via produção de mudas. Para que isso ocorra são necessários estudos relacionados à produção de mudas, por meio da micropropagação, o que foi realizado no trabalho a seguir. Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as etapas de rizogênese *in vitro* e aclimatização *in vitro* e *ex vitro* da micropropagação de açoita-cavalo, seu desempenho inicial a campo, bem como verificar a tolerância *in vitro* de genótipos ao alumínio, e, para isso foram avaliadas, inicialmente, os diferentes meios nutritivos (MS, MS/2, WPM ou WPM/2) na fase de rizogênese *in vitro* de brotações de açoita-cavalo. Em seguida, foram estudados os efeitos da adição, ao meio nutritivo MS, do Ácido 3-Indolbutírico (AIB) para o enraizamento *in vitro* da espécie. O efeito do meio de cultivo em função do volume de meio nutritivo associado a vermiculita na rizogênese *in vitro* de açoita-cavalo. Os resultados obtidos indicam que o meio nutritivo MS é mais eficiente para o desenvolvimento de açoita-cavalo na fase rizogênese *in vitro*, alcançando valores de 62,50% na formação de raízes primárias. Pode ser dispensado o uso de AIB na fase de rizogênese *in vitro*, contudo a presença da auxina em concentrações de até 20µM melhora a qualidade do sistema radicular. O volume de 20 mL de meio nutritivo associado a 30 cm³ de vermiculita é eficiente na rizogênese *in vitro*. Na fase de aclimatização tanto *in vitro* como *ex vitro* pode ser dispensado o uso de AIB, contudo o desempenho melhora com a suplementação de até 20 µM da auxina. Considerando-se o efeito do AIB, é necessário estender o período de aclimatização para 80 dias, incluindo-se as etapas de 20 dias em condições *in vitro* e 60 dias adicionais em casa de vegetação. O volume de 20 mL de meio nutritivo associado a 30 cm³ de vermiculita é eficiente na aclimatização *in vitro* e *ex vitro* e considerando o efeito apenas do meio de cultivo, é necessário estender o período de aclimatização para 90 dias, incluindo-se as etapas de 30 dias em condições *in vitro* e 60 dias adicionais em casa de vegetação. O desempenho inicial de mudas micropropagadas de açoita-cavalo é evidente em apenas 30 dias e registra elevada média de sobrevivência, incremento em diâmetro e incremento em altura tanto para os mudas provenientes do efeito do AIB quanto para o efeito do meio de cultivo. Por fim, na fase de estabelecimento e rizogênese *in vitro*, o açoita-cavalo manifesta tolerância ao alumínio, sendo capaz de sobreviver, retomar o crescimento e formar raízes primárias, mesmo com limitações no seu desenvolvimento.

Palavras-chave: cultura de tecidos; seleção *in vitro*; micropropagação; espécie florestal.

ABSTRACT

RHIZOGENESIS *IN VITRO*, ACCLIMATIZATION AND INITIAL PERFORMANCE IN THE FIELD OF MICROPROPAGATED PLANTS AND TOLERANCE *IN VITRO* OF GENOTYPES OF AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc) TO ALUMINUM

AUTHOR: Ana Cristina da Fonseca Ziegler

ADVISOR: Lia Rejane Silveira Reiniger

Originating in South America, the açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), is a native species that makes up the Pampa and Mata Atlântica biomes, and that has shown a reduction and fragmentation of its natural populations. It has relevant characteristics in its wood, mainly for use in bending techniques, and for this reason this species over a long period suffered an intense exploitation that drastically reduced its specimens in Rio Grande do Sul. Thus, in view of its great silvicultural, ecological and economic importance, it is justified to carry out studies related to guarantee its perpetuation via seedling production.

For this to occur, studies related to the production of seedlings are necessary, through micropropagation, which was done in the following work. In view of the above, the present study aimed to evaluate the stages of rhizogenesis *in vitro* and acclimatization *in vitro* and *ex vitro* of the micropropagation of açoita-cavalo, its initial performance in the field, as well as checking the *in vitro* tolerance of aluminum genotypes, and, for that, the different nutritional means were initially evaluated (MS, MS/2, WPM or WPM/2) in the stage of *in vitro* rhizogenesis of shoots of açoita-cavalo. Then, the effects of adding Indolbutyric Acid (IBA) to the *in vitro* rooting of the species to the MS nutrient medium were studied. The effect of the culture medium as a function of the volume of nutrient medium associated with vermiculite in the *in vitro* rhizogenesis of açoita-cavalo. The results obtained indicate that the MS nutrient medium is more efficient for the development of horse whipping in the rhizogenesis phase *in vitro*, reaching values of 62.50% in the formation of primary roots. The use of IBA in the stage of *in vitro* rhizogenesis can be dispensed with, however the presence of auxin in concentrations up to 20 μ M improves the quality of the root system. The volume of 20 mL of nutrient medium associated with 30 cm³ of vermiculite is efficient for rhizogenesis *in vitro*. In the acclimatization phase, both *in vitro* and *ex vitro*, the use of IBA may be dispensed with, however performance improves with supplementation of up to 20 μ M of auxin. Considering the effect of AIB, it is necessary to extend the acclimatization period to 80 days, including the steps of 20 days in *in vitro* conditions and an additional 60 days in a greenhouse. The volume of 20 mL of nutrient medium associated with 30 cm³ of vermiculite is efficient in acclimatization *in vitro* and *ex vitro* and considering the effect of the culture medium only, it is necessary to extend the acclimatization period to 90 days, including the steps of 30 days *in vitro* conditions and 60 additional days in a greenhouse. The initial performance of micropropagated seedlings of açoita-cavalo is evident in just 30 days and registers a high average of survival, increase in diameter and increase in height for both seedlings from the effect of IBA and the effect of the culture medium. Finally, in the *in vitro* establishment and rhizogenesis phase, the açoita-cavalo shows tolerance to aluminum, being able to survive, resume growth and form primary roots, even with limitations in its development.

Key-words: tissue culture, selection *in vitro*; micropropagation; forest species.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Valores médios de sobrevivência, estabelecimento, formação de raízes primárias, em brotações de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) independentemente do período de cultivo (45 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020..... 42
- TABELA 2** - Valores médios de formação de raízes secundárias (%), comprimento médio de raízes (cm) e altura (cm) de brotações de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função do meio de cultivo após 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020..... 50
- TABELA 3** - Valores médios de diâmetro (mm), altura (cm) e número de folhas em plantas de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), aos 30 e 60 dias de aclimatização. Santa Maria, RS, UFSM, 2020. 56
- TABELA 4** - Valores médios de diâmetro (mm) e altura (cm) em plantas de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função do meio de cultivo, independentemente do subperíodo (primeiro subperíodo de 15 dias com cobertura de copos plásticos e segundo subperíodo de 15 dias adicionais sem a cobertura de copos plásticos) na etapa de aclimatização *in vitro*. Santa Maria, UFSM, 2020. 62
- TABELA 5** - Valores médios de diâmetro (mm) e altura (cm) em plantas de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função dos meios de cultivos, independente dos subperíodos de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias) Santa Maria, RS, UFSM, 2020. 64
- TABELA 6**- Valores médios de comprimento médio de raízes (cm) e número de raízes em plantas de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função dos meios de cultivos, aos 60 dias de aclimatização *ex vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020. 67
- TABELA 7** - Valores médios de sobrevivência (%), estabelecimento (%) e contaminação por micro-organismos (%) e formação de raízes primárias (%) brotações de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) aos 45 e 60 dias de aclimatização. Santa Maria, RS, UFSM, 2020..... 84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Locais identificados de ocorrência natural de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) no Brasil..... 19
- Figura 2** - Aspectos silviculturais de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.): A – Árvore adulta; B – Sementes; C – Folhas e frutos; D – Madeira; E – Flores.21
- Figura 3** - Aspectos visíveis do desenvolvimento radicular dos explantes de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), antes de 30 dias de cultivo. A – Tratamento testemunha (0 μ M); B e C – tratamentos com presença de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2019.33
- Figura 4** - Etapas da rizogênese *in vitro* e aclimatização de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), a – fase germinação *in vitro* das sementes (60 dias); b – plantas resultantes da germinação *in vitro*, das quais serão isolados os explantes; c – fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais (30 dias); d – culturas em fase de rizogênese *in vitro* ; e – fase da aclimatização *in vitro* das plantas micropropagadas; f – fase da aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas; g e h – transferência das plantas aclimatizadas em copos plásticos para vasos plásticos com capacidade de 1L; i – transferência das plantas para casa de vegetação, j, k – aspectos de desenvolvimento das plantas em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2019.36
- Figura 5** – Imagem por satélite da Área de Preservação Permanente (APP) – Área Nova – Colégio Politécnico da UFSM, local de implantação das mudas micropropagadas a partir dos experimentos anteriores. Santa Maria, RS, UFSM, 2020..... 40
- Figura 6** - Representação ilustrativa das brotações de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro*, em função de diferentes meios nutritivos (A – MS; B – MS/2; C – WPM; D – WPM/2) avaliados aos 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2020..... 43
- Figura 7** – Médias de formação de raízes secundárias (%) – (A) e número de raízes – (B) em brotações de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2020..... 46
- Figura 8** – Representação ilustrativa das brotações de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) (A – 0 μ M; B – 10 μ M; C – 20 μ M; D – 40 μ M) avaliados. Santa Maria, UFSM, 2020.46
- Figura 9** – Altura média (cm) em brotações de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2020..... 47
- Figura 10** – Representação ilustrativa das brotações de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro*, em função dos meios de cultivo (A – 10 mL de meio nutritivo MS + 30cm³ de vermiculita ; B – 20 mL de meio nutritivo MS + 30cm³ de vermiculita ; C – 30 mL de meio nutritivo MS + 30cm³ de vermiculita) aos 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2020.51

Figura 11 – Médias de diâmetro (mm) – (A) e altura (cm) – (B) em plantas aclimatizadas <i>in vitro</i> de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....	53
Figura 12 – Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.), em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na etapa de aclimatização <i>in vitro</i> , no primeiro subperíodo de 10 dias com a cobertura de copos plásticos (A – 0µM ; B – 10µM ; C – 20µM; D – 40µM) seguido do segundo subperíodo de 10 dias adicionais sem a cobertura de copos plásticos (E – 0µM ; F – 10µM ; G – 20µM; H – 40µM). Santa Maria, UFSM, 2020.....	54
Figura 13 - Média de sobrevivência (%) em plantas aclimatizadas <i>ex vitro</i> de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), independentemente do período de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....	55
Figura 14 - Médias de diâmetro (mm) – (A) e altura (cm) – (B) em plantas aclimatizadas <i>ex vitro</i> de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), independente do período de cultivo de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....	57
Figura 15 - Média de número de folhas em plantas aclimatizadas <i>ex vitro</i> de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), independente do período de cultivo de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....	58
Figura 16 - Médias de comprimento de raízes (cm) – (A) e número de raízes – (B) em plantas aclimatizadas <i>ex vitro</i> de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) aos 60 dias de aclimatização em casa vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.	60
Figura 17 - Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.), em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na etapa de aclimatização <i>ex vitro</i> , (A1 – 30 dias de cultivo em casa de vegetação) e aos 60 dias (A – 0µM; B – 10µM; C – 20µM; D – 40µM). Santa Maria, UFSM, 2020.	60
Figura 18 - Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.), em função dos meios de cultivos na etapa de aclimatização <i>in vitro</i> , no primeiro subperíodo de 15 dias com a cobertura de copos plásticos (A – 10mL + 30cm ³ ; B – 20mL + 30cm ³ ; C – 30mL + 30cm ³) e seguido do segundo subperíodo de 15 dias adicionais sem a cobertura de copos plásticos (D – 20mL + 30cm ³ ; E – 20mL + 30cm ³ ; F – 20mL + 30cm ³). Santa Maria, UFSM, 2020.	63
Figura 19 - Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) em função dos meios de cultivos na etapa de aclimatização <i>ex vitro</i> aos 60 dias (A – 10mL + 30cm ³ ; B – 20mL + 30cm ³ ; C – 30mL + 30cm ³). Santa Maria, UFSM, 2020.	65
Figura 20 - Representação ilustrativa do desempenho inicial a campo das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.), em função de	

diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) aos 30 dias após o plantio (A – 0µM ; B – 10µM ; C – 20µM; D – 40µM). Santa Maria, UFSM, 2020.	69
Figura 21 - Representação ilustrativa do desempenho inicial a campo das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.), em função dos meios de cultivos aos 30 dias após o plantio (A – 10mL + 30cm ³ ; B – 20mL + 30cm ³ ; C – 30mL + 30cm ³). Santa Maria, UFSM, 2020.....	70
Figura 22 - Médias de sobrevivência (%) – (A) e estabelecimento (%) – (B) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i> em função do período de cultivo <i>in vitro</i> (45, 60, 90 e 120 dias) em meio nutritivo WPM independentemente das concentrações de alumínio (Al). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.	77
Figura 23 - Média de contaminação por micro-organismos (%) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i> em função das concentrações de alumínio (Al) aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.	78
Figura 24 - Média de formação de raízes primárias (%) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i>	79
Figura 25 - Média de formação de raízes secundárias (%) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i> em função das concentrações de Al aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....	80
Figura 26 - Média de formação de calos (%) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i> em função das concentrações de Al aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria, RS, UFSM, 2020.	80
Figura 27 – Altura média (cm) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i> em função das concentrações de alumínio (Al) aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....	81
Figura 28 - Médias de comprimento de raízes (cm) – (A) e numero de raízes – (B) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i> em função das concentrações de Alumínio (Al) aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....	82
Figura 29 – Representação ilustrativa de brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) cultivadas em meio nutritivo WPM na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i> na presença de alumínio (A – 0 mg L ⁻¹ ; B – 25 mg L ⁻¹ ; C – 50 mg L ⁻¹ ; D – 100 mg L ⁻¹ ; D – 200 mg L ⁻¹) aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria, UFSM, 2020.	83
Figura 30 - Média de formação de raízes primárias (%) em brotações de acoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) na fase de rizogênese <i>in vitro</i> em função das concentrações de Alumínio (Al), independente do período de cultivo <i>in vitro</i> (45 e 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.	85

Figura 31 – Altura média (cm) em brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase de rizogênese *in vitro* em função das concentrações de Al, para 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020. 86

Figura 32 - Representação ilustrativa de brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em função das concentrações de alumínio adicionadas ao meio nutritivo MS (A – 0 mg L⁻¹ ; B – 25 mg L⁻¹; C – 50 mg L⁻¹; D – 100 mg L⁻¹; D – 200 mg L⁻¹) aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, UFSM, 2020. 87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 A espécie – <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.	18
3.2 Utilização da biotecnologia na pesquisa com espécies florestais	22
3.3 Cultura de tecidos vegetais	23
3.4 Rizogênese <i>in vitro</i> de espécies lenhosas.....	24
3.5 Reguladores de crescimento e os fatores que influenciam no sistema radicular	26
3.5 Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de espécies lenhosas	27
3.6 Desempenho inicial de mudas micropropagadas a campo.....	28
3.7 Tolerância ao alumínio	29
4 CAPITULO I – RIZOGÊNESE IN VITRO, ACLIMATIZAÇÃO E DESEMPENHO INICIAL A CAMPO DE AÇOITA-CAVALO (<i>LUEHEA DIVARICATA</i> MART & ZUCC.)	31
4.1 Materiais e métodos	31
4.1.1 Obtenção do material vegetativo	31
4.1.1.1 Germinação <i>in vitro</i>	31
4.1.1.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	31
4.2 Rizogênese <i>in vitro</i> de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.)	32
4.2.1 O efeito dos meios nutritivos	32
4.2.2 O efeito do AIB.....	33
4.2.3 O efeito do meio de cultivo	34
4.3 Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.)	35
4.3.1 O efeito do AIB.....	36
4.3.2 O efeito do meio de cultivo	38
4.4 Desempenho inicial a campo de mudas micropropagadas de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.)	39
4.4.1 O efeito do AIB.....	40
4.4.2 O efeito do meio de cultivo	40
4.5 Análises estatísticas	40
4.6 Resultados e discussão	41
4.6.1 Rizogênese <i>in vitro</i> de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.)	41
4.6.1.1 O efeito dos meios nutritivos	41
4.6.1.2 O efeito do AIB	44
4.6.1.3 O efeito do meio de cultivo	47
4.6.2 Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.)	51
4.6.2.1 O efeito do AIB	51
4.6.2.2 O efeito do meio de cultivo	61
4.6.3 Desempenho inicial a campo de mudas micropropagadas de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.)	67
4.6.3.1 O efeito do AIB	67
4.6.3.2 O efeito do meio de cultivo	69

4.6.4 Conclusões.....	71
5 CAPITULO II - TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM AÇOITA-CAVALO (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.).....	72
5.1 Materiais e métodos.....	72
5.1.1 Obtenção do material vegetativo.....	72
5.1.1.1 Germinação <i>in vitro</i>	72
5.1.1.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	72
5.1.1.3 Preparo das soluções e do meio nutritivo.....	73
5.2 Tolerância <i>in vitro</i> de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc.) ao alumínio (Al).....	74
5.2.1 O efeito do alumínio na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i>	74
5.2.2 O efeito do alumínio na fase de rizogênese <i>in vitro</i>	74
5.3 Análises estatísticas.....	75
5.4 Resultados e discussão.....	76
5.4.2 O efeito do alumínio na fase inicial de desenvolvimento <i>in vitro</i>	76
5.4.3 O efeito do alumínio na fase de rizogênese <i>in vitro</i>	83
5.5 Conclusões.....	87
6 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
7 REFERÊNCIAS.....	91
8 ANEXOS.....	100

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, mesmo com a expansão das pesquisas e a alta demanda por conservação dos recursos florestais brasileiros, nota-se que ainda há resistência em introduzir os recursos nativos de uma forma sustentável na economia brasileira. As espécies nativas não participam ativamente do setor produtivo, contudo, mesmo que o setor econômico priorize estudos com espécies exóticas visando à produção comercial, há um crescente interesse das instituições de ensino e pesquisa em explorar os potenciais das espécies florestais nativas.

Conhecida popularmente como açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) é uma espécie arbórea integrante da família Malvaceae. Nativa no Brasil, espécie pioneira de rápido crescimento, característica de Florestas aluviais, de Mata ciliares e de galerias, de ocorrência natural em Florestas semidecíduas, Floresta ombrófila mista, Floresta ombrófila densa e na Floresta estacional decidual (LORENZI, 2014; CARVALHO, 2008).

O açoita-cavalo tem apresentado no estado do Rio Grande do Sul, devido a sua exploração de caráter predatório, uma redução drástica em seus exemplares com características adequadas ao uso comercial e ecológico (FARIAS, 2006). Ainda que não esteja na lista oficial de espécies em vias de extinção, a ação antrópica fez com que as populações naturais de açoita-cavalo, fossem degradadas, ocorrendo assim sua diminuição. Frente a esta situação, a conservação genética do açoita-cavalo é de grande importância para garantir a preservação da espécie (FLORES, 2007).

Com o interesse em recuperar áreas degradadas e para compor as áreas de preservação permanente, há um destaque na utilização de espécies nativas. A propagação vegetativa tem-se apresentado cada vez mais intensa, devido à busca da produção de mudas vigorosas e saudáveis para ser utilizadas em projetos de recuperação. Essa é considerada uma boa estratégia para produzir mudas visando à recomposição florestal, e, ainda, auxiliar na recuperação dos solos e da paisagem do local, com o uso de espécies nativas da região para que se tenha sucesso ao final do processo (DIAS et al., 2012; WENDLING et al., 2002).

A propagação vegetativa é uma boa alternativa de produção de mudas, levando em consideração que a multiplicação via sementes se caracteriza por apresentar uma grande variação em suas qualidades genéticas e fisiológicas

(LORENZI, 2014; CARVALHO, 2008). Outro fator limitante à propagação de açoita-cavalo via seminal é a qualidade do lote disponível, mesmo que as sementes sejam provenientes de matrizes conhecidas, com características fenotípicas relativamente favoráveis, há uma frequente limitação em obter sementes de boa qualidade sanitária.

Nesse sentido, a micropropagação da espécie já foi comprovada ser um meio viável de produção de mudas de elevada qualidade (FLORES, 2007; FLORES, 2011 et al.; LEÓN, 2010; LEÓN 2014; SILVA 2016; SILVA 2019) possibilitando a assim a formação de populações sadias para uso em projetos de recuperação de áreas degradadas. Esta forma de propagação vegetativa possibilita a produção de mudas em larga escala, ocupando espaços menores, durante ano todo, isenta de riscos de ambientais, climáticos e, além disso, dentro dos padrões desejáveis de fitossanidade (FLORES, 2007).

Adicionalmente os estudos relacionados à tolerância *in vitro* de genótipos de açoita-cavalo ao alumínio também são relevantes, tendo em vista, que no Brasil, há uma grande carência de trabalhos desenvolvidos e publicados caracterizando as espécies florestais em função à tolerância a esse metal (HARTWIG et al.,2007). A toxicidade de Al é um fator limitante à produção florestal, aja vista que esse estresse abiótico é considerado mais intenso que qualquer outro com exceção à seca, especialmente em solos brasileiros, que são predominantemente velhos e intemperizados, apresentando baixa fertilidade, acidez e elevados teores de alumínio. Isso acarreta sérios problemas ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas, limitando-as de obter efetivamente o aproveitamento da água e nutrientes acrescidos ao solo por meio dos fertilizantes (SOUZA et al., 2008).

Frente ao interesse por espécies nativas em programas de reflorestamento e pesquisas sobre as potencialidades das espécies florestais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as etapas de rizogênese *in vitro*, primeiramente, os meios nutritivos, em seguida o efeito do AIB e meio de cultivo, a etapa de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* e seu desempenho inicial a campo, e por fim verificar a tolerância *in vitro* de genótipos ao alumínio na fase estabelecimento e rizogênese *in vitro*, a fim de subsidiar a realização de trabalhos relacionados à conservação genética, garantindo a disponibilidade de material propagativo para o futuro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as etapas de rizogênese *in vitro* e aclimatização *in vitro* e *ex vitro* da micropropagação de açoita-cavalo, seu desempenho inicial a campo, bem como verificar a tolerância *in vitro* de genótipos ao alumínio.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar e selecionar meios nutritivos eficientes e o efeito do período de cultivo na a rizogênese *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do Ácido 3-Indolbutírico (AIB) adicionados ao meio nutritivo sobre a rizogenese *in vitro* e a subsequente aclimatização *in vitro* e *ex vitro* das plantas microprogadas de açoita-cavalo.
- Testar e selecionar volumes de meio nutritivo da composição do meio de cultivo eficientes para a rizogênese *in vitro* de açoita-cavalo, bem como a subsequente aclimatização *in vitro* e *ex vitro* das plantas micropropagadas.
- Analisar o desempenho inicial das plantas micropropagadas em condições de campo.
- Estudar a tolerância *in vitro* de genótipos ao alumínio nas fases da micropropagação no desenvolvimento inicial e rizogênese *in vitro*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie – *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

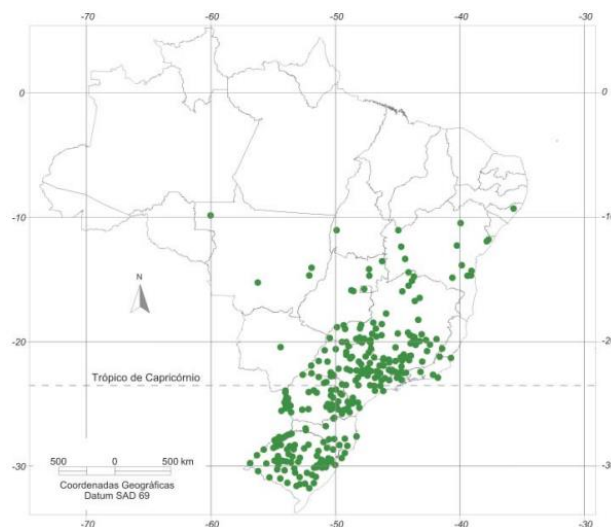
Luehea divaricata Mart. & Zucc., é uma espécie pertencente ao Bioma Mata Atlântica, conhecido por apresentar grande biodiversidade e extensa área no Brasil, ao longo da costa litorânea, tem como parte da sua floresta. A espécie é conhecida popularmente na região sul do Brasil como açoita-cavalo e nas demais, por caiboti, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, ivatingui e pau-de-canga e integra à família Malvaceae sendo que seu gênero possui cerca de 20 espécies na América tropical, a maior parte no Brasil, ocorrendo naturalmente em mata semidecídua, em quatro regiões brasileiras, com restrição à região Norte. Distribui-se na Floresta Atlântica, do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, em Minas Gerais, no vale do Rio Doce, no

interior de São Paulo e Mato Grosso (BRUNELLI et al, 1997; LORENZI, 2014; SOBRAL et al, 2006;).

Devido ao processo de desmatamento e fragmentação, a área brasileira do Bioma Mata Atlântica sofreu uma redução em sua cobertura, de 15% a aproximadamente 7,91%, que apresenta grande relevância quanto a sua biodiversidade e aos serviços que prestados a sociedade. O que justifica a realização de trabalhos de recuperação das espécies que compõem este importante bioma (HIROTA, 2013; IBF, 2019; MENDONÇA et al., 2017).

É uma espécie decídua, a qual perde suas folhas no inverno, heliófita, e tem preferência por lugares úmidos, características das florestas de matas ciliares e de galeria. A dispersão de suas sementes sucede em floresta mais aberta, sendo irregular e descontínua, ocorrendo particularmente ao longo dos rios, terrenos rochosos e íngremes. Tem ocorrência preferencialmente em solos com textura arenosa e bem drenados, no entanto, em plantios, tem crescido melhor em solos de fertilidade química alta e de textura franca-argilosa (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2014).

Figura 1- Locais identificados de ocorrência natural de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) no Brasil.



Fonte: CARVALHO (2008).

A altura da espécie varia de 5 a 25 metros, com diâmetro de tronco de cerca de 50 a 60 centímetros, que geralmente é tortuoso e nodoso, com base alargada e

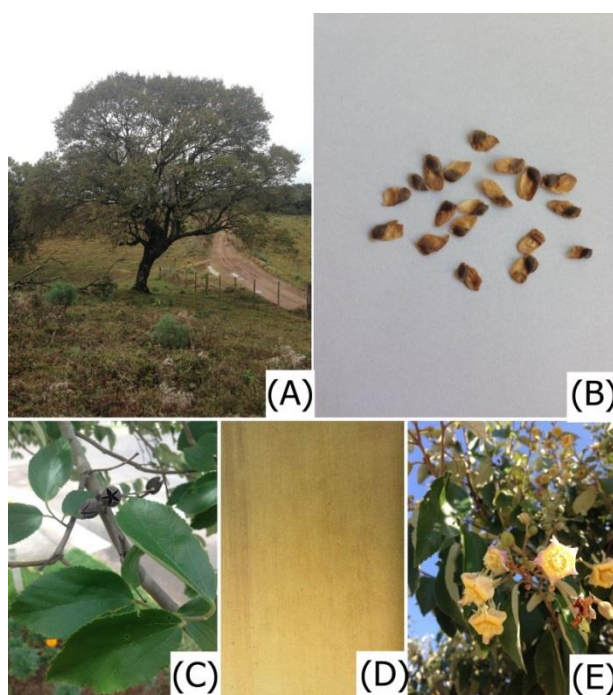
um fuste comumente curto de 4 a 6 metros de comprimento. Porém, no interior de floresta densa, possui tronco mais alto e relativamente reto (LORENZI, 2014; REITZ et al., 1988).

Suas folhas são simples, alternas, dísticas, com estipulas, irregularmente serreadas, com três nervuras típicas e quanto ao seu formato, variam de obovadas a oblongas. Em sua face superior são quase glabras e na inferior densamente pubescentes, recobertas por tricomas estrelados e esbranquiçados. Sua ramificação é irregular e sua copa é larga, seus ramos são laxos, revestidos com córtex escurecido, lenticelados e glabros, quando adultos e quando jovens apresentam pêlos estrelados e cor-de-canela no ápice dos ramos jovens (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2002;).

Tendo em vista sua fenologia, seu florescimento ocorre de dezembro a fevereiro, predominantemente no verão que ocorre no hemisfério sul, e a maturação dos seus frutos ocorre durante os meses de maio a agosto, entre o outono e o inverno também no hemisfério sul. Suas flores são hermafroditas, róseas e amarelas, dispostas em inflorescências multifloras e terminais, e seus frutos são cápsulas deiscentes, lenhosas, pubescentes, com cinco lóculos de coloração castanha, com densa pilosidade, medindo de dois a três cm de comprimento. Cada um de seus frutos possui de cinco a quinze sementes aladas e sua dispersão ocorre pelo vento (LORENZI, 2002; LORENZI, 2014).

As sementes de açoita-cavalo apresentam longevidade mais ou menos curta, porque a viabilidade das sementes é muito variável; há sementes que semeadas imediatamente após a coleta germinaram 50% a mais do que sementes semeadas àquelas após 60 dias da coleta. No entanto, existem relatos de que sementes armazenadas por um mês obtiveram 17% de germinação, e outras armazenadas por 22 meses alcançaram, cerca de 45,5%. (CARVALHO, 2008; LORENZI, 2014). Desta forma, Fowler (2000) classificou as sementes de açoita-cavalo, quanto ao armazenamento, como ortodoxas, podendo ser secas a teores de umidade abaixo de 5% (base seca) e armazenadas a baixas temperaturas, por longos períodos, ocorrendo a redução da atividade metabólica sem prejuízo da qualidade fisiológica.

Figura 2 - Aspectos silviculturais de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.): A – Árvore adulta; B – Sementes; C – Folhas e frutos; D – Madeira; E – Flores.



Fonte: Autora (2020).

Sua casca destaca-se por ser utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e antirreumática. Suas folhas são utilizadas como fitoterápicas, no combate a reumatismo e tumores; a infusão de suas flores é empregada contra bronquite, e a raiz é depurativa. A madeira de açoita-cavalo é moderadamente pesada com peso específico básico de 0,6-0,7 g cm³, anéis de crescimento bem distintos, cerne de coloração marrom e avermelhado, com textura média, grã direita, resistente e ligeiramente flexível, de baixa resistência ao ataque de organismos xilófagos. Seu cerne é bege-claro-amarelado, rosado, levemente acinzentado, ou ainda, róseo-pardacento (BIGHETTI, 2004; LORENZI, 2014; MAINIERI, 1983; TANAKA et al., 2005).

A madeira de açoita-cavalo é empregada em estruturas de móveis, confecção de móveis vergados, coronhas de armas, caixotaria, cadeiras, tamancos, salto de calçados, peças torneadas, contraplacados, e na construção civil, em ripas, molduras rodapés e guarnições, o que justifica seu uso por se tratar de uma madeira de boa qualidade, extremamente flexível, com média retratibilidade e baixa resistência mecânica. A espécie é também utilizada para a confecção de brinquedos, artigos para esportes, cabos de ferramentas, corpo para gaitas, entre outros. Além

da vasta utilização da madeira, a planta possui características ornamentais, sendo muito recomendada para o paisagismo, e também é indicada para reflorestamentos mistos de áreas destinadas à preservação, por ser uma espécie pioneira de rápido crescimento (LORENZI, 2014; RIZZINI, 1971; SOUZA, 1983).

O açoita-cavalo pode ser utilizado em Programas de Recuperação de Áreas Degradadas, também compor a Reserva Legal e Área de Preservação Permanente, e por esta razão, os estudos relacionados à silvicultura da espécie, são relevantes quanto à formação e produção das mudas, a fim de suprir as demandas e torná-las disponíveis aos viveiros, apresentando qualidade e vigor.

3.2 Utilização da biotecnologia na pesquisa com espécies florestais

O melhoramento e as técnicas silviculturais com enfoque em espécies florestais estão em franco desenvolvimento, tanto por parte das empresas privadas quanto nas instituições públicas de pesquisa, não somente devido à importância econômica das espécies florestais, com características fenotípicas desejáveis, mas também em busca de mudas de qualidade (SARTORETTO et al., 2008).

A propagação de espécies nativas, que por falta de informações silviculturais e em função do baixo custo de produção, tem sido feita predominantemente via sementes, pode ser alternativamente efetuada pela propagação vegetativa que consiste em uma boa opção para a produção de mudas geneticamente uniformes, em que é fixado o componente genético total, obtendo-se maiores ganhos em uma mesma geração e contrapondo-se à propagação seminal aja vista a possibilidade de comprometimento do seu sucesso pela possibilidade de baixa porcentagem de germinação e uma insatisfatória condição sanitária dos lotes disponíveis (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; SANTOS, 2000).

Novos indivíduos são formados a partir de uma planta doadora através de seus propágulos vegetativos, como caules, folhas e raízes. Toda informação genética necessária à regeneração e desenvolvimento de uma planta completa está situada no núcleo da célula de todo organismo vegetal, e esta capacidade ocorre devido à totipotência das células, que promove o processo de divisão celular, tornando possível produzir outro indivíduo através de propágulos (FREITAS, 2012; HARTMANN et al., 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Diferente de mudas obtidas via sementes, que apresentam raízes mais profundas e pivotantes, as mudas oriundas da propagação vegetativa apresentam um sistema radicular raso, por sua vez mais frágil e apenas com raízes adventícias (WENDLING, 2004). No entanto, a clonagem de material genético superior em escala comercial tem superado a formação de plantios por mudas via sementes, por apresentar características desejáveis e uniformidade na produção, e tem avançado cada vez mais no setor florestal, como por exemplo, na eucaliptocultura (XAVIER et al., 2009; WENDLING, 2004).

O enraizamento adequado para formação de mudas de qualidade pode ser influenciado pelas condições de crescimento, idade e de características internas da planta-matriz, bem como por um substrato adequado que proporcione uma boa aeração e drenagem para a espécie se desenvolver (MARKS et al., 2002).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais, em particular, oferecem um grande potencial para a rápida multiplicação *in vitro*. Desta maneira, o emprego da biotecnologia para o ganho em produtividade e sustentabilidade pode ser considerada uma das prioridades mundiais, já que são necessárias estas técnicas para garantir a manutenção das espécies e para suprir a demanda por produtos oriundos de espécies vegetais (GOLLE, 2010).

3.3 Cultura de tecidos vegetais

A propagação vegetativa via cultura de tecidos vegetais, consiste na manutenção, propagação e regeneração de brotações de tamanho relativamente reduzido denominado explantes. Os explantes são cultivados de forma asséptica em um meio nutritivo sob condições controladas (*in vitro*) e em um ambiente livre de micro-organismos, baseada na teoria da totipotência das células (TERMIGNONI, 2005).

As técnicas da cultura de tecidos que são utilizadas com a finalidade de propagação, denominando-se no coletivo como micropropagação, sendo a técnica mais utilizada em programas de melhoramento florestal, pois permite a multiplicação e manutenção de mudas de forma rápida, em curtos períodos de tempo e espaço físico reduzido, permitindo a obtenção de clones mais produtivos (COUTO et al., 2004; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998)

Nesta técnica, utilizam-se meios nutritivos, contendo micronutrientes, macronutrientes, vitaminas, fonte de carboidratos, para que as plantas se desenvolvam adequadamente e que atendem às necessidades de cada vegetal. Empregam-se formulações específicas e, quando necessário, são adicionados ao meio nutritivo reguladores de crescimento como auxinas, citocininas e giberelinas (BARRUETO, 2000). Após o estabelecimento *in vitro* das brotações pode ser efetuada sua indução à rizogênese e subseqüentemente sua aclimatização (DODDS; ROBERTS, 1995).

Estudos anteriores relacionados à micropropagação foram realizados com *Luehea divaricata* Mart & Zucc. (açoita-cavalo) em nosso grupo de pesquisa pertencente ao Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, com contribuições em dissertações, teses e artigos desde a fase germinação, estabelecimento, multiplicação (FLÔRES et al., 2007; FLÔRES et al., 2011; LÉON, 2010; LEÓN, 2014) rizogênese *in vitro* (SILVA, 2016; SILVA et al., 2019) estendendo-se até a aclimatização (SILVA, 2016). O presente trabalho busca aperfeiçoar as fases de rizogênese *in vitro* e aclimatização *in vitro/ex vitro* até o desempenho inicial das mudas a campo, a fim de abranger o protocolo completo de micropropagação.

3.4 Rizogênese *in vitro* de espécies lenhosas

Para a micropropagação, a fase de rizogênese *in vitro* é uma das etapas mais relevantes, pois ocorre a formação de raízes adventícias, que possuem papel crucial para a absorção de água e de nutrientes, e estão relacionadas diretamente com as auxinas, que contribuem para a divisão celular e para o desenvolvimento das raízes proporcionando maior índice de sobrevivência das plantas após o cultivo *in vitro* (SAINI et al., 2013).

No cultivo *in vitro* os brotos obtidos, na maioria das vezes não apresentam raízes e por isso passam por uma fase de indução a rizogênese em um meio favorável à indução de raízes, preparando as mudas para o transplante do ambiente de cultivo controlado para o ambiente em casa de vegetação e campo. Algumas espécies, principalmente as lenhosas, possuem dificuldades ao enraizar ou até não enraízam, mesmo que na presença de auxinas, e outras dispensam o uso de reguladores de crescimento no seu enraizamento (SOARES et al., 2006).

Produzir mudas com qualidade e potencial produtivo, o principal critério de seleção, é a formação do sistema radicular bem desenvolvido. O processo de formação de raízes a partir de propágulos está associado ao processo de desdiferenciação e às células totipotentes, e assim, o sistema radicular pode emergir diretamente dos explantes. E desta maneira, também pode ocorrer a desorganização e a desdiferenciação de células parenquimáticas, formando massas proliferativas, que constituem os calos, que de forma indireta podem induzir a formação das raízes adventícias (GOULART et al., 2014; XAVIER et al., 2013).

Para estabelecer um protocolo de rizogênese *in vitro*, é importante ajustar o meio nutritivo mais adequado para a fase e para a espécie, e que supra as necessidades das plantas, a fim desenvolvê-las na proporção raiz parte aérea, e neste sentido, podem ser adicionados ou não outros componentes a partir da sua composição básica (SANTOS et al., 2005).

Dos meios nutritivos já estabelecidos em literatura, tem-se o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), cada um com suas características específicas. O meio nutritivo MS foi formulado primeiro que o WPM, sendo específico para o cultivo *in vitro* de tabaco (*Nicotiana sp.*) e adaptado para as demais espécies herbáceas e possuem um alto teor de macronutrientes, no entanto, ele não foi tão eficiente para algumas espécies lenhosas, e desta forma, foram elaboradas estratégias reduzindo os macronutrientes para alcançar resultados mais satisfatórios ou a sua substituição pelo WPM, a partir da sua formulação para as espécies lenhosas. O meio nutritivo WPM possui na sua composição mais potássio e alto índice de íons sulfato comparado ao MS, já o meio nutritivo MS possui elevadas concentrações de sais minerais (PASQUAL, 2001; QUISEN; ANGELO, 2008).

Ao meio nutritivo podem ser adicionadas concentrações de auxinas para induzir a formação de raízes *in vitro*, e tentar garantir o sucesso na fase de rizogênese *in vitro* (ROCHA, 2006). Além da adição de auxinas ao meio nutritivo, podem ser adicionados materiais inertes nesta fase de rizogênese *in vitro*, como por exemplo, a vermiculita, quando combinados também chamados de meio de cultivo, sendo uma alternativa mais econômica e uma fonte de aeração e pela vermiculita ser um material mais poroso, podendo aumentar a taxa de respiração, a disponibilidade e absorção de nutrientes favorecendo a formação de raízes (CALDAS et al., 1998; KOZAI; KUBOTA, 2001; LEITE et al., 2002).

O meio de cultivo contendo vermiculita produz raízes mais rústicas e com presença de raízes secundárias, que são determinantes para a elevada taxa de sobrevivência (VIEIRA et al., 2007).

3.5 Reguladores de crescimento e os fatores que influenciam no sistema radicular

Um sistema radicular bem desenvolvido contribui para a sobrevivência e crescimento *in vitro* das plantas, no entanto, a capacidade dos tecidos em formar raízes depende de vários fatores endógenos e/ou exógenos e suas interações, sendo que a etapa de rizogênese *in vitro* é entendida ao processo de desenvolvimento de raízes adventícias provenientes da multiplicação, possibilitando o subsequente transplante para o ambiente *ex vitro* após esta fase (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Fatores internos e externos podem influenciar na rizogênese das plantas micropropagadas, alguns fatores são intrínsecos da planta e envolvem as condições fisiológicas, nutricionais e sanitárias, assim como, o potencial do material genético, como idade da planta doadora, a ocorrência de folhas e gemas, tipo de brotações e o balanço hormonal. Em geral, as plantas advindas da propagação vegetativa possuem hormônios endógenos que inibem ou promovem a rizogênese, e desta forma, faz-se necessário favorecer o balanço entre as auxinas, citocininas, giberelinas e outros. Para a formação de raízes e crescimento dos brotos, é importante o equilíbrio entre as auxinas e citocininas (ALFENAS et al., 2004; FACHINELLO et al., 2005; XAVIER et al., 2013).

Dos reguladores de crescimento, as auxinas destacam-se por desencadear e estimular a formação das raízes adventícias, enquanto as citocininas influenciam na produção de raízes, especificamente na divisão celular. Para favorecer a rizogênese e a formação de brotos, é realizada a aplicação exógena de reguladores de crescimento sintéticos, sendo uma das auxinas mais utilizadas para o enraizamento é o Ácido 3-Indolbutírico (AIB) por se tratar de uma substância fotoestável, de ação localizada e menos sensível à degradação biológica, em comparação com as demais auxinas sintéticas (HARTMANN et al., 2011; PIRES et al., 2013; TAIZ et al. 2017; XAVIER et al., 2013; WENDLING et al., 2014).

Cada espécie possui uma maneira de responder às adições de auxinas, além disso, elevadas concentrações de auxinas pode influenciar de forma negativa na indução e crescimento radicular, promovendo até a formação de calos na base das brotações, afetando a qualidade do sistema radicular e também sendo capaz de comprometer as próximas fases de aclimatização e a campo (FACHINELLO et al., 1995; ROGALSKI et al., 2003).

As reações em relação às concentrações distintas de auxinas variam de acordo com as espécies ou até mesmo em cultivares diferentes, sendo assim a concentração ótima para uma espécie, pode ser insuficiente ou muito elevada para outra. Há diversas evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

3.5 Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de espécies lenhosas

Uma fase muito delicada das plantas oriundas do cultivo *in vitro* é a aclimatização, que é apontada como uma das etapas mais críticas do processo adaptativo, na qual ocorre a maioria de suas perdas. Após remover as espécies lenhosas do meio nutritivo *in vitro*, encontram-se dificuldades em relação à sobrevivência e o estabelecimento de *ex vitro* de plantas micropropagadas, sendo assim, a transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* pode levá-las ao estresse ou até mesmo à morte (SOUZA JÚNIOR et al., 2001).

Ela compreende um conjunto de técnicas e procedimentos a fim de adaptar as mudas micropropagadas advindas da rizogênese *in vitro* para as condições primeiramente em casa de vegetação (*ex vitro*) e após campo, saindo das condições controladas em sala de cultivo (heterotrófica) para condições susceptíveis ao ambiente (autotrófica) (SANTOS et al., 2014). É importante este processo gradual e o cuidado para transferência das plantas micropropagadas, pois elas passam de um ambiente totalmente propício sem gasto energético para outro que necessita aumentar as taxas transpiratórias e decorrer ao estresse hídrico (OLIVEIRA, et al., 2013; ROCHA, et al., 2008; XAVIER, et al., 2009).

Nesta fase, as plantas não devem ser expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais, sendo adequado transferi-las de forma gradativa e cuidadosa das condições *in vitro* para o crescimento em ambiente externo, com objetivo de evitar danos à espécie. Mesmo que a planta crie adaptações ao longo do tempo, o

período inicial da mudança de ambientes e substratos é a etapa mais difícil, pois ocorre alta perda de água por transpiração e embora tenha formado raízes na fase *in vitro*, a absorção de água e nutrientes pode ser comprometida pela falta de eficiência das raízes adaptadas ao cultivo (SILVA et al., 2011).

No processo de aclimatização, as plantas irão desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condução estomática, ativar as formas de controle de perda de água pelas células e elevar a taxa fotossintética em condições de elevado CO₂ presente na atmosfera (DÍAZ-PEREZ et al., 1995; SUTTER, 1988; VANTELGEN et al., 1992).

Dessa maneira, são submetidas à redução na umidade do ar e à temperatura instável, para que possam suportar a transferência para novo substrato e, assim, sobreviver e se desenvolver sem restrições às condições naturais de campo (SILVA et al., 1995).

3.6 Desempenho inicial de mudas micropropagadas a campo

As etapas para garantir o sucesso do plantio de mudas são baseadas na limpeza do local, em observar a presença de pragas e doenças, assim como espécies invasoras, também deve-se atentar ao transporte das plantas com cuidado até o local de plantio, a umidade adequada para que não ocorra perda de vigor, a abertura da cova do tamanho adequado para a entrada das raízes e após o plantio monitorar a área, como por exemplo, o controle de plantas competidoras, pragas e doenças, além disso, fazer adubação quando necessário (MELO et al., 2018).

As plantas para serem levadas a campo necessitam estar adaptadas às condições adversas do ambiente, no entanto, devem ser implantadas a locais típicos em que a espécie ocorre. Os aspectos fitossanitários também devem ser considerados, bem como a qualidade das mudas, através dos aspectos visuais, morfológicos (altura e diâmetro) e fisiológicos que influenciam nas condições a campo (ANTONIAZZI et al., 2013; FONSECA, 2000; GOMES; PAIVA, 2011; HAASE, 2008; MELO et al., 2018).

As variáveis diâmetro e altura tem uma forte relação com o estado da planta a campo e sua possível sobrevivência, as plantas com maior diâmetro possuem maior ancoragem e sustentação impedindo o seu tombamento, já a altura diz respeito ao crescimento das plantas, influenciando no desenvolvimento e adaptação

das plantas a campo (MOREIRA; MOREIRA, 1996; MORAES NETO et al., 2000; SOUZA et al., 2006). As mudas devem ser selecionadas ainda em casa vegetação de acordo com sua qualidade morfológica, fisiológica e sanitária, priorizando as plantas com sistema radicular bem desenvolvido e com presença de raízes secundárias (GONÇALVES et al., 2005).

3.7 Tolerância ao alumínio

Estudos apontam que aproximadamente 50% das terras do planeta são potencialmente cultiváveis, sendo 30% destas áreas constituídas de solos ácidos (KOCHIAN et al., 2004). Os maiores problemas de toxicidade em solos com pH ácido (abaixo de 5,0) são causados pela disponibilidade de um dos principais fatores limitantes para o desenvolvimento das plantas, a grande concentração de alumínio (Al), que compromete o crescimento vegetal. Os minerais primários e secundários das rochas formados pela ação do intemperismo, possuem em sua maior parte o Al, que é considerado o metal mais abundante no solo. Ao reagir com a água na presença de gás carbônico, ocorre liberação do alumínio na forma trocável (Al^{3+}), sendo o pH considerado o principal fator de controle da sua disponibilidade no solo, pois o hidrogênio (H^+) atua sobre os minerais liberando esses íons (MALAVOLTA, 1980).

Considera-se a melhor alternativa para o acréscimo na produção em solos ácidos com concentrações altas de alumínio (Al), a seleção de espécies que toleram vários níveis desse metal. Com essa finalidade, podem ser aplicados diferentes métodos de análise, como o uso de soluções nutritivas e da cultura de campo, bem como da seleção *in vitro* de genótipos tolerantes ao Al (ECHART; CAVALLIMOLINA, 2001; SANCHEZ-CHACÓN et al., 2002).

Identificar espécies tolerantes ao Al consiste em selecionar plantas mais produtivas e adaptadas a condições adversas, de estresse, sendo uma estratégia considerada indispensável em programas de melhoramento genético, podendo amenizar os problemas de produtividade em solos ácidos, promovendo a melhor adaptação das condições nutricionais adversas em genótipos superiores (FREITAS et al., 2006). De uma maneira geral, as plantas que possuem a capacidade de manter em suas raízes ou em sua parte aérea níveis apropriados de certos nutrientes essenciais são consideradas espécies vegetais tolerantes ao alumínio

(MENDONÇA et al., 2003). A toxicidade gerada pelo alumínio é manifestada pela redução na taxa de crescimento radicular e da drástica diminuição no crescimento da parte aérea quando a planta é mantida em solução contendo esse elemento (BEUTLER et al., 2001; CUSTÓDIO et al., 2002).

Não há registro na literatura sobre a tolerância *in vitro* ao Al de açoita-cavalo, somente do efeito do alumínio sobre parâmetros bioquímicos em sistema hidropônico e que foi observada uma tolerância moderada ao alumínio (SASSO et al., 2017). Estudos realizados com clones de *Ilex paraguariensis* St. Hil (erva-mate) em solução nutritiva concluíram que em altas concentrações de alumínio é observado um aumento no crescimento de raízes, em especial o alongamento. Esses resultados indicam que a espécie é tolerante ao Al e que o metal estimula o crescimento radicular (BENEDETTI et al., 2017).

O alumínio pode atuar em vários órgãos da planta e de forma diferente sobre os genótipos das plantas, no entanto, é no sistema radicular em que ocorre o primeiro contato com o alumínio, por sua vez é nele que ocorrem os sintomas mais severos e o mais comum é a inibição do crescimento das raízes. Adicionalmente, não se deve generalizar e sugerir que uma espécie é tolerante ao alumínio com base em apenas um genótipo, pois pode ocorrer uma variação nos mecanismos tolerantes ao alumínio. E para efetuar uma avaliação adequada dos genótipos tolerantes ao alumínio, é ideal o cultivo sob condições controladas, como na micropropagação, o uso do meio nutritivo transparente facilita a visualização do sistema radicular possibilitando o monitoramento e o controle da faixa de pH ao meio nutritivo em que o metal se encontra disponível (4,0 – 4,5) (KOCHIAN et al., 2004; ROSSIELLO; NETTO, 2006; TABALDI, 2008).

Alguns estudos relatam o comportamento das plantas tolerantes ao alumínio, que estão sujeitas a diferentes formas e dependem das concentrações desse metal, do pH do meio de cultivo ou do solo, da fase de desenvolvimento das plantas, dos genótipos e também da espécie (POSCHENRIEDER et al., 2008).

Além de atingir o sistema radicular em sintomas visíveis, há estudos que afirmam que o alumínio ao chegar às folhas pode promover uma redução na clorofila, na fotossíntese, na abertura de estômatos e transpiração, as quais são vitais para a produção e síntese de carboidratos essenciais a planta. Além disso, o alumínio pode comprometer o núcleo das células e formar cromossomos irregulares,

reduzindo as células mitóticas e a divisão celular em si (ALI et al. 2008 ; RIBEIRO et al., 2013; YI et al., 2010).

4 CAPITULO I – RIZOGÊNESE *IN VITRO*, ACLIMATIZAÇÃO E DESEMPENHO INICIAL A CAMPO DE AÇOITA-CAVALO (*LUEHEA DIVARICATA* MART & ZUCC.)

4.1 Materiais e métodos

Os experimentos a seguir foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais localizado na Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, em Santa Maria, RS.

4.1.1 Obtenção do material vegetativo

4.1.1.1 Germinação *in vitro*

Para os experimentos *in vitro* foram empregadas sementes que estavam armazenadas em sacos de papel kraft a 8-10° C de temperatura e que foram coletadas no ano de 2012 em oito árvores doadoras da região Noroeste do Rio Grande do Sul, entre os municípios de Ijuí e Entre-Ijuís, Bozano e Coronel Barros.

Antes da inoculação em meio nutritivo, as sementes foram previamente desinfestadas em mesa de fluxo laminar, com todos os materiais devidamente esterilizados sob luz ultravioleta (UV) ou em autoclave por 40 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Na sequência, as sementes foram imersas em: a) água destilada e autoclavada sob temperatura de 60±5°C durante 10 min; b) em solução etanólica a 70% (v/v) durante 1 min; c) em solução de hipoclorito de sódio a 3% (v/v) durante 10 min; d) em solução de hipoclorito de cálcio a 2% (v/v) durante 10 min; e e) por fim, foi realizado um triplo enxague com água destilada e autoclavada.

Foram colocadas quatro sementes de açoita-cavalo em cada frasco, as quais foram cultivadas em meio nutritivo MS, durante um período de 60 dias, conforme metodologia desenvolvida por Flôres (2007) e León (2010).

4.1.1.2 Estabelecimento *in vitro*

Decorridos 60 dias da implantação da germinação *in vitro*, descrita anteriormente, das plantas de açoita-cavalo foram isolados segmentos nodais, com

aproximadamente 0,8 a 1 cm de comprimento a fim de padronizar o tamanho dos explantes para os experimentos subsequentes. Os segmentos nodais foram inoculados em meio nutritivo Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980), conforme metodologia desenvolvida por Flôres (2007), e cultivados durante 30 dias.

4.2 Rizogênese *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.)

4.2.1 O efeito dos meios nutritivos

Este experimento foi instalado em 05/09/2018 e foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2 no qual foram testadas combinações de meios nutritivos (Murashige and Skoog (1962) na concentração total de sais – MS, MS reduzido à metade de sua concentração inicial - MS/2, Woody Plant Medium – WPM ou WPM reduzido à metade de sua concentração inicial - WPM/2) e dois períodos de cultivo (45 ou 60 dias) na rizogênese *in vitro* de açoita-cavalo. Foram utilizadas 12 repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio de nutritivo e três segmentos nodais, totalizando 96 unidades experimentais e 288 unidades amostrais.

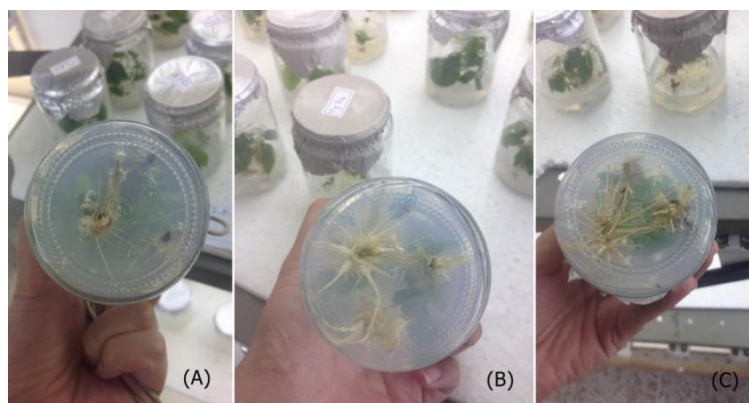
Previamente à inoculação dos explantes, o meio nutritivo foi acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (ou 50 mg L⁻¹ nos tratamentos em que a concentração de sais foi reduzida à metade) e 7 g L⁻¹ de ágar, o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Após a inoculação dos explantes, em câmara de fluxo laminar, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 45 (out/2018) e 60 dias (nov/2018) de cultivo *in vitro*, e as variáveis analisadas foram: sobrevivência (explantes com coloração verde), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), explantes com formação de raiz primária e com formação de raiz secundária, todas expressas em porcentagem. Na última avaliação, aos 60 dias, foram avaliados, ainda, o comprimento da raiz primária (cm) e a altura das plantas (cm), medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar.

4.2.2 O efeito do AIB

Este ensaio foi instalado em 24/01/2019 e foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, em que os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) (0, 10, 20 ou 40 μM) por 30 dias. Não houve necessidade de estender o período de cultivo, além de 30 dias, porque o desenvolvimento radicular foi adequado dentro desse período, conforme pode ser observado na Figura 3, a seguir. Neste ensaio foram utilizadas com 10 repetições, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três segmentos nodais.

Figura 3 - Aspectos visíveis do desenvolvimento radicular dos explantes de acoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), antes de 30 dias de cultivo. A – Tratamento testemunha (0 μM); B e C – tratamentos com presença de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2019.



Fonte: Autora (2020).

Foi utilizado no presente ensaio o meio nutritivo MS, que foi o que apresentou, de maneira geral, o melhor desempenho no item 4.2.1, sendo a ele adicionado Ácido 3-Indolbutírico (AIB), conforme o tratamento.

Previamente à inoculação dos explantes, o meio nutritivo foi acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar, e o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar. Na sequência, os frascos foram autoclavados por 15 min a 121 $^{\circ}\text{C}$ e 1atm. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25 ± 3 $^{\circ}\text{C}$,

fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 30 dias (fev/2019) de cultivo *in vitro* e as variáveis analisadas foram: sobrevivência (explantes com coloração verde), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), contaminação por micro-organismos (presença de micélios fúngicos ou colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), explantes com formação de raiz primária e com formação de raiz secundária, todas expressas em porcentagem. Na última avaliação, aos 60 dias, foram avaliados, ainda, número de raízes, o comprimento da raiz primária (cm) e a altura das plantas (cm), medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar.

4.2.3 O efeito do meio de cultivo

Este experimento foi instalado em 18/01/2019 e foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo utilizado o meio nutritivo MS, que apresentou os melhores resultados no item 4.2.1. Os tratamentos consistiram de combinações de vermiculita de granulometria fina (30 cm^3) com diferentes volumes de meio nutritivo (10; 20; ou 30 mL), a qual será doravante referida como meio de cultivo. Foram utilizadas 10 repetições, cada uma composta por um frasco, com volume de 150 mL preenchidos com o meio de cultivo contendo três segmentos nodais.

Previamente à inoculação dos explantes, o meio nutritivo foi acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar, e o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar. Na sequência, os frascos foram autoclavados por 15 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1atm. 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 16h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas aos 45 (fev/2019) e 60 dias (mar/2019) de cultivo *in vitro*, e foram analisadas apenas as variáveis: sobrevivência (explantes com coloração verde) e contaminação por micro-organismos (presença de micélios fúngicos ou colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), devido à dificuldade que o substrato proporcionou na visualização de aspectos de

enraizamento. Na última avaliação, aos 60 dias, foram avaliados explantes com a formação de raiz primária, formação de raiz secundária, formação de calos na base, todas expressas em porcentagem, número de raízes, comprimento da raiz primária (cm) e a altura das plantas (cm), medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar.

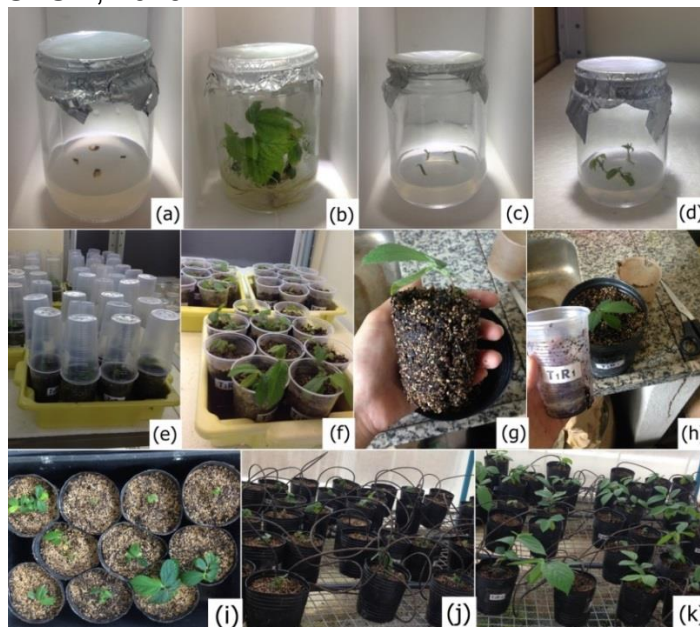
4.3 Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.)

Nos dois experimentos descritos a seguir foram realizadas etapas comuns, as quais as plantas foram submetidas até final de sua aclimatização (Figura 4).

Dos frascos de vidro, as plantas foram transferidas para copos plásticos contendo cinco perfurações em sua base, os quais tinham capacidade para 250 mL e foram preenchidos com uma mistura de substrato Mec Plant® e vermiculita, na proporção 1:1. Esses copos foram cobertos com outros copos de mesmo tamanho e igualmente perfurados, para permitir trocas gasosas entre o ambiente externo e o microclima criado no interior dos copos.

Em seguida, os copos foram distribuídos em bandejas plásticas contendo, em sua base, uma lâmina de água destilada de 10mm. As bandejas foram dispostas em sala de cultivo sob temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Diariamente, foi verificada a umidade no interior dos copos e, quando necessário, acrescidos 10mL de água destilada para manter o turgor hídrico das plantas.

Figura 4 - Etapas da rizogênese *in vitro* e aclimatização de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), a – fase germinação *in vitro* das sementes (60 dias); b – plantas resultantes da germinação *in vitro*, das quais serão isolados os explantes; c – fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais (30 dias); d – culturas em fase de rizogênese *in vitro* ; e – fase da aclimatização *in vitro* das plantas micropropagadas; f – fase da aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas; g e h – transferência das plantas aclimatizadas em copos plásticos para vasos plásticos com capacidade de 1L; i – transferência das plantas para casa de vegetação, j, k – aspectos de desenvolvimento das plantas em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2019.



Fonte: Autora (2020).

4.3.1 O efeito do AIB

Este ensaio foi instalado em sua primeira etapa em 24/02/2019, dando início à aclimatização *in vitro* e, na sequência, à aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas no experimento de rizogênese *in vitro*: O efeito do Ácido 3-Indolbutírico (AIB) (item 4.6.1.2). Efetuada a última avaliação do referido experimento, aos 30 dias de cultivo, de cada três plantas de cada repetição apenas uma foi selecionada, utilizando-se como critério o desenvolvimento observado na fase de rizogênese *in vitro*.

1ª etapa: período de aclimatização *in vitro* (20 dias em sala de cultivo)

Esta etapa foi conduzida em delineamento blocos ao acaso, em arranjo bifatorial 4x2, em que o primeiro fator consistiu das concentrações de AIB (0, 10, 20

ou 40 μM) avaliadas no experimento de rizogênese *in vitro*: “o efeito do AIB”, anteriormente descrito, e o segundo fator consistiu dos dois subperíodos de aclimatização *in vitro* (10 ou 20 dias).

Os copos sob as plantas micropropagadas permaneceram pelo período de 10 dias, após o que, em decorrência do adequado desenvolvimento das plantas, foram retiradas as coberturas dos copos, permanecendo no ambiente de sala de cultivo por mais 10 dias, conforme uma adaptação da metodologia elaborada anteriormente por Silva (2016). Em ambos os períodos, em que os copos estavam cobertos e depois, descobertos, as plantas foram avaliadas em relação às variáveis sobrevivência (%), diâmetro (mm) e altura (cm).

2ª etapa: período de aclimatização *ex vitro* (60 dias em sala de cultivo)

Esta etapa foi conduzida em delineamento blocos ao acaso, em arranjo bifatorial 4x2, em que o primeiro fator consistiu das concentrações de AIB (0, 10, 20 ou 40 μM) avaliadas no experimento de aclimatização *in vitro*, anteriormente descrito, e o segundo fator consistiu dos dois subperíodos de aclimatização em casa de vegetação (30 ou 60 dias).

Decorrido o período total de 20 dias de aclimatização *in vitro*, as plantas foram transferidas para vasos, tomando-se cuidado para que não ocorresse nenhum dano ao sistema radicular. Foram, inicialmente, cortadas as laterais dos copos, e imediatamente as plantas foram inseridas nos vasos com capacidade de 1L contendo substrato e, a seguir, foram acondicionados em casa de vegetação com temperatura e irrigação controladas (25°C e quatro vezes ao dia), para manter o turgor hídrico.

Em casa de vegetação, as avaliações foram realizadas aos 30 (mar/2019) e 60 (abril/2019) dias de cultivo *ex vitro*. Aos 30 dias, as variáveis analisadas foram: sobrevivência, diâmetro (mm), altura das plantas (cm), medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar e número de folhas. Aos 60 dias, as variáveis avaliadas foram: sobrevivência, diâmetro (mm), altura das plantas (cm), formação de raiz primária (%), formação de raiz secundária (%), comprimento da raiz primária (cm), número de raízes e formação de calos na base (%).

4.3.2 O efeito do meio de cultivo

Este ensaio foi instalado em sua primeira etapa em 18/03/2019, dando início à aclimatização *in vitro* e, na sequência, à aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas no experimento de rizogênese *in vitro*: “o efeito do meio de cultivo” (item 4.6.1.3). Efetuada a última avaliação do referido experimento, aos 60 dias de cultivo, de cada três plantas de cada repetição apenas uma foi selecionada, utilizando-se como critério o desenvolvimento observado na fase de rizogênese *in vitro*.

1ª etapa: período de aclimatização *in vitro* (30 dias em sala de cultivo)

Esta etapa foi conduzida em delineamento blocos ao acaso, em arranjo bifatorial 3x2, em que o primeiro fator consistiu da combinação de diferentes volumes de meio nutritivo MS (10; 20; ou 30 mL) com 30 cm³ de vermiculita, avaliadas no experimento de rizogênese *in vitro*: “o efeito do meio de cultivo”, anteriormente descrito, e o segundo fator consistiu dos dois subperíodos de aclimatização *in vitro* (15 ou 30 dias).

Os copos permaneceram sob as plantas micropropagadas pelo período de 15 dias, após o que, em decorrência do adequado desenvolvimento das plantas, foram retiradas as coberturas dos copos, permanecendo no ambiente de sala de cultivo por mais 15 dias, conforme uma adaptação da metodologia elaborada anteriormente por Silva (2016). Em ambos os períodos, em que os copos estavam cobertos e depois, descobertos, as plantas foram avaliadas em relação às variáveis diâmetro (mm) e altura (cm).

2ª etapa: período de aclimatização *ex vitro* (60 dias em sala de cultivo)

Decorrido o período total de 30 dias de aclimatização *in vitro*, as plantas foram transferidas para vasos, tomando-se cuidado para que não ocorresse nenhum dano ao sistema radicular. Foram, inicialmente, cortadas as laterais dos copos, e imediatamente as plantas foram inseridas nos vasos com capacidade de 1L contendo substrato e, a seguir, foram acondicionados em casa de vegetação com

temperatura e irrigação controladas (25°C e quatro vezes ao dia), para manter o turgor hídrico.

Em casa de vegetação foram realizadas avaliações aos 30 (abril/2019) e 60 dias (maio/2019). Aos 30 dias, as variáveis analisadas foram: sobrevivência, diâmetro (mm) e altura das plantas (cm) medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar. Aos 60 dias, as variáveis avaliadas foram: sobrevivência, diâmetro (mm), altura das plantas (cm), formação de raiz primária (%), formação de raiz secundária (%), comprimento da raiz primária (cm), número de raízes, formação de calos na base (%) e número de folhas.

4.4 Desempenho inicial a campo de mudas micropropagadas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.)

O desempenho inicial a campo das mudas micropropagadas de açoita-cavalo foi estudado em dois experimentos a seguir descritos, os quais, por sua vez, têm como fontes de variação as concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). (itens 4.2.2 e 4.3.1) e meios de cultivos (itens 4.2.3 e 4.3.2), analisadas nos experimentos de rizogênese e aclimatização. As plantas passaram por uma adaptação ao lado de fora da casa de vegetação, sendo irrigadas com regadores durante toda semana e com adubação uma vez por semana.

O plantio das mudas foi realizado de maneira aleatória, sem espaçamento definido. Os tratamentos originais foram identificados por meio do uso canos de PVC de aproximadamente 15 cm identificados, enterrados próximos à base das mudas. Para o transplante foi realizado o corte lateral nos vasos mantendo o torrão das mudas no plantio.

As mudas foram implantadas em uma área pertencente ao Colégio Politécnico da UFSM (latitude: 29°43'12.28"S; longitude: 53°44'35.69"O), que anteriormente estava sendo utilizada com criação de gado, próxima a um curso d'água, a qual já se encontra isolada e apresenta um breve início de regeneração, com a finalidade de recuperação de Área de Preservação Permanente. Anteriormente ao plantio, foram registradas as variáveis de crescimento altura total e diâmetro do colo. Decorridos 30 dias de plantio, as plantas foram avaliadas em relação à sobrevivência (%), incremento em diâmetro (mm) e em altura (cm),

realizados com base nas diferenças entre os valores finais e iniciais de diâmetro e altura.

Figura 5 – Imagem por satélite da Área de Preservação Permanente (APP) – Área Nova – Colégio Politécnico da UFSM, local de implantação das mudas micropropagadas a partir dos experimentos anteriores. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020). (adaptado de Google Earth)

4.4.1 O efeito do AIB

Para este experimento foram utilizadas as plantas sobreviventes do item 4.3.1 de aclimatização *in vitro* e *ex vitro*, as quais foram micropropagadas no experimento do item 4.2.2 de rizogênese *in vitro* em que se avaliou o efeito do Ácido 3-Indolbutírico (AIB).

4.4.2 O efeito do meio de cultivo

Para este experimento foram utilizadas as plantas sobreviventes do item 4.3.2 de aclimatização *in vitro* e *ex vitro*, as quais foram micropropagadas no experimento do item 4.2.3 de rizogênese *in vitro* em que se avaliou o efeito do meio de cultivo.

4.5 Análises estatísticas

Foram utilizados os testes de Kolmogorov- Smirnov e Bartlett, para verificar respectivamente, a normalidade dos erros e a homogeneidade de variâncias.

Sempre que necessário, as médias foram transformadas, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Em seguida, foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F resultou significativo, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro para a comparação das médias em tratamentos qualitativos e a análise de regressão polinomial para tratamentos quantitativos. Foi estimada Máxima Eficiência Técnica (MET), que é baseada nos estudos do ponto máximo de uma função polinomial de segundo grau, permitindo registrar a concentração máxima para cada variável (STORCK et al., 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) determinado por Pimentel e Gomes (2009). Nas análises foi empregado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® (FERREIRA, 2014).

4.6 Resultados e discussão

4.6.1 Rizogênese *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.)

4.6.1.1 O efeito dos meios nutritivos

Para a sobrevivência, estabelecimento e formação de raízes primárias, avaliadas tanto aos 45 como aos 60 dias, houve efeito significativo dos fatores principais ou de pelo menos um deles e foram observados resultados satisfatórios.

Observou-se efeito significativo na sobrevivência de ambos os fatores principais, meio nutritivo e período de cultivo ($p=0,0239$; $p= 0,0359$, respectivamente, $IV= 2,94$), porém não houve interação significativa entre eles ($p= 0,5421$). Já para o estabelecimento ($p= 0,0146$; $IV= 3,14$) e formação de raízes primárias ($p= 0,0113$; $IV= 4,77$) houve efeito significativo apenas do meio nutritivo.

Foi registrada uma elevada porcentagem de sobrevivência e estabelecimento em todos os tratamentos (Tabela 1) independentemente do período de cultivo. Contudo, o meio nutritivo WPM/2 se destacou pelas menores médias (73,62% e 70,80% respectivamente), o que provavelmente seja decorrente da menor concentração total e também no que diz respeito à concentração dos íons NO_3^- e NH_4^+ nesse meio relativamente menores aos demais. Contrapondo-se a esse desempenho, em outro trabalho realizado com a espécie, o meio WPM/2 foi aquele

em que foram observadas as maiores médias de sobrevivência (100%) e estabelecimento (98%) (SILVA, 2016; SILVA et al., 2019).

TABELA 1 - Valores médios de sobrevivência, estabelecimento, formação de raízes primárias, em brotações de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) independentemente do período de cultivo (45 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Tratamento	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Formação de raízes primárias (%)
MS	93,06 a	93,00a	62,50 a
MS/2	87,51 ab	87,50 ab	47,20 ab
WPM	77,78 ab	77,80 ab	34,70 b
WPM/2	73,62 b	70,80 b	40,30 ab
Média	82,99	82,27	46,17
IV (%)	2,94	3,14	6,12

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora (2020)

Ainda considerando a variável sobrevivência, com 60 dias de cultivo observou-se uma redução nas médias em comparação a 45 dias (88,20% versus 77,77%). Esse resultado de perda de indivíduos ao longo do tempo, que também foi registrado em outros trabalhos com espécies florestais (CURTI, 2011; CURTI; REINIGER, 2014; SILVA, 2016), indica que o cultivo em um mesmo meio nutritivo acarreta em morte dos explantes pela depleção de nutrientes.

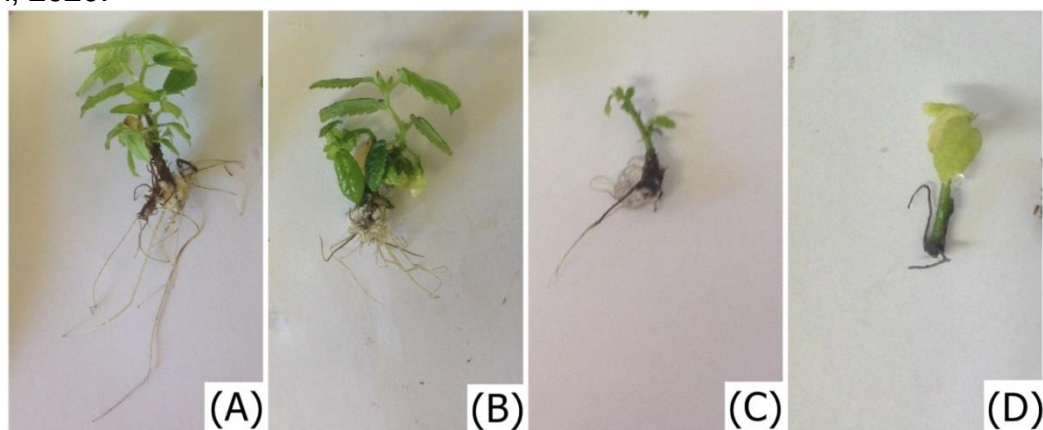
Na formação de raízes primárias, o meio nutritivo MS diferiu estatisticamente apenas de WPM (Tabela 1), o que provavelmente seja decorrente das menores concentrações total e dos íons NO_3^- e NH_4^+ nesse meio relativamente àqueles cujas concentrações foram reduzidas à metade (MS/2 e WPM/2).

Por fim, para a variável formação de raízes secundárias, também avaliada aos 45 e aos 60 dias, não houve efeito significativo dos fatores principais ($p = 0,1346$ para meio nutritivo; $p = 0,9975$ para período de cultivo; $IV = 5,69$) apresentando média geral de 24,99%. Contudo, essa média foi superior àquela registrada (19%) em outro estudo com açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em cultivo de apenas 45 dias sob meio base WPM (SILVA et al., 2019). Além da composição de meio nutritivo, esse resultado pode ser atribuído ao fato de que, no presente trabalho, a etapa de rizogênese foi antecedida pelo estabelecimento dos explantes, por um período de 30 dias, diferentemente do que foi realizado nos experimentos de Silva

(2016), em que a indução e o desenvolvimento radicular foram avaliados em explantes em que esse período de retomada do crescimento não foi observado. Explantes mais desenvolvidos podem acumular mais fotoassimilados e, conseqüentemente, realizar maior biossíntese de hormônios favorecendo a rizogênese.

Para as variáveis avaliadas somente aos 60 dias de cultivo comprimento médio de raízes e altura houve efeito significativo do meio nutritivo ($p= 0,0149$; $IV=9,64$) apenas para a primeira. O resultado do cultivo em meio MS (1,8 cm) (Figura 6A), diferiu estatisticamente apenas do WPM/2 (Figura 6D), no qual foi observada a menor média (0,4 cm). No entanto, o MS não diferiu estatisticamente do MS/2 (Figura 6B) e WPM (Figura 6C), com médias de 1,3 e 0,8 cm respectivamente. Resultado superior foi registrado com açoita-cavalo (1,87 cm) aos 45 dias de cultivo *in vitro* independentemente da concentração de WPM (25, 50, 75 ou 100%), e isso pode ser atribuído ao crescimento da planta em raiz principalmente em busca de nutrientes, o que restringe a formação de raízes secundárias (19%) já discutida anteriormente, que é uma estrutura vital à planta (SILVA et al., 2019). Adicionalmente, estudos realizados com canjerana (*Cabralea canjerana*), observaram resultados semelhantes ao utilizar o meio nutritivo MS/2 como meio base, sendo registrada uma média de 0,76 cm com aos 60 dias de cultivo *in vitro* (ROCHA et al., 2007).

Figura 6 - Representação ilustrativa das brotações de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro*, em função de diferentes meios nutritivos (A – MS; B – MS/2; C – WPM; D – WPM/2) avaliados aos 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020).

Por fim, para a variável altura foi registrada uma média geral de 1,35 cm, devido ao gasto energético voltado para a formação de raízes secundárias sendo inferior ao observado em trabalhos anteriores com açoita-cavalo (SILVA et al., 2019) com o emprego do meio WPM/2 (2,31cm) aos 45 dias de cultivo *in vitro*, que pode ser atribuída ao investimento na proporção raiz-parte aérea da mesma forma que cresceu em comprimento anteriormente já mencionado. Outro estudo em brotações de macieira (*Malus domestica* 'seleção 69') com o emprego do meio nutritivo MS suplementado com 2,2 μ M (BAP 6-Benzilaminopurina) foi registrada uma média geral de 1,3 cm (SANTA-CATARINA et al., 2001), semelhante ao observado no presente trabalho.

4.6.1.2 O efeito do AIB

Não houve efeito significativo das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) para as variáveis sobrevivência, contaminação por micro-organismos, formação de raízes primárias e comprimento médio de raízes. Entretanto, foi observado efeito significativo da auxina para formação de raízes secundárias, número de raízes e altura de plantas.

A média geral de sobrevivência foi de 99% ($p=0,4040$; $IV= 0,59$), a qual foi superior àquela registrada em outro trabalho com açoita-cavalo sob o efeito de tratamento "pulse" com AIB, com média de 52,32% também aos 30 dias de cultivo *in vitro* (SILVA, 2016). A alta taxa de sobrevivência observada no presente trabalho pode estar relacionada ao emprego do meio nutritivo MS ao invés do WPM/2. Respostas semelhantes ao presente estudo foram observadas com canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) na fase de rizogênese *in vitro* sob a influência do meio de nutritivo com adição de AIB, sendo registrada uma média geral de sobrevivência de 98,58% (CURTI, 2011).

Houve 17,5% de contaminação microbiana ($p=0,6192$; $IV= 8,02$) indicando uma moderada associação com micro-organismos, a qual ocorreu num período de apenas 30 dias, que pode ser decorrente de fatores intrínsecos às brotações. Em outro estudo com açoita-cavalo sob o efeito de tratamento "pulse" com AIB, foi observada uma média geral ainda maior (24,84%) ao encontrado no presente trabalho também aos 30 dias de cultivo *in vitro* (SILVA, 2016).

Em relação à formação de raízes primárias, foi registrada uma média geral de 89% ($p=0,0728$; $IV= 1,97$), independentemente da concentração da auxina a qual pode ser atribuída aos genes favoráveis à rizogênese presentes no material vegetal e também ao meio nutritivo empregado. Resultado muito inferior (25,18% de raízes primárias formadas também em 30 dias de cultivo *in vitro*) ao observado no presente trabalho foi registrado em outro estudo com açoita-cavalo (SILVA, 2016). A alta taxa de rizogênese observada no presente trabalho pode estar relacionada aos seguintes fatores: emprego do meio nutritivo MS ao invés do WPM/2, à inclusão da fase de estabelecimento (30 dias) antes da rizogênese *in vitro*, e o uso da auxina adicionada ao meio nutritivo durante todo o cultivo ao invés de tratamento “pulse” (15 dias).

A média de 2,44 cm foi observada para o comprimento de raízes ($p=0,5107$; $IV= 5,25$). Os mesmos fatores anteriormente mencionados para a formação de raízes primárias podem ter contribuído para o resultado observado em relação ao comprimento de raízes. Contrariamente ao registrado no presente trabalho, foram obtidos apenas 1,62 cm de comprimento de raízes em outro estudo com a espécie, e ainda assim com o cultivo estendido aos 45 dias (SILVA, 2016).

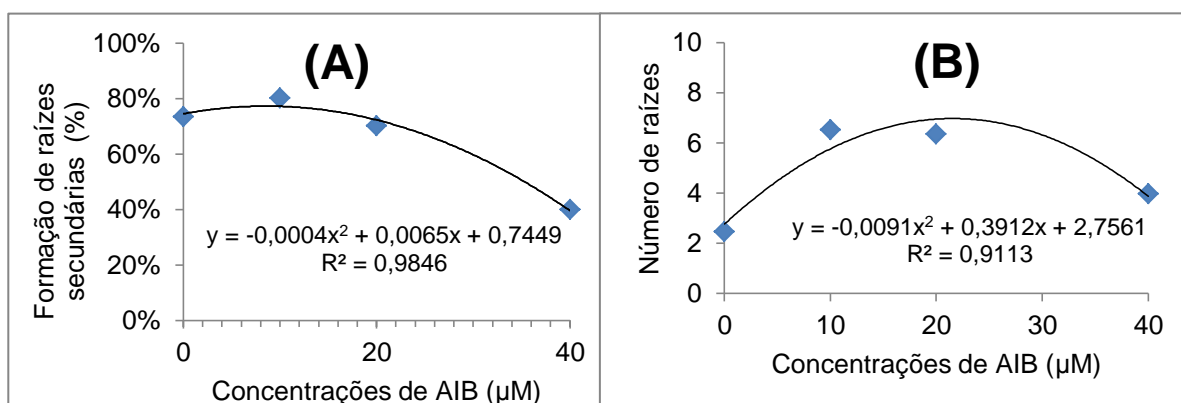
Para as variáveis formação de raízes secundárias (%) ($p= 0,0232$; $IV= 4,36$), número de raízes ($p= 0,0024$; $IV= 7,21$) e altura de plantas (cm) ($p= 0,0094$; $IV= 4,16$) em função das concentrações de AIB foram ajustadas equações de segundo grau.

Para a formação de raízes secundárias, os resultados mais satisfatórios foram observados nas menores concentrações de AIB, atingindo 80% a 10 μM de AIB, e reduziu para 40% na maior concentração testada (40 μM) (Figura 7A). A máxima eficiência técnica (MET) foi estimada ocorrer a 8,12 μM . Esse desempenho corrobora com Grattapaglia e Machado (1998), que afirmaram que a adição de altas concentrações de AIB ao meio nutritivo pode ser excessiva e comprometer a rizogênese *in vitro*. Fermino Junior (2012), em estudos com cerejeira (*Amburana acreana*) observou resultados similares, em que indicou o uso de AIB em baixas concentrações ou até mesmo dispensar a adição de auxinas, pois não houve influência sobre a rizogênese *in vitro*.

Quanto ao número de raízes, foram observadas 7 raízes a 10 μM de AIB e apenas 4 na concentração máxima testada (40 μM) (Figuras 7B e 8), sendo a MET estimada a 21,6 μM . Os resultados sugerem que a presença de AIB estimularam o aumento do número de raízes e em altas concentrações reduzem, de acordo com o

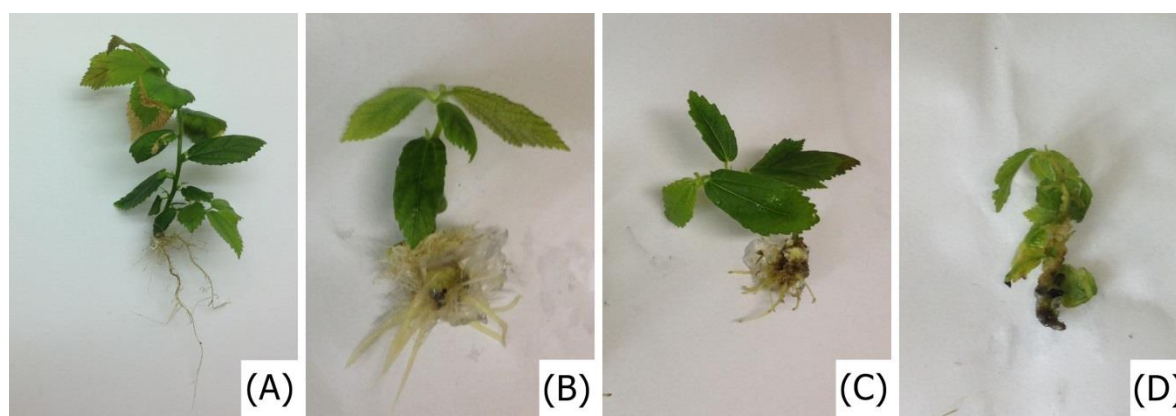
que afirmaram Fachinello et al. (1994) e que pode ser considerado como hormese, ou seja, que baixas concentrações estimulam o crescimento e tornam-se benéficas enquanto altas concentrações apresentam efeito inibitório ou tóxico. Também foi verificado em outras espécies florestais, por exemplo com canafistula (CURTI, 2014) que na ausência de AIB praticamente não formou raiz e passou a formar-las (1,04) na concentração de 10 μM . Outro estudo com jenipapeiro (*Genipa americana* L.) registrou uma redução no número de raízes em concentrações acima de 9,8 μM de AIB (ROCHA et al., 2008).

Figura 7 – Médias de formação de raízes secundárias (%) – (A) e número de raízes – (B) em brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

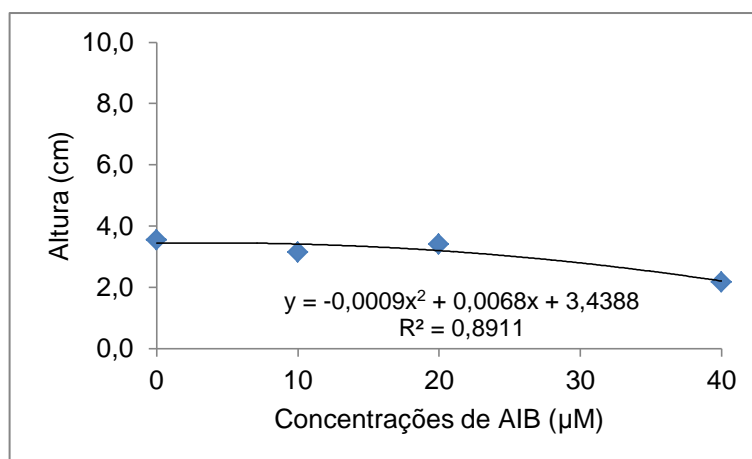
Figura 8 – Representação ilustrativa das brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) (A – 0 μM ; B – 10 μM ; C – 20 μM ; D – 40 μM) avaliados. Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020).

Os resultados mais satisfatórios para a variável altura (cm) foram registradas na ausência de AIB (0 μ M) 3,5 cm, a qual reduziu-se para 2,2 cm na maior concentração testada (40 μ M) (Figura 9). A MET foi estimada ocorrer a 3,77 μ M. Assim, a presença de AIB a baixas concentrações, induzem o crescimento em altura das plantas ao passo que em altas concentrações tendem restringir seu tamanho, conforme já discutido anteriormente em relação comprimento e ao número de raízes. Contrariamente, em outro ensaio com açoitaca-cavalo, porém, com AIB em tratamento “pulse”, foi observada uma média geral de altura inferior (0,96 cm), em cultivo estendido por 45 dias de cultivo *in vitro* (SILVA et al., 2019).

Figura 9 – Altura média (cm) em brotações de açoitaca-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

4.6.1.3 O efeito do meio de cultivo

Para a sobrevivência e contaminação por micro-organismos, avaliadas aos 45 e 60 dias, não foram observados efeitos significativos das fontes de variação.

Para a sobrevivência, especificamente, não houve efeito do meio de cultivo nem do período de cultivo *in vitro* ($p= 0,2559$; $p= 0,7895$, respectivamente, $IV= 1,90$), tampouco da interação entre eles ($p= 0,9307$), sendo observada uma média de 93,9% de plantas sobreviventes, a qual é considerada elevada e próxima ao observado para outra espécie florestal, canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), em que foi obtida uma média de 92,3% de sobrevivência das brotações aos 30 dias de cultivo *in vitro* (CURTI; REINIGER; 2014).

Para a contaminação por micro-organismos, não houve efeito do meio de cultivo nem do período de cultivo *in vitro* ($p= 0,0887$; $p= 0,1238$, $IV= 7,43$), tampouco da interação entre eles ($p= 0,9036$), foi observada uma média de 16,1%. A contaminação registrada foi menor que àquela observada no experimento anterior (17,5%), haja vista que o cultivo *in vitro*, neste caso, se estendeu pelo dobro do período (60 dias), e inferior ao obtido em outro estudo com a espécie em que foi registrada uma média elevada de contaminação por micro-organismos (66,67%) aos 30 dias de cultivo *in vitro* para o meio de cultivo contendo 30mL de meio nutritivo WPM/2 associado a 15cm³ de vermiculita (SILVA, 2016).

A formação de raízes primárias, de raízes secundárias, de calos, número de raízes, comprimento médio de raízes e altura de plantas foram variáveis avaliadas apenas aos 60 dias de cultivo e podem-se observar médias elevadas.

Para a formação de raízes primárias não foi observado efeito significativo do meio de cultivo ($p= 0,7020$; $IV= 4,21$) sendo registrada uma média elevada (80,1%). Esse resultado favorável pode ser atribuído à presença de vermiculita em todas as composições de meio de cultivo testadas, substrato inerte que, de acordo com Caldas (1990), aumenta a aeração e eleva a troca catiônica, proporcionando maior retenção de água e melhor desenvolvimento do sistema radicular nas plantas micropropagadas. Da mesma maneira, em estudos com porta-enxerto de *Prunus cv. Mr. S. 1/8* foi possível obter uma elevada taxa de rizogênese *in vitro* com o emprego da combinação de meio nutritivo MS com vermiculita, a qual substituiu o ágar (VIAGANÓ et al., 2007). Porém, em canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) foi observada uma rizogênese bem inferior (36,78%) com o uso da combinação meio nutritivo MS, vermiculita e ágar no cultivo *in vitro* pelo período de 60 dias (CURTI; REINIGER, 2014).

Para a formação de calos também não foi observado efeito significativo do meio de cultivo ($p= 0,2536$; $IV= 4,29$), sendo registrada uma média de 9,9%, a qual pode ser considerada baixa. Essa resposta pode ter sido decorrência do balanço hormonal endógeno (auxina/citocinina) que se estabeleceu nas brotações e não favoreceu a indução de calos. No entanto, em outros estudos realizados com canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) foram observadas médias elevadas de calos em igual período de cultivo *in vitro* (60 dias) na presença de vermiculita: 96,22% quando combinada ao meio nutritivo MS (CURTI; REINIGER, 2014) e 49,49% quando adicionada a WPM/2 (ANDREOLLA, 2019).

Também para número de raízes não houve efeito significativo do meio de cultivo ($p= 0,1880$; $IV= 7,81$), sendo registrada uma média de aproximadamente 3 raízes. Essa média reduzida, comparada ao experimento anterior (7 raízes com 10 μM de AIB - 4.6.1.2 pág. 44) pode ser atribuída à ausência de suplementação da auxina no presente caso. Resultado superior também foi observado com amoreira-preta (*Rubus sp. cv. Xavante*) com meio de cultivo contendo meio nutritivo MS e vermiculita - 6,88 raízes (TOLEDO; BIASI; 2018). Já em outro trabalho na fase de rizogênese *in vitro* com porta-enxerto de pessegueiro (*Prunus spp. cv. Mr. S. 2/5*), foi observada uma média inferior ao presente trabalho (1,5 raízes por brotação) na combinação de vermiculita (200 g L^{-1}) com meio nutritivo MS suplementado de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (ROCHA, 2006).

Já para as variáveis formação de raízes secundárias ($p= 0,0450$; $IV= 5,11$), comprimento médio de raízes ($p= 0,0013$; $IV= 6,06$) e altura de brotações ($p= 0,0484$; $IV= 4,79$) houve efeito significativo do meio de cultivo (Tabela 2).

Para a formação de raízes secundárias as melhores respostas *in vitro* foram observadas com o emprego de 20mL haja vista que o uso de apenas 10mL proporcionou sustentação insatisfatória impedindo que os explantes se mantivessem eretos. Em trabalho anterior realizado com açoita-cavalo (SILVA, 2016), as médias foram em geral inferiores, o que pode ser atribuído aos seguintes fatores: ausência da fase de estabelecimento antecedendo à rizogênese, cultivo por apenas 45 dias e emprego do meio WPM/2 ao invés de MS. Já o pior resultado foi obtido com o emprego do maior volume de meio nutritivo (36,70%), provavelmente pela maior consistência do meio de cultivo formado que dificultou a formação dessas raízes.

Mesmo assim, os resultados de ambos os estudos (o presente e aquele de Silva, 2016) foram superiores aos observados em um trabalho realizado em 2016 com canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), em que ocorreu a formação de 27,40 % de raízes secundárias no meio de cultivo contendo igual volume de vermiculita e concentração de ágar, porém, 30 mL de meio WPM/2, decorrido o mesmo período de cultivo *in vitro* - 60 dias (REINIGER et al., 2016). Contudo, a média observada no presente trabalho foi inferior àquela verificada (83% de raízes secundárias) em estudo mais recente realizado com canafístula, no qual foi utilizado meio de cultivo composto por igual volume de vermiculita e 30 mL de meio nutritivo WPM/2 (ANDREOLLA, 2019).

TABELA 2 - Valores médios de formação de raízes secundárias (%), comprimento médio de raízes (cm) e altura (cm) de brotações de açoitaca (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função do meio de cultivo após 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020

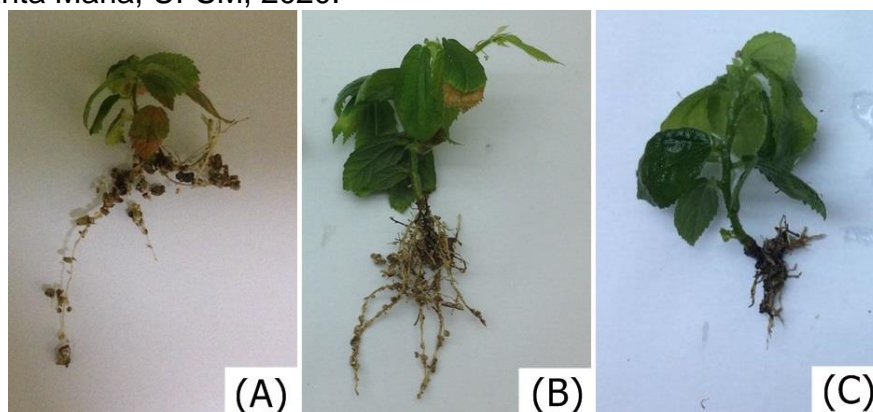
Tratamento Volume de meio nutritivo MS + volume de vermiculita	Formação de raízes secundárias (%)	Comprimento médio de raízes (cm)	Altura (cm)
10mL + 30cm ³	66,70 ab	2,70 a	1,57 b
20mL + 30cm ³	73,40 a	2,10 a	2,47 a
30mL + 30cm ³	36,70 b	1,08 b	2,00 ab
Média	58,93	1,96	2,01
IV (%)	5,11	6,06	4,79

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora (2020)

Da mesma forma, para o comprimento médio de raízes, o pior resultado (1,08 cm) foi obtido com o emprego do maior volume de meio nutritivo (30 mL) (Tabela 2 - Figura10C). Isso indica que esse volume de meio combinado a 30 cm³ do substrato pode afetar o crescimento das raízes, formando um meio de cultivo de consistência desfavorável. Conforme mencionado anteriormente, as melhores respostas *in vitro* foram observadas com o emprego de 20 mL, haja vista que o uso de apenas 10mL proporcionou sustentação insatisfatória impedindo que os explantes se mantivessem eretos. Esses resultados são discordantes daqueles obtidos com ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) (RABAIOLLI, 2014; RABAIOLLI et al., 2017) e canafístula (ANDREOLLA, 2019; REINIGER et al., 2016), em que médias superiores (2,13 cm; 3,78 cm e 3,09 cm de comprimento de raízes respectivamente) foram verificadas em meio de cultivo que utilizou igual volume de meio nutritivo e também de vermiculita (30 cm³), porém em que o meio em questão foi WPM/2.

Figura 10 – Representação ilustrativa das brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas *in vitro*, em função dos meios de cultivo (A – 10 mL de meio nutritivo MS + 30cm³ de vermiculita ; B – 20 mL de meio nutritivo MS + 30cm³ de vermiculita ; C – 30 mL de meio nutritivo MS + 30cm³ de vermiculita) aos 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

Já para a variável altura, o pior resultado (1,57 cm – Tabela 2) foi observado com 10mL de meio nutritivo, em que a planta investiu no desenvolvimento das raízes como uma estratégia de ancoragem e não em parte aérea. O emprego de 20mL proporcionou maior estabilidade para os explantes. Resultado superior (3,1 cm) foi observado com amoreira-preta (*Rubus sp. cv. Xavante*) em meio de cultivo contendo 30mL de meio nutritivo MS com adição de 25% do volume do frasco com vermiculita média (TOLEDO; BIASI; 2018).

4.6.2 Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.)

4.6.2.1 O efeito do AIB

1ª etapa: período de aclimatização *in vitro* (20 dias em sala de cultivo)

No período de aclimatização *in vitro*, foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência, diâmetro e altura de plantas durante dois subperíodos (10 dias em que os copos foram cobertos por outros copos plásticos seguidos por 10 dias sem essa cobertura) e foram obtidas excelentes médias.

Para a variável sobrevivência, não houve efeito significativo do Ácido 3-Indolbutírico (AIB) e do período de aclimatização *in vitro* ($p= 0,000$; $IV= 0,00$), e foi registrada uma média de 100%. Isso indica que o método de aclimatização com exposição gradativa das plantas ao ambiente, inicialmente com os copos cobertos e

posteriormente sem utilizado, é eficiente. Já com canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) houve efeito significativo do AIB e foi observado um acréscimo em sobrevivência conforme aumentou as concentrações de AIB, atingindo em torno de 60% para a 20 μM de AIB aos 21 dias de aclimatização *in vitro* (CURTI, 2014).

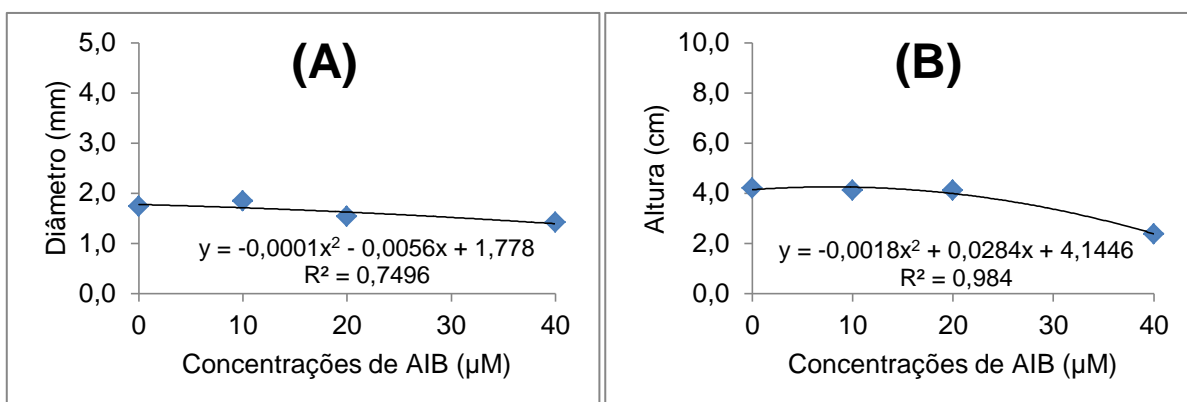
Já para a variável diâmetro observou-se efeito significativo do AIB e do período de aclimatização *in vitro* ($p= 0,0082$; $p= 0,006$; $IV= 3,08$), mas não da interação entre eles ($p= 0,5848$). As médias foram ajustadas a uma equação de segundo grau em função das concentrações de AIB (Figura 11A), sendo que os resultados mais satisfatórios foram observados nas concentrações mais baixas de AIB, atingindo 1,84 mm a 10 μM e reduzindo-se para 1,41 mm na concentração máxima testada (40 μM), sendo a máxima eficiência técnica (MET) estimada ocorrer a 28 μM . Em relação ao período, a maior média de diâmetro foi registrada após a retirada dos copos plásticos (1,76 mm), a qual diferiu estatisticamente daquela observada aos 10 dias (1,49 mm).

Este resultado indica o acréscimo em diâmetro ao longo dos subperíodos de aclimatização em sala de cultivo, os quais se fazem necessários para promover um microclima adequado e adaptar as plantas gradativamente para a próxima etapa, de aclimatização *ex vitro*. Com o uso de 2,5 mg L^{-1} (equivalente a 12,3 μM) de AIB foi observada uma média superior (8,16 mm) a obtida em dose semelhante no presente estudo, em que na etapa de aclimatização *in vitro* com microestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 (*Carica papaya* L.), que pode ser atribuída ao enraizamento em sistema semi-hidropônico. Neste mesmo trabalho, a cobertura dos copos foi removida parcialmente por algumas horas ao dia e por completa após 15 dias de aclimatização *in vitro* que também pode ter influenciado no aumento em diâmetro (OLIVEIRA, 2014).

Por sua vez, para a altura de plantas houve efeito significativo somente do AIB ($p= 0,0001$; $IV= 5,06$), não sendo observado efeito significativo do período de aclimatização em sala de cultivo ($p= 0,1071$) nem da interação entre eles ($p= 0,9552$). Para essa variável, foi ajustada uma equação de segundo grau (Figura 11B), sendo que as melhores respostas foram observadas na ausência de AIB (4,20 cm), reduzindo-se para 2,37 cm na maior concentração testada (40 μM), sendo a MET estimada ocorrer a 7,88 μM . Assim como já referido no experimento anterior do efeito de AIB sobre a rizogênese, as baixas concentrações da auxina influenciaram positivamente no crescimento da planta, enquanto, as mais altas

mostraram-se tóxicas, confirmando o fenômeno denominado hormese. O mesmo fenômeno foi registrado com outra espécie, sendo observada uma redução em altura na etapa de aclimatização *in vitro* com microestacas com mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 (*Carica papaya* L.), com média de 15,98 cm na adição de 2,5 mg L⁻¹ (equivalente a 12,3 μM), 12,93 cm com a adição de 5,0 mg L⁻¹ (equivalente a 24,6 μM) e 11,75 cm com a adição de 7,5 mg L⁻¹ (equivalente a 36,9 μM) de AIB a solução nutritiva, embora tenha ocorrido uma redução em altura, estes resultados são superiores ao obtido em doses semelhantes no presente estudo com açoitacavallo (OLIVEIRA, 2014).

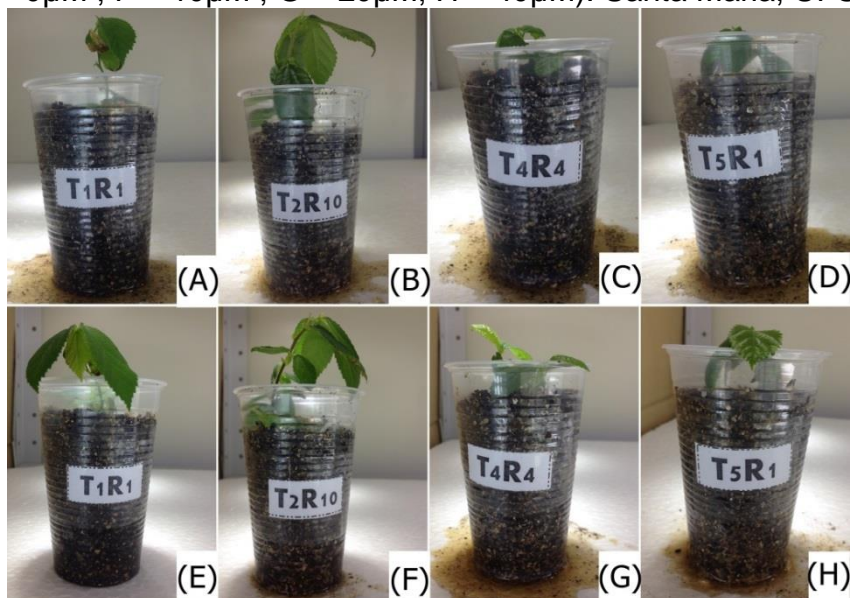
Figura 11 – Médias de diâmetro (mm) – (A) e altura (cm) – (B) em plantas aclimatizadas *in vitro* de açoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

A Figura 12, a seguir, representa o desenvolvimento das plantas micropropagadas na etapa de aclimatização *in vitro*, a qual é essencial para o processo adaptativo gradativo que se desencadeia após a transferência das plantas para os copos plásticos.

Figura 12 – Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na etapa de aclimatização *in vitro*, no primeiro subperíodo de 10 dias com a cobertura de copos plásticos (A – 0 μ M ; B – 10 μ M ; C – 20 μ M; D – 40 μ M) seguido do segundo subperíodo de 10 dias adicionais sem a cobertura de copos plásticos (E – 0 μ M ; F – 10 μ M ; G – 20 μ M; H – 40 μ M). Santa Maria, UFSM, 2020.



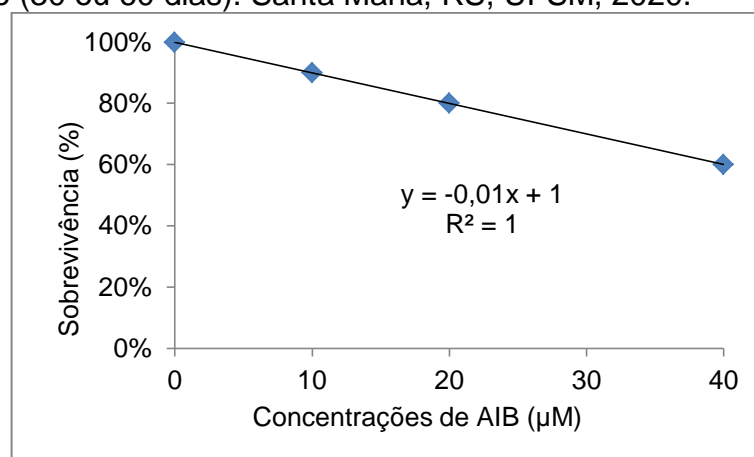
Fonte: Autora (2020).

2ª etapa: período de aclimatização *ex vitro* (60 dias em casa de vegetação)

As plantas foram avaliadas nos dois subperíodos de aclimatização *ex vitro* (30 e 60 dias em casa vegetação) quanto às variáveis sobrevivência, diâmetro, altura e número de folhas e novamente foram observadas médias elevadas.

Para a variável sobrevivência observou-se efeito significativo somente do AIB ($p= 0,0077$; $IV= 3,08$), não havendo efeito significativo do período de cultivo *ex vitro* ($p= 0,9975$) nem tampouco da interação entre eles ($p= 1,000$). Foi ajustada uma equação de primeiro grau, em que todas as plantas (100%) sobreviveram na ausência de AIB (0 μ M), diminuindo a 60% na concentração máxima testada (40 μ M) (Figura 13). Esse resultado, novamente, pode ser decorrência da toxicidade causada pela auxina.

Figura 13 - Média de sobrevivência (%) em plantas aclimatizadas *ex vitro* de acoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), independentemente do período de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020).

Já para a variável diâmetro observou-se efeito significativo do AIB e do período de aclimatização *ex vitro* ($p= 0,0422$; $p= 0,000$; $IV= 5,27$), mas não da interação entre eles ($p= 0,5451$). Na ausência de AIB foi observada uma média em diâmetro de 4,98 mm (Figura 14A) reduzindo para 3,70 mm na maior concentração testada (40 μM), sendo MET estimada a ocorrer a 10,26 μM. Essa resposta pode ser decorrente da toxicidade causada pela auxina em concentrações elevadas. Quanto ao período de cultivo de aclimatização *ex vitro* (Tabela 3) ao estender-se aos 60 dias, é registrado uma média maior (5,8 mm) que difere estatisticamente da aclimatização aos 30 dias (3,5 mm). Outro estudo em função do efeito da adição de auxina em microestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 (*Carica papaya* L.) na etapa de aclimatização *ex vitro* anteriormente enraizadas em sistema semi-hidropônico, registrou uma média superior àquela obtida na ausência de AIB no presente estudo, 6,28 mm na adição 5,0 mg L⁻¹ (equivalente a 24,6 μM) aos 45 dias (OLIVEIRA, 2014).

TABELA 3 - Valores médios de diâmetro (mm), altura (cm) e número de folhas em plantas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), aos 30 ou 60 dias de aclimatização. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Período de cultivo	Diâmetro (mm)	Altura (cm)	Número de folhas
30	3,5 b	14,9 b	12 b
60	5,8 a	23,2 a	16 a
Média	4,6	19,0	14
IV(%)	5,33	5,27	9,11

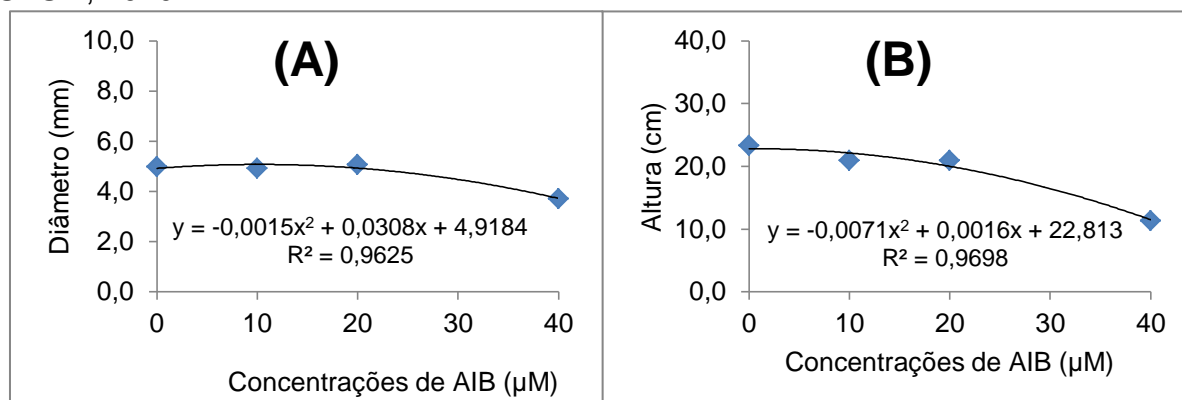
*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora (2020)

Da mesma forma para altura ($p= 0,0422$; $p= 0,000$; $IV= 5,27$) e número de folhas ($p= 0,0011$; $p= 0,0003$; $IV= 9,11$), houve efeito significativo para as concentrações de AIB e para período de cultivo *ex vitro* e não houve interação entre o período de cultivo *ex vitro* com as concentrações de AIB ($p= 0,5451$; $p= 0,7240$).

Quanto ao crescimento em altura das plantas micropropagadas (Figura 14B), durante a aclimatização *ex vitro*, foram observadas na ausência de AIB ($0\mu\text{M}$) uma média de 23,20 cm, de 20,90 cm na concentração de $20\mu\text{M}$ de AIB reduzindo para 11,33 cm na maior concentração de AIB ($40\mu\text{M}$), com MET estimada a $0,1\mu\text{M}$. A partir do teste de médias, pode-se inferir que aos 60 dias de aclimatização *ex vitro* a planta é capaz de atingir uma média de 23,2 cm, enquanto aos 30 dias uma média inferior de 14,9 cm (Tabela 3). Os resultados sugerem que na ausência de AIB, as plantas crescem mais em altura e que é necessário estender o período de cultivo em casa de vegetação para os 60 dias.

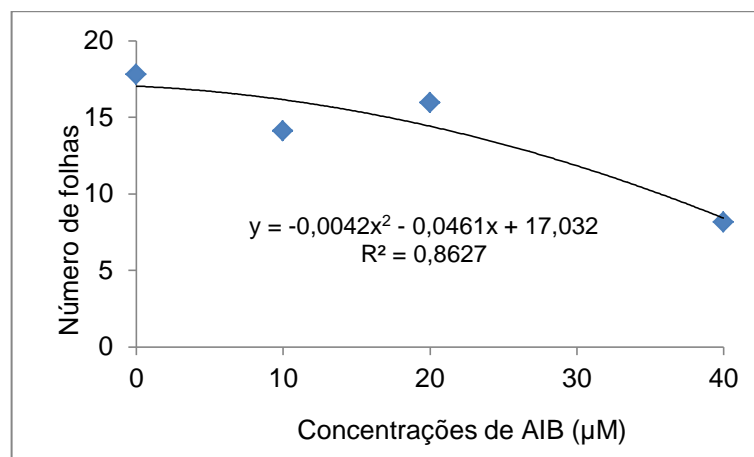
Figura 14 - Médias de diâmetro (mm) – (A) e altura (cm) – (B) em plantas aclimatizadas *ex vitro* de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), independente do período de cultivo de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

Para o número de folhas (Figura 15), o melhor resultado foi obtido na ausência de AIB ($0\mu\text{M}$) formando aproximadamente 18 folhas, seguido de 14 folhas na concentração de $10\mu\text{M}$ de AIB e diminuindo para 8 de folhas formadas na concentração de $40\mu\text{M}$ de AIB, sendo a máxima eficiência técnica (MET) estimada a $5,48\mu\text{M}$. Foi observado também a maior média (16 folhas) aos 60 dias de cultivo *ex vitro* e a menor aos 30 dias (12 folhas). Conforme aumenta as concentrações de auxina, menor é a área fotossintética, logo ocorrem menos trocas gasosas e produção de carboidratos e, conseqüentemente menor o desenvolvimento da planta micropropagada. Respostas inferiores ao presente estudo foram observadas com canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) na etapa de aclimatização *in vitro* sob a influência do meio de nutritivo com adição de AIB, sendo registrada uma média geral de aproximadamente 4 folhas na ausência de AIB e com $10\mu\text{M}$ uma média de aproximadamente 3 folhas por planta, o que pode ser atribuído a senescência que ocorre na espécie (CURTI, 2011).

Figura 15 - Média de número de folhas em plantas aclimatizadas *ex vitro* de acoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), independente do período de cultivo de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

Por fim, para algumas das variáveis que foram avaliadas somente aos 60 dias como formação de raízes primárias, de raízes secundárias e de calos não houve efeito significativo da auxina, ao passo que para comprimento médio de raízes e número de raízes foram ajustadas equações de segundo grau em função do AIB.

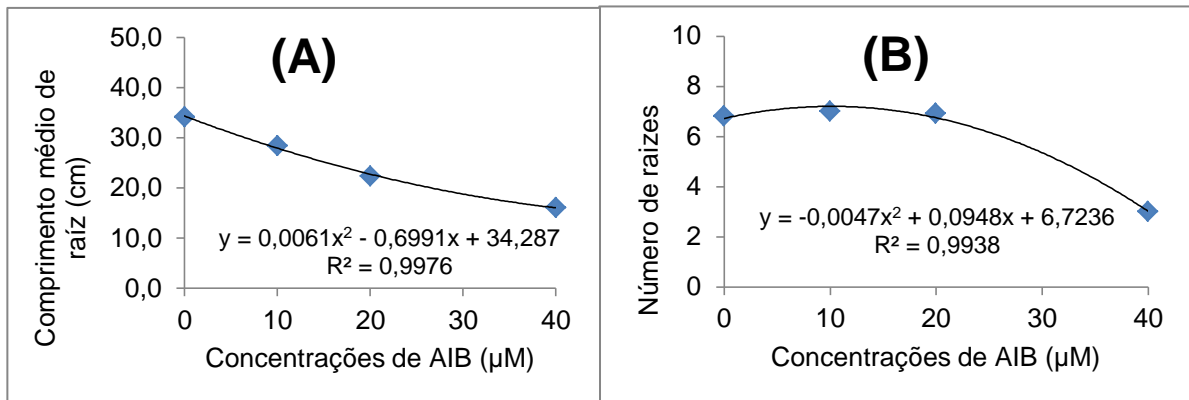
Para a formação de raízes primárias ($p=0,000$; $IV= 0,00$) foi observada uma média de 100%, o que o método de aclimatização em sala de cultivo e posteriormente em casa de vegetação, é eficiente contribuindo, simultaneamente, para o desenvolvimento e ancoragem das plantas micropropagadas de acoitacavallo. E para a formação de raízes secundárias ($p= 0,0693$; $IV= 4,87$) foi observada uma média de 85%, a qual pode ser considerada elevada e extremamente benéfica para o subsequente desenvolvimento das plantas uma vez que são responsáveis pela absorção de água e nutrientes, mantendo-as vivas. Em geral os trabalhos de aclimatização não incluem as variáveis relacionadas ao sistema radicular, ou seja, são submetidas a esta fase somente as plantas que já enraizaram na fase de rizogênese *in vitro*, como por exemplo, em trabalhos com amoreira-preta (*Rubus sp.*) 'Xavante' (PELIZZA, 2013) e jenipapeiro (*Genipa americana* L.) (ROCHA, 2008) com o uso de diferentes concentrações de AIB. Contudo os resultados do presente estudo relacionados a formação de raízes (primárias e secundárias) são satisfatórios, haja vista que as plantas foram submetidas as subseqüentes fases da micropropagação até esta etapa.

Para a variável formação de calos não houve efeito significativo ($p= 0,578$; $IV= 4,99$) apresentando uma média geral de 5%. A baixa formação de calos após a micropropagação sugere que as raízes se desenvolvem e os tecidos, através da divisão celular, se desdiferenciam e formam raízes a partir dos calos. Em estudo com microestacas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MC, aos 35 dias em função do tipo e da concentração de auxina, foram atribuídas notas de intensidade de calos formados (0 a 3), cuja nota média registrada foi de 1,04 com AIB equivalentes a 34,66% calos formados (ERIG; SCHUCH, 2004), sendo considerada uma média elevada quando comparada ao observado no presente estudo com açoita-cavalo.

Quanto ao comprimento de raízes (Figura 16A e 17) foram observadas médias de 34,10 cm na ausência de AIB ($0\mu\text{M}$), a qual diminuiu para 16,10 cm na maior concentração testada ($40\mu\text{M}$), sendo que a MET é estimada ocorrer a $5,73\mu\text{M}$. Novamente, foi observado uma redução, desta vez no crescimento de raízes, isto indica que conforme aumentam os níveis de AIB menor são as raízes, podendo ser atribuído ao efeito tóxico do AIB em maiores concentrações, como pode ser observado na Figura 17, a seguir. Este efeito não é observado em microestacas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MC, aos 35 dias em função do tipo e da concentração de auxina, que conforme aumentam as concentrações de AIB maior é o comprimento de raiz, podendo atingir 2,57 cm com a máxima concentração testada ($20\mu\text{M}$) (ERIG; SCHUCH, 2004).

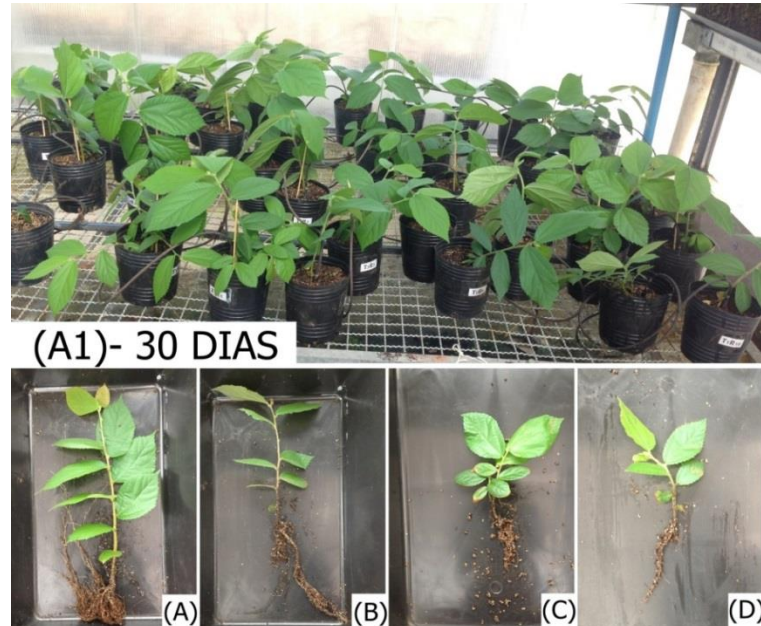
Quanto ao número de raízes (Figura 16B), os resultados mantiveram-se constantes nas concentrações moderadas de AIB, sendo formadas 7 raízes da ausência de AIB ($0\mu\text{M}$) até $20\mu\text{M}$ e a partir daí reduzindo-se para 3 na concentração máxima testada ($40\mu\text{M}$); a MET ocorre a $10,08\mu\text{M}$. Esses resultados sugerem que nas concentrações mais altas de AIB há uma redução no número de raízes formadas. Em outro trabalho com plantas micropropagadas de amoreira-preta (*Rubus sp.*) 'Xavante, em que suas brotações foram imersas em auxina por 5 min. na fase de rizogênese *in vitro*, registrou uma resposta quadrática na sua fase subsequente (etapa de aclimatização *ex vitro*) em que foi observada uma média de aproximadamente 6 raízes por planta no ponto de máxima eficiência técnica (320 mg L^{-1}), próximo ao obtido no presente estudo com açoita-cavalo na ausência de auxina (PELIZZA, 2013).

Figura 16 - Médias de comprimento de raízes (cm) – (A) e número de raízes – (B) em plantas aclimatizadas *ex vitro* de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) aos 60 dias de aclimatização em casa vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020).

Figura 17 - Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na etapa de aclimatização *ex vitro*, (A1 – 30 dias de cultivo em casa de vegetação) e aos 60 dias (A – 0µM; B – 10µM; C – 20µM; D – 40µM). Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

4.6.2.2 O efeito do meio de cultivo

1ª etapa: período de aclimatização *in vitro* (30 dias em sala de cultivo)

No período de aclimatização *in vitro*, foram avaliadas as seguintes variáveis sobrevivência, diâmetro e altura de plantas durante dois subperíodos (15 dias em que os copos foram cobertos por outros copos plásticos seguidos por 15 dias sem essa cobertura) e foram observadas médias elevadas.

Em relação à sobrevivência, não houve efeito significativo do meio de cultivo em nenhum dos dois subperíodos de aclimatização *in vitro* ($p= 0,1152$; $p= 0,1394$; $IV= 2,33$) e tampouco das interações entre esses fatores principais ($p= 0,1152$), sendo registrada uma média elevada de 96,6%. Esse resultado indica que o método utilizado de aclimatização, com exposição gradativa das plantas ao ambiente, inicialmente com os copos cobertos e após sem cobertura, é eficiente. Resultado superior ao obtido foi registrado com canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) na etapa de aclimatização *in vitro* sob o efeito do meio de cultivo (WPM/2 + vermiculita) sendo registrada uma média geral de 100% de sobrevivência (ANDREOLLA, 2019). Outro estudo com ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) observou-se uma resposta inferior (72%) ao obtido no presente trabalho com açoita-cavalo, sendo utilizado como meio base WPM/2 combinado com 30 cm³ de vermiculita (RABAIOLLI et al., 2017).

Para a variável diâmetro observou-se efeito significativo somente do meio de cultivo, não havendo efeito dos subperíodos de aclimatização *in vitro* ($p= 0,0284$; $p= 0,0594$; $IV= 3,02$) e nem da interação entre esses fatores principais ($p= 0,8271$). O pior resultado (1,43 mm) foi obtido com o emprego do maior volume de meio nutritivo (30 mL), o que pode ser atribuído à limitação que a planta apresenta em se desenvolver na fase anterior, de rizogênese *in vitro*, e que se reflete na subsequente aclimatização. Em estudo anterior com açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), foi observada uma altura inferior ao obtido no presente estudo (0,50 cm) na etapa de aclimatização *in vitro* (30 dias em sala de cultivo) em meio nutritivo WPM/2 em função da adição de sacarose (30 g L⁻¹) e 30 cm³ de vermiculita (SILVA, 2016).

Já para a altura de plantas, houve efeito significativo do meio de cultivo e do subperíodo de aclimatização *in vitro* ($p= 0,0000$; $p= 0,0001$; $IV= 5,12$), mas não houve da interação entre os fatores principais ($p= 0,4947$). O melhor resultado (4,05 cm de altura, Tabela 4) foi observado com o emprego de 20mL de meio nutritivo MS

(Figura 18 B e E). Esse resultado corrobora, simultaneamente, a falta de instabilidade que o menor volume (10 mL) e a alta consistência que o maior volume (30 mL) proporcionam às culturas durante a rizogênese, as quais podem ter influenciado as respostas em altura na fase inicial de aclimatização em sala de cultivo. Quanto ao subperíodo de aclimatização *in vitro* (Tabela 4), foi observada a maior média em altura (3,63 cm) aos 15 dias após a retirada dos copos plásticos, e a menor média (2,36 cm) ainda com os copos de plásticos cobrindo as plantas. Os resultados registrados indicam que ocorreu acréscimo em altura após a retirada dos copos, e comprovam que a metodologia de adaptação gradual para a aclimatização de plantas de açoita-cavalo é adequada. Uma média semelhante àquela com média inferior (emprego de 30 mL de meio nutritivo) no presente estudo com açoita-cavalo, foi observada com canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert), em que foi registrada uma média de 2,86 cm na combinação de 30 mL de meio WPM/2 associado a 30 cm³ de vermiculita que corresponde aos primeiros 10 dias da etapa de aclimatização *in vitro* sob o efeito do meio de cultivo (ANDREOLLA, 2019).

TABELA 4 - Valores médios de diâmetro (mm) e altura (cm) em plantas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função do meio de cultivo, independentemente do subperíodo (primeiro subperíodo de 15 dias com cobertura de copos plásticos e segundo subperíodo de 15 dias adicionais sem a cobertura de copos plásticos) na etapa de aclimatização *in vitro*. Santa Maria, UFSM, 2020.

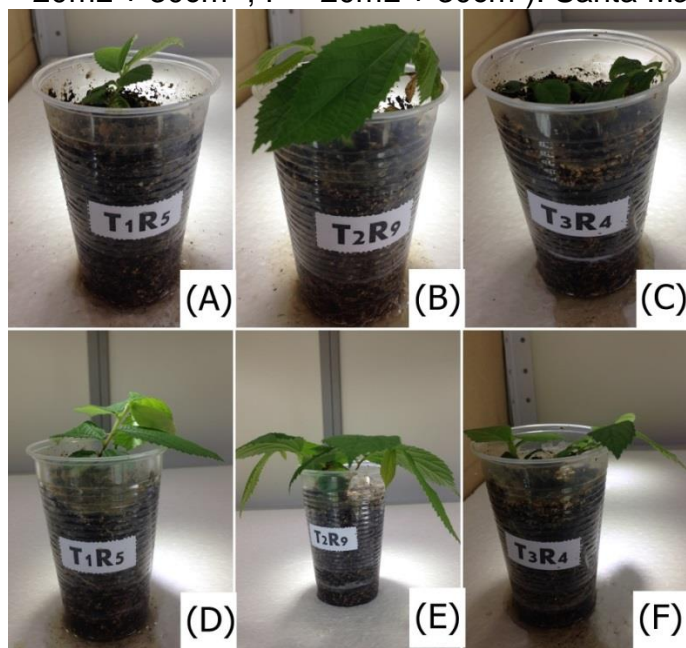
Tratamento Volume de meio nutritivo MS + Vermiculita	Diâmetro (mm)	Altura de plantas (cm)
10mL + 30cm ³	1,68 ab	2,75 b
20mL + 30cm ³	1,80 a	4,05 a
30mL + 30cm ³	1,43 b	2,18 b
Média	1,63	2,99
IV(%)	3,02	5,12

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora (2020)

A Figura 18, a seguir, apresenta o desenvolvimento das plantas micropropagadas nos dois subperíodos da aclimatização *in vitro* em função do efeito do meio de cultivo. Nessa figura, ressaltam-se aqueles tratamentos (Figura 18 A, C, D, F) que ocasionaram dificuldades às plantas pela instabilidade ou alta consistência do meio de cultivo durante a fase de rizogênese *in vitro*, mas que na aclimatização passam a retomar seu crescimento.

Figura 18- Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em função dos meios de cultivos na etapa de aclimatização *in vitro*, no primeiro subperíodo de 15 dias com a cobertura de copos plásticos (A – 10mL + 30cm³ ; B – 20mL + 30cm³ ; C – 30mL + 30cm³) e seguido do segundo subperíodo de 15 dias adicionais sem a cobertura de copos plásticos (D – 20mL + 30cm³ ; E – 20mL + 30cm³ ; F – 20mL + 30cm³). Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

2ª etapa: período de aclimatização *ex vitro* (60 dias em casa de vegetação)

As plantas foram avaliadas nos dois subperíodos de aclimatização *ex vitro* (30 e 60 dias) em casa vegetação quanto às variáveis: sobrevivência, diâmetro e altura que apresentaram resultados satisfatórios.

Em relação à sobrevivência não houve efeito significativo do meio de cultivo, nem para os dois subperíodos de aclimatização *ex vitro* ($p= 0,5731$; $p= 0,0890$; $IV= 4,16$) e tampouco da interação entre os fatores principais ($p= 0,2776$), sendo observada uma média elevada de 90%. De acordo com os resultados anteriores, houve uma perda de apenas 6,6% de plantas da aclimatização *in vitro* para a aclimatização *ex vitro*, e indica que essa fase, apesar de delicada e crucial para a adaptação das plantas micropropagadas, foi conduzida de maneira eficiente. Uma média de sobrevivência próxima à obtida no presente estudo foi registrada em estudos com ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*), sendo observada uma média de 91,43% aos 28 dias de aclimatização em casa de vegetação considerando

o efeito do meio de cultivo contendo meio nutritivo WPM/2 e vermiculita (RABAIOLLI, 2014).

Já para a variável diâmetro (Tabela 5), houve efeito significativo do meio de cultivo e dos subperíodos de aclimatização *ex vitro* ($p= 0,0000$; $p= 0,0000$; $IV= 4,32$), no entanto não houve interação entre os fatores principais ($p= 0,6936$). O pior resultado foi obtido no maior volume de meio nutritivo MS (30mL), com uma média de 2,45 mm, o que indica que essas plantas, na etapa de aclimatização *ex vitro*, apesar de retomarem o seu crescimento, limitado anteriormente na fase de rizogênese *in vitro*, manifestam um desempenho inferior. Já com os demais volumes de meio nutritivo (10 mL ou 20 mL) houve uma maior retomada de crescimento em diâmetro na fase de aclimatização *ex vitro*, principalmente com o menor volume, que se adapta tanto ao substrato como ao microclima em casa de vegetação. Quanto aos subperíodos de aclimatização *ex vitro*, a maior média em diâmetro (4,57 mm) foi registrada aos 60 dias de cultivo, diferindo da menor média aos 30 dias (3,16 mm), o que indica que é necessário estender o período aclimatização em casa de vegetação para aumentar o diâmetro.

TABELA 5 - Valores médios de diâmetro (mm) e altura (cm) em plantas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função dos meios de cultivos, independente dos subperíodos de aclimatização em casa vegetação (30 ou 60 dias) Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Tratamento	Diâmetro (mm)	Altura de plantas (cm)
Volume de meio nutritivo MS + Vermiculita		
10mL + 30cm ³	4,64 a	15,75 a
20mL + 30cm ³	4,49 a	12,58 b
30mL + 30cm ³	2,45 b	5,88 c
Média	3,86	11,40
IV(%)	4,32	9,11

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.
Fonte: Autora (2020)

Já para a altura de plantas (Figura 19), houve efeito significativo somente do meio de cultivo e não havendo efeito significativo do subperíodo de aclimatização *ex vitro* ($p= 0,0000$; $p= 0,2326$; $IV= 9,11$) e nem da interação entre os fatores principais ($p= 0,5344$). O melhor resultado em altura foi obtido com o menor volume de meio nutritivo MS – 10 mL (15,75 cm, Tabela 5), o que pode estar relacionado à retomada

de crescimento já discutida anteriormente, assim como na aclimatização *in vitro*, muito embora tenham ocorrido as limitações já discutidas na fase de rizogênese *in vitro*, principalmente a instabilidade da planta em ficar ereta. Resultado semelhante ao pior desempenho em altura com emprego do mesmo volume de meio nutritivo (30 mL) no presente estudo, foi observado novamente com canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) sendo registrada uma média 5,60 cm, mas desta vez foi utilizada a combinação de meio base WPM/2 com 30 cm³ de vermiculita, esta resposta corresponde aos primeiros 30 dias de aclimatização em casa de vegetação sob o efeito do meio de cultivo e pode ser atribuído a alta consistência do meio de cultivo (ANDREOLLA, 2019).

Figura 19 - Representação ilustrativa das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) em função dos meios de cultivos na etapa de aclimatização *ex vitro* aos 60 dias (A – 10mL + 30cm³ ; B – 20mL + 30cm³ ; C – 30mL + 30cm³). Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020).

A formação de raízes primárias, raízes secundárias, calos, número de raízes, comprimento médio de raízes e número de folhas, que foram avaliadas somente aos 60 dias de aclimatização *ex vitro*, novamente apresentaram médias elevadas.

Para formação de raízes primárias não houve efeito significativo do meio de cultivo ($p= 0,142$; $IV= 4,72$) e foi registrada uma média geral elevada de 87%. Da mesma forma para a formação de raízes secundárias, não houve efeito significativo do meio de cultivo e foi observada uma média geral de 85% ($p= 0,142$; $IV= 4,72$). Os resultados indicam que há um desenvolvimento no sistema radicular, atribuído ao

meio de cultivo poroso decorrente do uso da vermiculita combinada ao meio nutritivo e ao ágar, que, independentemente do volume de meio nutritivo, favoreceu a formação de raízes primárias e secundárias na fase de aclimatização *ex vitro*, as quais são vitais ao desenvolvimento da planta, sendo responsáveis pela ancoragem e absorção de água e nutrientes. Resultado muito inferior ao obtido no presente trabalho foi registrado em estudos anteriores com açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) com o emprego do meio de cultivo constituído por 30 mL de meio nutritivo WPM/2 em função da adição de sacarose (30 g L^{-1}) associado a 30 cm^3 de vermiculita, foi observada uma média de 33,34% de raízes primárias na etapa de aclimatização *ex vitro* (30 dias em casa de vegetação) (SILVA, 2016).

Da mesma forma, para formação de calos, não houve efeito do meio de cultivo ($p= 0,3811$; $IV= 4,13$) e foi observada uma média geral baixa de 3%. Igualmente para número de folhas, não houve efeito significativo do meio de cultivo ($p= 0,0659$; $IV= 9,66$), entretanto, foi registrada uma média geral elevada de 11 folhas por planta. A baixa taxa de calos formados é proporcional à alta formação de raízes e ao número de folhas. A proporção raiz-parte aérea é relevante quanto ao desenvolvimento e adaptação das plantas micropropagadas, tanto da superfície absorvedora (sistema radicular) quanto à perdedora (trocas gasosas), à medida que aumenta o número de folhas ocorre mais fotossíntese, maior síntese de carboidratos, melhor regulação no balanço hormonal e nutricional da planta e, conseqüentemente maior absorção de água e nutrientes pelas raízes. Os resultados indicam que a presença de vermiculita, independente do volume de meio nutritivo, pode influenciar de forma positiva na estrutura geral e funcional da planta.

Quanto ao número de folhas, em estudos com ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) foi observada uma média de aproximadamente 8 folhas por planta aos 28 dias de aclimatização em casa de vegetação com meio de cultivo contendo meio nutritivo WPM/2 e vermiculita, sendo considerada uma média inferior ao obtido no presente estudo com açoita-cavalo (RABAIOLLI, 2014).

Já para comprimento médio de raízes ($p=0,0387$; $IV=10,67$) e número de raízes ($p=0,0052$; $IV=9,75$) foram observados efeitos significativos do meio de cultivo. Para ambas, os piores resultados (Tabela 6) foram obtidos no maior volume de meio nutritivo - 30 mL (17,90 cm e 2 raízes respectivamente), isso pode ser atribuído à alta consistência do meio de cultivo na fase de rizogênese *in vitro*, que se refletiu na restrição de seu crescimento em raiz na fase de aclimatização, reduzindo

sua capacidade na absorção água e nutrientes. O presente trabalho registra médias elevadas em comprimento radicular e respostas superiores a outros estudos com açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), como por exemplo, em função da adição de sacarose ao meio nutritivo WPM/2 na fase de rizogênese *in vitro*, que em sua subsequente aclimatização avalia os substratos (vermiculita, MecPlant® e H-decker®) em copos plásticos, sendo observada uma média em comprimento de raiz de 2,89 cm na aclimatização *ex vitro* (30 dias em casa de vegetação) com a adição de vermiculita e com o efeito de 30 g L⁻¹ de sacarose ao meio nutritivo WPM/2 proveniente da rizogênese *in vitro* (SILVA, 2016).

TABELA 6- Valores médios de comprimento médio de raízes (cm) e número de raízes em plantas de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) em função dos meios de cultivos, aos 60 dias de aclimatização *ex vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Tratamento Volume de meio nutritivo MS + Vermiculita	Comprimento médio de raízes (cm)	Número de raízes
10mL + 30cm ³	27,95 ab	5 a
20mL + 30cm ³	30,80 a	3 ab
30mL + 30cm ³	17,90 b	2 b
Média	25,55	3,3
IV(%)	10,67	9,75

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora (2020)

4.6.3 Desempenho inicial a campo de mudas micropropagadas de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.)

4.6.3.1 O efeito do AIB

Foram avaliadas as variáveis: sobrevivência, incremento em diâmetro e incremento em altura de plantas aos 30 dias após o plantio a campo. Não foi observado efeito significativo do AIB em todas as variáveis. Foram obtidas respostas satisfatórias para o desempenho inicial das plantas micropropagadas, embora não tenham ocorrido diferenças significativas do efeito do Ácido 3-Indolbutírico (AIB).

Em relação à sobrevivência não houve efeito significativo do AIB ($p= 0,7258$; $IV= 3,77$) sendo registrada uma média elevada de 92,5% na fase inicial a campo. Esse resultado indica que apesar das dificuldades de adaptação a campo as mudas

micropropagadas apresentaram um ótimo desempenho inicial, pois os primeiros meses de plantio são cruciais para a sobrevivência das plantas. Contudo, em estudos que avaliam o desempenho de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) a campo foi registrada uma média superior a obtida (98%) verificada aos 3 meses após o plantio, não sendo necessário de replantio (SANTIN, 2015).

Para o incremento em diâmetro também não foi observado efeito significativo do AIB ($p= 0,3038$; $IV= 11,53$), sendo obtida uma média 1,85 mm. O incremento em diâmetro depende da adaptação das plantas a campo, embora o resultado não seja elevado, indica que em apenas 30 dias após o plantio das mudas micropropagadas houve um acréscimo em diâmetro, sugerindo que as plantas passaram a se adaptar ao ambiente em que foram implantadas. O resultado corrobora com a revisão de literatura, em que os autores afirmam que o estado da planta a campo pode ser verificado através das variáveis diâmetro e altura, e que passam a crescer em diâmetro para manter a ancoragem e sustentação impedindo o seu tombamento, o que justifica o incremento em diâmetro em apenas 30 dias (MOREIRA; MOREIRA, 1996; MORAES NETO et al., 2000; SOUZA et al., 2006).

Da mesma forma para o incremento em altura de plantas, não houve efeito significativo do AIB ($p= 0,6797$; $IV= 15,81$) e foi observada uma média de 2,99 cm, e este resultado indica que as plantas passam a se desenvolver, retomar seu crescimento em altura e estão se adaptando ao local de plantio. O local de plantio é uma Área de Preservação Permanente e se encontra em condições desfavoráveis ao desenvolvimento das plantas, devido à competição por luz e nutrientes com outras espécies, além da degradação do solo e das limitações climáticas, as quais foram observadas durante este período pós-plantio, no entanto, as plantas passaram a se desenvolver e crescer diante destas situações.

A Figura 20, a seguir, representa o desenvolvimento das plantas micropropagadas em seu desempenho inicial a campo, que indica que há uma adaptação das plantas a campo, embora seja observada uma competição com outras espécies e associação de gavinhas, indicando que é necessário o monitoramento e os tratamentos silviculturais na área após o plantio.

Figura 20 - Representação ilustrativa do desempenho inicial a campo das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em função de diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) aos 30 dias após o plantio (A – 0 μ M ; B – 10 μ M ; C – 20 μ M; D – 40 μ M). Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

4.6.3.2 O efeito do meio de cultivo

Foram avaliadas as variáveis: sobrevivência, incremento em diâmetro e incremento em altura de plantas aos 30 dias após o plantio a campo. Não foi observado efeito significativo do meio de cultivo em todas as variáveis. Foram observados resultados satisfatórios para o desempenho inicial das plantas micropropagadas, embora não tenha sido registrado o efeito significativo do meio de cultivo.

Em relação à sobrevivência ($p= 0,5585$; $IV= 5,35$) foi registrada uma média elevada de 84,61% na fase inicial a campo. Da mesma forma que o experimento anterior, as mudas micropropagadas apresentaram um bom desempenho inicial a campo, pois os primeiros meses após o plantio são essenciais para estabelecer a sobrevivência das plantas. Estudos com erva-mate (*Ilex paraguariensis*) a campo durante 5 meses, registraram uma média de 51% de mudas sobreviventes, resultado inferior ao observado no presente estudo com acoita-cavalo no primeiro mês (SAIDELLES et al., 2003).

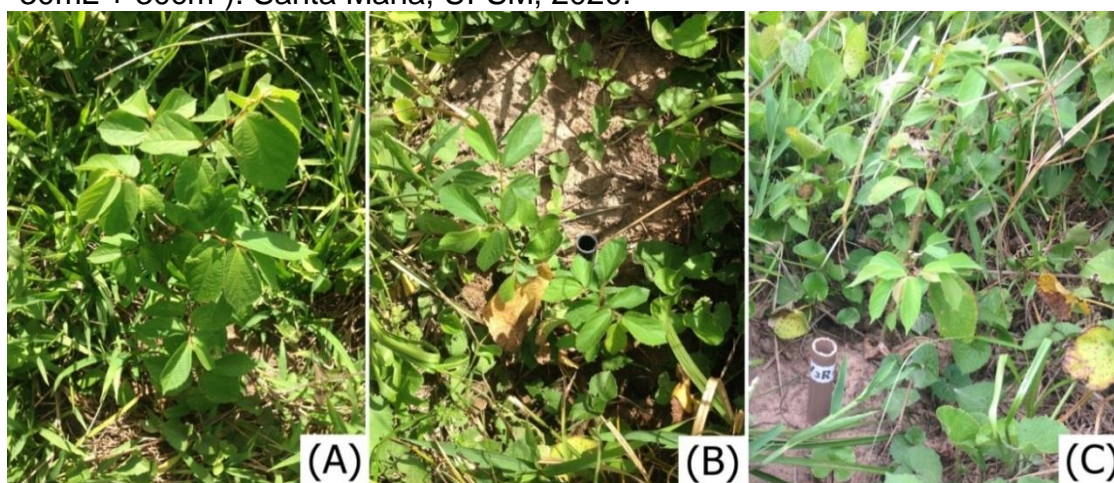
A taxa de mortalidade registrada neste trabalho pode estar atribuída aos fatores climáticos, onde foram registradas temperaturas severas durante todo o mês de dezembro com médias que alcançaram 37°C (Anexo 1) e baixos índices de precipitação (Anexo 2), com apenas 4 dias de chuva (15/12/2019 – 14 mm; 22/12/2019 – 49 mm; 30/12/2019 – 4 mm e 31/12/2019 – 5 mm).

Para a variável incremento em diâmetro ($p= 0,1167$; $IV= 10,56$), foi obtida uma média 2,02 mm, o resultado sugere que em apenas 30 dias após o plantio das mudas micropropagadas houve um acréscimo em diâmetro, indicando que as plantas retomaram seu desenvolvimento objetivando sua sustentação e ancoragem e se adaptaram ao ambiente em que foram implantadas.

Da mesma forma para o incremento em altura de plantas ($p= 0,8525$; $IV= 22,08$) e foi observada uma média de 5,50 cm. Da mesma forma que o experimento anterior as plantas passam a retomar seu crescimento em altura e apresentam forte adaptação ao local. Além disso, esta resposta é superior ao observado no desempenho inicial de mudas micropropagadas em função do AIB, o que pode ter sido influenciada pela adição da vermiculita ainda na fase de rizogênese *in vitro*.

A Figura 21, a seguir, representa desempenho inicial plantas micropropagadas e há uma adaptação das plantas a campo de maneira uniforme, embora também seja observada uma competição com outras espécies e associação de gavinhas, indicando que é necessário o monitoramento e os tratamentos silviculturais na área.

Figura 21 - Representação ilustrativa do desempenho inicial a campo das plantas micropropagadas de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em função dos meios de cultivos aos 30 dias após o plantio (A – 10mL + 30cm³ ; B – 20mL + 30cm³; C – 30mL + 30cm³). Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020).

4.6.4 Conclusões

- O meio nutritivo MS é mais adequado para a rizogênese *in vitro* de açoitacavalos (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) comparativamente ao meio WPM.
- A fase de rizogênese *in vitro* de açoitacavalos (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) pode ser conduzida de maneira eficiente em um período de cultivo de 45 dias.
- Pode ser dispensado o uso de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na fase de rizogênese *in vitro*, contudo a presença da auxina em concentrações de até 20µM melhora a qualidade do sistema radicular (maior número de raízes e maior formação de raízes secundárias).
- Igualmente, na fase de aclimatização tanto *in vitro* como *ex vitro* pode ser dispensado o uso de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), contudo o desempenho melhora com a suplementação de até 20 µM da auxina.
- Considerando-se o efeito do Ácido 3-Indolbutírico (AIB), é necessário estender o período de aclimatização para 80 dias, incluindo-se as etapas de 20 dias em condições *in vitro* e 60 dias adicionais em casa de vegetação.
- O volume de 20 mL de meio nutritivo associado a 30 cm³ de vermiculita é eficiente na rizogênese *in vitro* e também na aclimatização *in vitro* e *ex vitro*.
- Considerando o efeito apenas do meio de cultivo, é necessário estender o período de aclimatização para 90 dias, incluindo-se as etapas de 30 dias em condições *in vitro* e 60 dias adicionais em casa de vegetação.
- O desempenho inicial de mudas micropropagadas de açoitacavalos a campo é evidente em apenas 30 dias e registra elevada média de sobrevivência, incremento em diâmetro e incremento em altura tanto para os experimentos do efeito do AIB quanto para o efeito do meio de cultivo.

5 CAPITULO II - TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.)

5.1 Materiais e métodos

Os experimentos a seguir 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.

5.1.1 Obtenção do material vegetativo

5.1.1.1 Germinação *in vitro*

Para os experimentos *in vitro* foram empregadas sementes que estavam armazenadas em sacos de papel kraft a 8-10° C de temperatura e que foram coletadas no ano de 2012 em oito árvores doadoras da região Noroeste do Rio Grande do Sul, entre os municípios de Ijuí e Entre-Ijuís, Bozano e Coronel Barros.

Antes da inoculação em meio nutritivo, as sementes foram previamente desinfestadas em mesa de fluxo laminar, com todos os materiais previamente esterilizados sob luz ultravioleta (UV) e/ou em autoclave por 40 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Na sequência, as sementes foram imersas em: a) água destilada e autoclavada sob temperatura de 60±5°C durante 10 min; b) em solução etanólica a 70% (v/v) durante 1 min; c) em solução de hipoclorito de sódio a 3% (v/v) durante 10 min; d) em solução de hipoclorito de cálcio a 2% (v/v) durante 10 min; e e) por fim, foi realizado um triplo enxague com água destilada e autoclavada.

Foram colocadas quatro sementes de açoita-cavalo em cada frasco, as quais foram cultivadas em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (experimentos – item 5.2.1 e 5.2.2), durante um período de 60 dias, conforme metodologia desenvolvida por Flôres (2007) e León (2010).

5.1.1.2 Estabelecimento *in vitro*

Decorridos 60 dias da implantação da germinação *in vitro*, descrita anteriormente, das plantas de açoita-cavalo foram isolados segmentos apicais (item 5.2.1) e nodais (item 5.2.2), com aproximadamente 0,8 a 1 cm de comprimento a fim de padronizar o tamanho dos explantes para os experimentos subsequentes. Os

segmentos apicais/nodais foram inoculados em meio nutritivo *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980), conforme metodologia desenvolvida por Flôres (2007), sendo cultivados durante 30 dias.

5.1.1.3 Preparo das soluções e do meio nutritivo

Previamente à inoculação dos explantes e à adição de alumínio (a seguir descrita), foi elaborado o meio nutritivo, de acordo com sua respectiva fase *in vitro* (estabelecimento - WPM e rizogênese – meio MS), sendo a ele acrescidos 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 4,5 (devido à disponibilização de alumínio ocorrer na faixa de pH ácido) antes da inclusão do ágar, e, na sequência, os frascos foram autoclavados por 15 min a 121°C e 1 atm de pressão.

As soluções concentradas de cloreto de alumínio (AlCl₃.6H₂O) foram elaboradas em um volume total de 50 mL de água destilada em béqueres autoclaváveis com capacidade para 100 mL, cobertos por papel alumínio, e a seguir autoclavados. Após a autoclavagem, e com as soluções de alumínio ainda quentes, foram pipetados em mesa de fluxo laminar, com o auxílio de pipetas volumétricas previamente esterilizadas sob luz ultravioleta por 30 min, 5mL em cada repetição e conforme o tratamento, aos frascos contendo 25 mL ou 30 mL (no caso do tratamento testemunha - ausência de alumínio) do meio nutritivo. As soluções não foram autoclavadas nos frascos simultaneamente ao meio nutritivo, em razão da degradação que o ágar sofre quando combinado ao cloreto de alumínio em elevadas temperaturas.

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram novamente vedados com papel alumínio, sendo mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

5.2 Tolerância *in vitro* de açoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) ao alumínio (Al)

5.2.1 O efeito do alumínio na fase inicial de desenvolvimento *in vitro*

Este experimento foi instalado em 05/07/2019 e foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 5 x 4, em que os níveis do fator “A” referem-se às diferentes concentrações de Al (0, 25, 50, 100 ou 200 mg) na forma de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), conforme utilizado por Benedetti et al. (2017), e o fator “B”, ao período de cultivo (45, 60, 90 ou 120 dias), totalizando 20 tratamentos com 10 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo adicionado de alumínio e dois explantes do tipo segmentos caulinares apicais. O meio nutritivo utilizado para estabelecimento foi o *Woody Plant Medium* WPM (LLOYD; McCOWN, 1981).

As avaliações foram realizadas após 45, 60, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro*, e as variáveis analisadas foram: sobrevivência (explantes com coloração verde), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), contaminação por micro-organismos (presença de micélios fúngicos ou colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), formação de calos na base, explantes com formação de raiz primária, e explantes com formação de raiz secundária, todas expressas em porcentagem. Na última avaliação, aos 120 dias, foram avaliados, ainda, o comprimento da raiz primária (cm) e a altura das plantas (cm), medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar.

5.2.2 O efeito do alumínio na fase de rizogênese *in vitro*

Este experimento foi instalado em 23/09/2019 e foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 5 x 2, em que os níveis do fator “A” referem-se às diferentes concentrações de Al (0, 25, 50, 100 e 200 mg) na forma de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), conforme utilizado por Benedetti et al. (2017), e o fator “B”, ao período de cultivo (45 ou 60 dias), totalizando 10 tratamentos com nove repetições. Cada repetição foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo MS (MURASHIGE;

SKOOG, 1962) com a solução de cloreto de alumínio e dois explantes do tipo segmentos nodais. Os explantes foram provenientes de 21 genótipos diferentes oriundos de prévias germinação (60 dias), estabelecimento (30 dias) e multiplicação *in vitro* (240 dias), os quais foram igualmente distribuídos entre os tratamentos de forma aleatória.

As avaliações foram realizadas após 45 e 60 dias de cultivo *in vitro*, e as variáveis analisadas foram: sobrevivência (explantes com coloração verde), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), contaminação por micro-organismos (presença de micélios fúngicos ou colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), formação de calos na base, explantes com formação de raiz primária e com formação de raiz secundária, todas expressas em porcentagem. Na última avaliação, aos 60 dias, foram avaliados, ainda, o comprimento da raiz primária (cm) e a altura das plantas (cm), medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar.

5.3 Análises estatísticas

Foram utilizados os testes de Kolmogorov- Smirnov e Bartlett, para verificar respectivamente, a normalidade dos erros e a homogeneidade de variâncias. Sempre que necessário, as médias foram transformadas, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Em seguida, foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F resultou significativo, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro para a comparação das médias em tratamentos qualitativos e a análise de regressão polinomial para tratamentos quantitativos. Foi estimada a Máxima Eficiência Técnica (MET), que é baseada nos estudos do ponto máximo de uma função polinomial de segundo grau, permitindo registrar a dose máxima para cada variável (STORCK et al., 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) determinado por Pimentel e Gomes (2009). Nas análises foi empregado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® (FERREIRA, 2014).

5.4 Resultados e discussão

5.4.2 O efeito do alumínio (Al) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro*

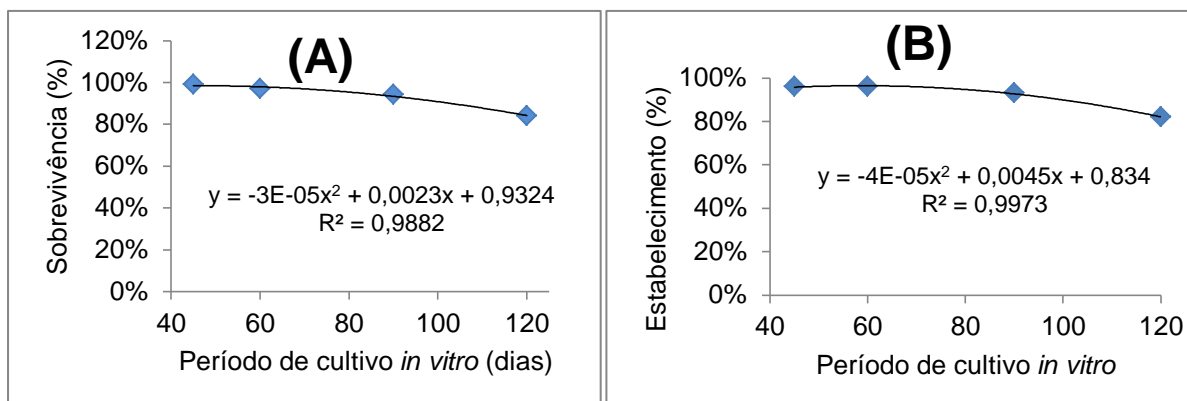
A sobrevivência, estabelecimento, contaminação e formação de raízes primárias foram avaliados aos 45, 60, 90 ou 120 dias de cultivo *in vitro* e houve efeito significativo apenas dos fatores principais ou para pelo menos um deles e não houve interação entre eles, os resultados a seguir, são satisfatórios quanto a tolerância ao alumínio.

Para a variável sobrevivência houve efeito apenas do período de cultivo *in vitro* e não houve efeito significativo do alumínio ($p= 0,0010$; $p= 0,5078$, respectivamente, $IV= 2,56$), nem interação entre os fatores principais ($p= 0,7883$). Os resultados mais satisfatórios foram obtidos aos 45 dias com 99% reduzindo-se para 84% aos 120 dias (Figura 22A), sendo a máxima eficiência técnica (MET) estimada ocorrer aos 39 dias. Embora tenha ocorrido mortalidade, a taxa foi relativamente baixa e a média geral sugere que as plantas de açoita-cavalo na fase de estabelecimento tendem a ser tolerantes ao alumínio. Em estudos voltados a conservação *in vitro* com açoita-cavalo sob o efeito de regulador osmótico manitol ($g L^{-1}$) foi observada uma média geral de 96,01% de sobrevivência aos 120 dias de cultivo *in vitro*, resposta superior ao observado no presente estudo (LEÓN, 2014), o que pode ser atribuído a adição de alumínio ao meio nutritivo.

Para a variável estabelecimento (Figura 22B) houve efeito significativo somente do período de cultivo *in vitro* ($p= 0,0027$) e não houve efeito do alumínio ($p=0,1363$, $IV= 2,74$), tampouco da interação entre os fatores principais ($p= 0,9021$). Para o período de cultivo *in vitro* ajustou-se uma equação de segundo grau e os melhores resultados foram observados aos 45 dias com 96% diminuindo para 82% aos 120 dias com MET estimada a ocorrer em 56 dias. O resultado indica que, com o tempo de cultivo as plantas tendem a reduzir a retomada do crescimento, mas a média ainda é elevada após cerca de 4 meses, independentemente do alumínio. Novamente, foi observada uma resposta superior ao presente trabalho em outro estudo com a espécie relacionado à conservação *in vitro* sob o efeito de regulador osmótico no estabelecimento *in vitro* na presença de sacarose, registrando uma média de 98,6% na ausência de manitol ($g L^{-1}$) em 120 dias de cultivo *in vitro*, esta diferença entre os trabalhos pode ser atribuída aos tratamentos com a adição de

alumínio ao meio nutritivo em que influenciou na redução das médias de estabelecimento (LEÓN, 2014).

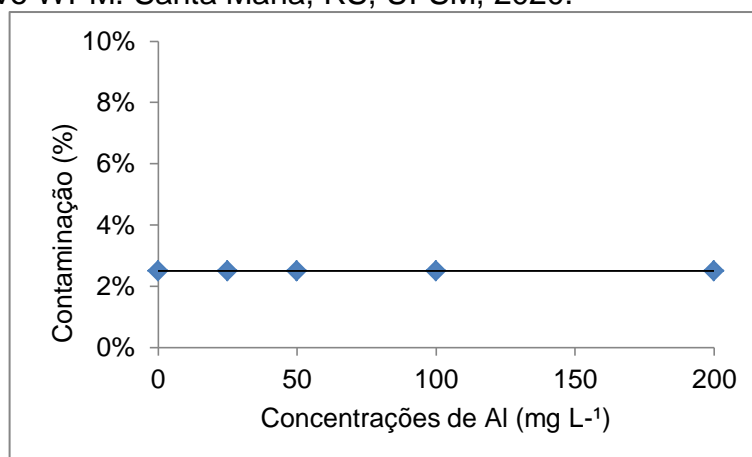
Figura 22 - Médias de sobrevivência (%) – (A) e estabelecimento (%) – (B) em brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* em função do período de cultivo *in vitro* (45, 60, 90 e 120 dias) em meio nutritivo WPM independentemente das concentrações de alumínio (Al). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

E para contaminação por micro-organismos, foi observado efeito significativo somente das concentrações de alumínio ($p=0,0002$; IV= 3,35) e não houve efeito significativo do período de cultivo *in vitro* ($p= 0,2266$), nem da interação ($p= 0,1424$). Não foi possível ajustar um modelo matemático ao parâmetro fisiológico, haja vista ter sido observada uma média de 12,5% de contaminação por micro-organismos (Figura 23) na ausência de alumínio, sendo que na sua presença, independentemente da concentração, essa associação não foi mais registrada, sendo observada uma média geral de 2,5% para todos os tratamentos. O resultado indica que o alumínio inibe o desenvolvimento de micro-organismos no cultivo *in vitro* de acoita-cavalo e corrobora com a afirmação em que o alumínio pode desempenhar o efeito adverso aos micro-organismos (MCGRATH et al. 1995) e que o nível de toxidez depende das concentrações de alumínio (HALL, 2002).

Figura 23 - Média de contaminação por micro-organismos (%) em brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* em função das concentrações de alumínio (Al) aos 120 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



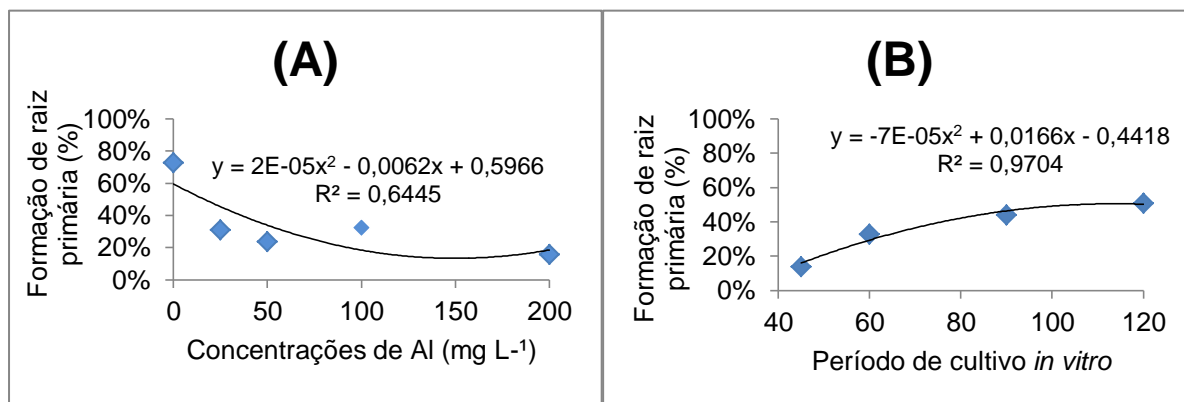
Fonte: Autora (2020)

Já para formação de raízes primárias ($p=0,000$; $p= 0,000$, respectivamente, $IV= 5,73$), houve efeito significativo dos dois fatores principais, mas não houve interação entre eles ($p= 0,613$), sendo ajustadas equações de segundo grau, relacionando-a com as concentrações de Al e outra com o período de cultivo *in vitro*.

Na ausência de alumínio foi registrado uma média de 73% de raízes primárias (Figura 24A), reduzindo-se para 16% na maior concentração testada (200 mg L⁻¹), sendo a MET estimada a ocorrer em 154,5 mg L⁻¹. Esta redução das raízes primárias está relacionada ao aumento das concentrações de alumínio, quanto maior a concentração menor será a formação de raízes primárias, sendo um fator limitante para ancoragem e absorção. No entanto, a espécie tende a ser tolerante, pois mesmo em altas concentrações de alumínio (200 mg L⁻¹) a espécie forma raízes primárias. Esse resultado corrobora estudos que relatam que antes mesmo da inibição do crescimento em raízes, já ocorre alteração das condições fisiológicas e bioquímicas da planta devido ao estresse oxidativo causado pelo alumínio (Al) reduzindo a chance de formar raízes (YAMAMOTO et al., 2001).

A Figura 24B indica que quanto maior o período de cultivo *in vitro* maior é a formação de raízes primárias, com média inicial de 14% aos 45 dias e podendo alcançar 51% aos 120 dias, a MET é estimada a ocorrer em 114 dias.

Figura 24 - Média de formação de raízes primárias (%) em brotações de acoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro*. A - Concentrações de Alumínio (Al) (mg L⁻¹); B - Período de cultivo *in vitro* (45, 60, 90 ou 120 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

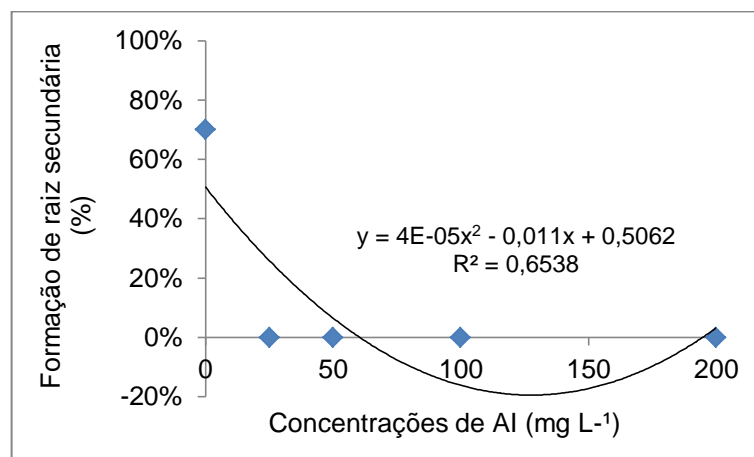


Fonte: Autora (2020)

Somente aos 120 dias, foram avaliadas as variáveis: formação de raízes secundárias, calos, altura, comprimento médio de raiz, e número de raízes. Para todas as variáveis foram observados efeito significativo para o alumínio e ajustou-se a uma equação de segundo grau em função das concentrações de alumínio.

Para a formação de raiz secundária ($p=0,000$; $IV= 4,53$) foi observada uma média de 70% na ausência de alumínio (Figura 25) tornando-se nula (0%) nas próximas concentrações até a maior concentração testada (200 mg L⁻¹), sendo a MET estimada a ocorrer a 13,7 mg L⁻¹. Assim, na fase de estabelecimento, o alumínio inibe a formação de raízes secundárias e desta forma restringe o desenvolvimento das plantas submetidas às concentrações de alumínio (Al), ratificando o fato de que as raízes secundárias possuem um papel vital para a planta, principalmente na absorção de água e nutrientes. Outros trabalhos com a adição de alumínio como, por exemplo, com o sorgo (*Sorghum bicolor* L., Moench) (PEREIRA et al., 2008), com clones de batata Macaca, SMIC148-A, Dakota Rose e *Solanum microdontum* (TABALDI et al., 2009) e *Arabidopsis sp.* (LIU et al., 2011) apresentaram uma redução no desenvolvimento do sistema radicular, assim como observado no presente trabalho.

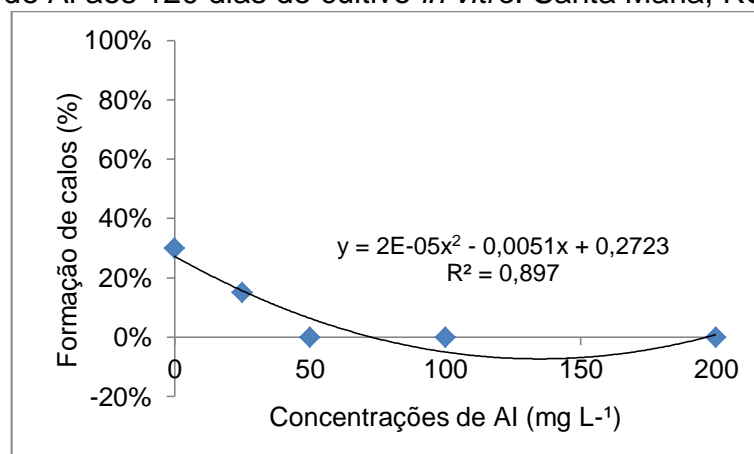
Figura 25 - Média de formação de raízes secundárias (%) em brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* em função das concentrações de Al aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

Houve maior formação de calos ($p=0,009$; $IV= 4,92$) na ausência de alumínio - 30% (Figura 26) reduzindo para 0% na maior concentração testada (200 mg L^{-1}), sendo a MET estimada a ocorrer em $128,3 \text{ mg L}^{-1}$. A formação de calos nem sempre é uma característica boa devido a substituição da formação raízes por calos, o alumínio pode inibir totalmente o desenvolvimento de calos na base das plantas cultivadas *in vitro* na fase de estabelecimento. A espécie tende a ser tolerante ao alumínio, ou seja, formam-se raízes primárias em altas concentrações que são inexistentes em solos naturais e elas ainda inibem a formação de calos.

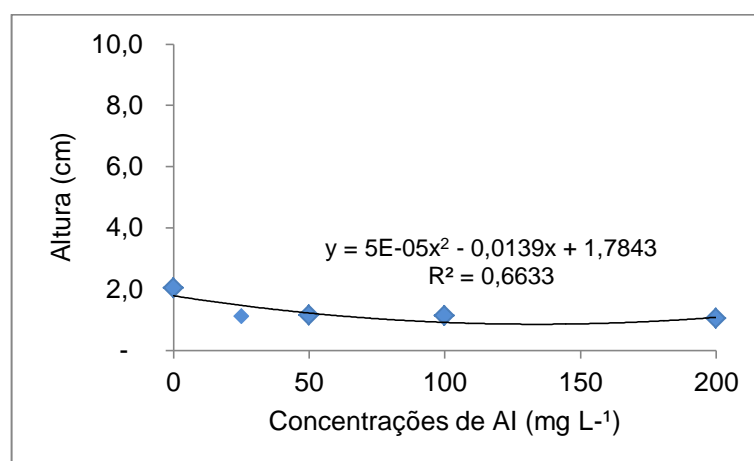
Figura 26 - Média de formação de calos (%) em brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* em função das concentrações de Al aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

Foi registrada uma altura média ($p=0,000$; $IV= 2,91$) de 2,0 cm na ausência de alumínio (Figura 27) mantendo a 1,1 cm até a maior concentração testada (200 mg L⁻¹) com MET estimada a ocorrer a 138,8 mg L⁻¹. As plantas micropropagadas garantem uma altura e se estabilizam quando submetidas as concentrações de alumínio (Al), procuram-se manter vivas e reduzir o gasto energético com uso eficiente de carboidrato para o crescimento. Respostas superiores em brotações de grápia (*Apuleia leiocarpa*), cultivadas em minirizotrons aos 7 e 11 dias, na presença de diferentes concentrações de Al (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0mg L⁻¹) foram observadas as seguintes médias, 4,1 cm aos 7 dias e 4,8 cm aos 11 dias, esta diferença pode ser atribuída as maiores concentrações testadas no presente estudo com açoitacavallo (FORTUNATO; NICOLOSO, 2004)

Figura 27 – Altura média (cm) em brotações de açoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* em função das concentrações de alumínio (Al) aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



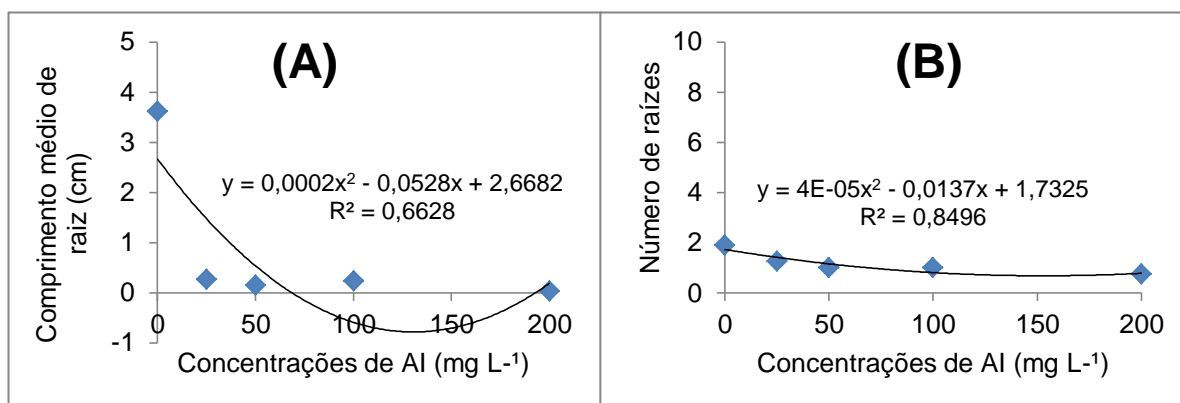
Fonte: Autora (2020)

O maior comprimento médio de raiz ($p=0,000$; $IV= 11,47$) foi obtido na ausência de alumínio (Figura 28A) com uma média de 3,61 cm diminuindo para 0,025 cm na maior concentração testada (200 mg L⁻¹) sendo a MET estimada a ocorrer a 132 mg L⁻¹. Nas concentrações mais altas, o alumínio inibe o crescimento de raiz, quando é observada a toxidez ao Alumínio (Al), nota-se que há uma restrição no crescimento das raízes ocupa menor área no meio nutritivo e com isso passa a ter uma limitação quanto à absorção de água e nutrientes disponíveis. Novamente, foram observadas médias superiores em outro trabalho com brotações

de grábia (*Apuleia leiocarpa*), cultivadas em minirizotrons aos 7 e 11 dias, na presença de diferentes concentrações de Al (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0mg L⁻¹) em que foram registradas médias de 7,2 cm aos 7 dias e 9,7 cm aos 11 dias, sendo favorecidas pelas baixas concentrações testadas no trabalho, o que diverge do presente estudo com açoita-cavalo em que a maior concentração de alumínio testada é de 200 mgL⁻¹ (FORTUNATO; NICOLOSO, 2004).

Quanto ao número de raízes (p=0,000; IV= 13,07), registrou-se uma média de 2 raízes (Figura 28B) na ausência de alumínio mantendo-se a média de 1 raiz para até a maior concentração testada (200 mg L⁻¹) com a MET estimada a ocorrer a 170,75 mg L⁻¹. Mantem-se a média de 1 raiz por planta nos tratamentos na presença de alumínio (Al).

Figura 28 - Médias de comprimento de raízes (cm) – (A) e numero de raízes – (B) em brotações de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* em função das concentrações de Alumínio (Al) aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

Na Figura 29, a seguir, mostra os aspectos de desenvolvimento das brotações na presença de alumínio (Figura 29 – B, C, D e E) comparado à ausência do metal (Figura 29A), nas quais é visível a formação de raízes laterais e as ponteiros das raízes brancas, e bem como o escurecimento das brotações à medida que aumentam as concentrações de alumínio. É notável o sintoma de clorose nas folhas das brotações principalmente nas concentrações mais altas de alumínio, o que pode ser atribuído à redução de clorofila a, b total e carotenoides na planta, que corrobora com outro estudo que analisou o efeito do alumínio sobre parâmetros

bioquímicos do açoitacavalado em sistema hidropônico, e observou essa redução a partir de 50 mg Al L⁻¹ (SASSO et al., 2017).

Figura 29 – Representação ilustrativa de brotações de açoitacavalado (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) cultivadas em meio nutritivo WPM na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* na presença de alumínio (A – 0 mg L⁻¹; B – 25 mg L⁻¹; C – 50 mg L⁻¹; D – 100 mg L⁻¹; E – 200 mg L⁻¹) aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

5.4.3 O efeito do alumínio (Al) na de rizogênese *in vitro*

A sobrevivência, estabelecimento, contaminação por micro-organismos e formação de raízes primárias foram avaliadas aos 45 ou 60 de cultivo *in vitro*, houve efeito significativo apenas dos fatores principais ou de pelo menos um deles e não houve interação entre eles, os resultados a seguir, são satisfatórios quanto a tolerância ao alumínio na fase de rizogênese *in vitro*.

Para a sobrevivência e estabelecimento houve efeito significativo apenas do período de cultivo *in vitro* ($p= 0,000$; $p= 0,000$) e não do alumínio ($p= 0,1534$; $IV= 3,31$; $p= 0, 5910$; $IV= 3,90$) e nem da interação entre os fatores principais ($p= 0,2904$; $p= 0,2447$). Para a sobrevivência quanto ao período de cultivo *in vitro* houve uma pequena redução na taxa de sobrevivência das brotações (Tabela 7), dos 45 dias para os 60 dias (99 versus 77%). Da mesma forma para o estabelecimento foi observado uma média de 97% (Tabela 7) aos 45 dias reduzindo ao longo do período de cultivo para 71%. Por outro lado, com o aumento do período de cultivo *in vitro* há um incremento significativo na formação de raízes primárias, sugerindo que a espécie é tolerante ao alumínio.

TABELA 7 - Valores médios de sobrevivência (%), estabelecimento (%) e contaminação por micro-organismos (%) e formação de raízes primárias (%) brotações de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) aos 45 e 60 dias de rizogênese *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Período de cultivo (dias)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Contaminação por micro-organismos (%)	Formação de raiz primária (%)
45	99 a	97 a	2 a	77 b
60	77 b	71 b	12 b	84 a
Média	88,0	84,0	7,0	80,5
IV(%)	3,31	3,90	5,18	6,53

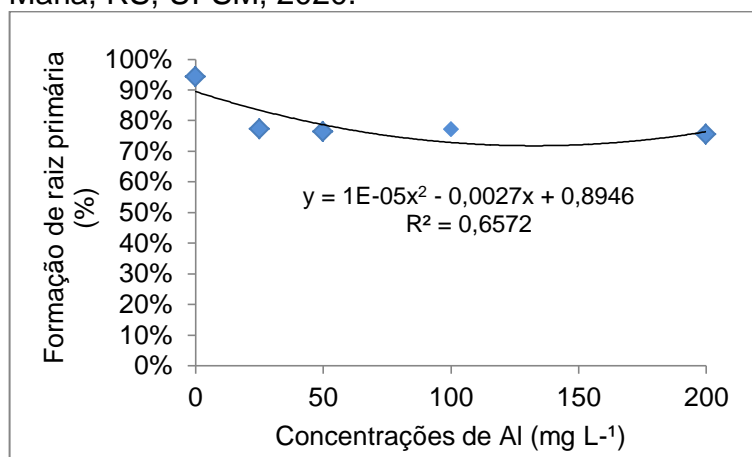
*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora (2020)

Para contaminação por micro-organismos (%) houve efeito significativo apenas para o período de cultivo *in vitro* ($p= 0,0329$) e não houve as concentrações de alumínio ($p= 0,0556$; $IV= 5,18$) e nem interação entre os fatores principais ($p= 0,5380$). Foi observada uma média de 7%, e na medida em que aumenta o período de cultivo *in vitro* tende a aumentar, aos 45 dias foram observados 2% (Tabela 7) e aos 60 dias 12%.

Para a formação de raízes primárias (%) ($p=0,0003$; $p= 0,0119$, respectivamente, $IV= 5,63$), houve efeito significativo para o alumínio e para o período de cultivo *in vitro*, não houve interação entre os fatores principais ($p= 0,2258$) e ajustou-se a uma equação de segundo grau em função das concentrações de alumínio. Foi obtida uma média de 94% de raízes primárias (Figura 30) na ausência de alumínio reduzindo para apenas 76% na maior concentração testada (200 mg L^{-1}), sendo a máxima eficiência técnica (MET) estimada a ocorrer em 133,5. Na fase de rizogênese *in vitro*, o açoita-cavalo tende a ser tolerante ao alumínio (Al), visto as médias apresentadas foram relativamente altas e as plantas micropropagadas já passaram pelo processo de desenvolvimento, na fase de estabelecimento. A Tabela 7, indica que quanto maior o período de cultivo *in vitro* maior é a formação de raízes primárias, com média inicial de 77% aos 45 dias e podendo alcançar 84% aos 60 dias, diferindo-as estatisticamente.

Figura 30 - Média de formação de raízes primárias (%) em brotações de acoitacavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase de rizogênese *in vitro* em função das concentrações de Alumínio (Al), independente do período de cultivo *in vitro* (45 e 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

A formação de raízes secundárias, formação de calos, comprimento médio de raiz, altura e número de raízes foram avaliadas somente aos 60 dias de cultivo *in vitro* e apresentaram elevadas médias.

Para a formação de raízes secundárias ($p=0,1550$; $IV= 4,06$), calos ($p=0,0636$; $IV= 7,06$), comprimento médio de raiz ($p=0,1702$; $IV= 8,69$) e número de raízes ($p=0,2635$; $IV= 12,12$) não houve efeito significativo para as concentrações de alumínio (Al). E para a altura ($p=0,000$; $IV= 2,49$), houve efeito significativo para o alumínio e ajustou-se a uma equação de segundo grau em função das concentrações de alumínio.

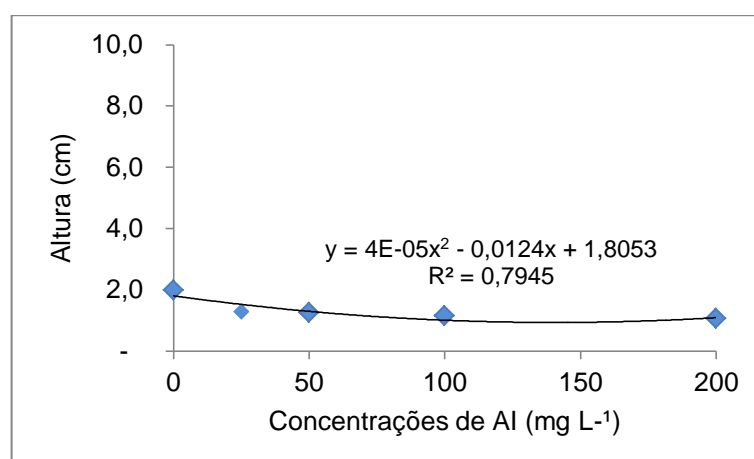
Foram registradas médias reduzidas de 6% raízes secundárias, de 0,3 cm de comprimento de raiz e 1 raiz por brotação cultivada *in vitro*. Por outro lado, obtiveram-se médias altas (44%) de calos de formados, o que pode ser atribuído à variação no balanço hormonal endógeno na fase de rizogênese *in vitro*, aumentando a formação de calos da fase de estabelecimento para a rizogênese *in vitro*.

A partir das respostas de rizogênese *in vitro* obtidas com a adição de alumínio ao meio nutritivo, é normal que ocorra um decréscimo na qualidade do sistema radicular das plantas, haja vista que o alumínio em altas concentrações passa a ser tóxico e é no sistema radicular em que ocorre os primeiros sintomas. Mesmo as plantas sejam tolerantes a este metal, é normal que ocorra uma redução no

desempenho do sistema radicular conforme aumentam as concentrações de alumínio, o que confirma o ocorrido em outros trabalhos com alumínio, por exemplo, com o sorgo (*Sorghum bicolor* L., Moench) (PEREIRA et al., 2008), com clones de batata Macaca, SMIC148-A, Dakota Rose e *Solanum microdontum* (TABALDI et al., 2009) e *Arabidopsis* sp. (LIU et al., 2011).

Por fim para a variável altura (Figura 31), na ausência de alumínio foi observada uma média de 2,0 cm, reduzindo-se para 1,1 na maior concentração testada (200 mg L⁻¹). A MET é estimada ocorrer a 155,1 mg L⁻¹. Esse resultado indica que as plantas mantêm a altura, mas na presença do metal investem nas raízes como uma forma de absorção de água e nutrientes, criando estratégias para a tolerância ao Al. Resultados semelhantes relacionados à altura, nas concentrações de 25 e 50 mg L⁻¹ de Al, foram registrados com erva-mate (*Ilex paraguariensis*), que é considerada uma espécie extremamente tolerante ao metal (BENEDETTI, 2012). Já em outro estudo com goiabeira (*Psidium guajava* L.) registrou um aumento na altura das mudas para as concentrações abaixo de 10 mg L⁻¹, aos 30 e 90 dias de cultivo em solução nutritiva em sistema hidropônico, não sendo considerada tolerante ao alumínio (SALVADOR et al., 2000).

Figura 31 – Altura média (cm) em brotações de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) na fase de rizogênese *in vitro* em função das concentrações de Al, para 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

Na Figura 32, a seguir, podem ser comparados os aspectos visíveis da adição de alumínio ao meio nutritivo, as brotações que foram submetidas às maiores concentrações, apresentam estrutura mais escura em sua base, o que não havia sido observado na fase inicial de desempenho *in vitro*, o que corrobora com a

revisão de literatura que a tolerância ao alumínio depende da fase de desenvolvimento das brotações. Assim como na fase de estabelecimento é possível identificar o sintoma de clorose nas folhas das brotações na fase de rizogênese *in vitro* principalmente nas concentrações mais altas de alumínio, o que pode ser atribuído a redução de clorofila a, b total e carotenoides na planta, que corrobora com outro estudo que analisou o efeito do alumínio sobre os parâmetros bioquímicos em açoita-cavalo com sistema hidropônico, e de acordo com os resultados observou essa redução a partir de 50 mg Al L⁻¹ (SASSO et al., 2017).

Figura 32 - Representação ilustrativa de brotações de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.), em função das concentrações de alumínio adicionadas ao meio nutritivo MS (A – 0 mg L⁻¹; B – 25 mg L⁻¹; C – 50 mg L⁻¹; D – 100 mg L⁻¹; E – 200 mg L⁻¹) aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, UFSM, 2020.



Fonte: Autora (2020)

5.5 Conclusões

- Na fase inicial de desenvolvimento *in vitro*, o açoita-cavalo manifesta tolerância ao alumínio, sendo capaz de sobreviver, retomar o crescimento e formar raízes primárias, mesmo com limitações no seu desenvolvimento.
- Na fase de rizogênese *in vitro* a tolerância ao alumínio se manifesta na formação de raízes primárias, cuja média é elevada, mesmo na presença de 200 mg L⁻¹.

6 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho constitui-se em uma relevante contribuição para as etapas de rizogênese, aclimatização e desempenho inicial de mudas a campo que fazem parte do protocolo de micropropagação de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), cujas pesquisas foram iniciadas pelo nosso grupo em meados dos anos 2000.

Dentre as conclusões obtidas destacamos,

a) na rizogênese *in vitro*:

- Os melhores resultados, de uma maneira geral, foram observados com o meio nutritivo MS, considerando-se as médias de sobrevivência e estabelecimento em conjunto com a formação de raízes primárias. Ou seja, quando é desejado produzir um número maior de indivíduos tanto visando implantar experimentos subsequentes como produzir mudas por meio da micropropagação, o meio nutritivo mais indicado é o MS. Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa não foram conduzidos experimentos com o objetivo de avaliar e selecionar meios mais adequados para essa fase da propagação *in vitro*, sendo empregado o meio WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2). Igualmente, nos experimentos, a fase de estabelecimento não foi realizada, o que pode ter contribuído para a obtenção de médias inferiores.

- Foi registrada uma média geral elevada de 89% de formação de raízes primárias independentemente da adição de auxina, já com a adição de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) em concentrações moderadas (adição de até 20 μ M) foi observado um comportamento positivo em relação ao desenvolvimento da planta e rizogênese *in vitro* em *Luehea divaricata*. As brotações micropropagadas na ausência de AIB (0 μ M) apresentam maior altura (cm), devido ao investimento em parte aérea. As demais variáveis não foram influenciadas pela adição de reguladores de crescimento e apresentaram excelentes médias, o que sugere dispensar o uso de AIB na fase de rizogênese *in vitro* visando redução dos custos da micropropagação, ou então, utilizar até 20 μ M de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) a fim de melhorar a qualidade do sistema radicular (maior número de raízes e maior formação de raízes secundárias).

- De acordo com os resultados obtidos que favorecem a rizogênese *in vitro* e o desenvolvimento das brotações, é indicado o uso do volume de 20 mL de meio nutritivo associado a 30 cm³ de vermiculita como meio de cultivo, sendo observada a formação de 73,40% de raízes secundárias que são as principais responsáveis pela absorção de águas e nutrientes e desempenham papel vital à planta.

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

- Assim como na fase de rizogênese *in vitro*, na aclimatização tanto *in vitro* como *ex vitro* pode ser dispensado o uso de Ácido 3-Indolbutírico (AIB), contudo o desempenho melhora com a suplementação de até 20 µM da auxina. Considerando-se o efeito do Ácido 3-Indolbutírico (AIB), é necessário estender o período de aclimatização para 80 dias, incluindo-se as etapas de 20 dias em condições *in vitro* e 60 dias adicionais em casa de vegetação.

- Na aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas micropropagadas em função do meio de cultivo, o volume de 20 mL de meio nutritivo associado a 30 cm³ de vermiculita é eficiente e apresenta resultados satisfatórios quanto ao sistema radicular e estrutura da planta. Considerando o efeito apenas do meio de cultivo, é necessário estender o período de aclimatização para 90 dias, incluindo-se as etapas de 30 dias em condições *in vitro* e 60 dias adicionais em casa de vegetação.

c) no desempenho inicial a campo de mudas micropropagadas;

- O desempenho inicial de mudas micropropagadas de açoita-cavalo é evidente em apenas 30 dias, sendo observadas médias elevadas de sobrevivência (92,50% e 84,61%) e adicionalmente incremento em diâmetro e altura, respectivamente para os experimentos conduzidos desde a rizogênese *in vitro* do efeito do AIB e do meio de cultivo.

d) na tolerância *in vitro* de genótipos ao alumínio:

- Na fase inicial de desenvolvimento *in vitro*, os genótipos de açoita-cavalo manifestam tolerância ao alumínio, sendo capaz de sobreviver, retomar o crescimento e formar raízes primárias, mesmo com limitações no seu

desenvolvimento. Da mesma forma na fase de rizogênese *in vitro*, a tolerância ao alumínio se manifesta na formação de raízes primárias, cuja média é elevada, mesmo na presença de 200 mg L⁻¹.

- Os resultados apresentados diferem quanto as fases da micropropagação (fase inicial de desenvolvimento *in vitro* e rizogênese *in vitro*) e nota-se uma maior tolerância a genótipos ao Al, para faixas mais altas de concentração na fase de rizogênese *in vitro* com base na MET, que infere sobre a dose letal.

- Os resultados elevados observados nos dois experimentos de tolerância ao alumínio, possuem um melhor desempenho dos genótipos testados quanto os da fase de rizogênese *in vitro* (efeito do AIB e meio de cultivo), o que é justificado pelas sucessivas multiplicações que antecederam o experimento de rizogênese *in vitro* de tolerância ao alumínio, e também pelas características intrínsecas aos genótipos testados, bem como o uso de segmentos apicais caulinares utilizados na fase de estabelecimento *in vitro* com o efeito do alumínio.

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

- O uso do meio nutritivo MS para a fase de rizogênese *in vitro* e podendo ser reduzido o período de cultivo aos 45 dias.

- Dispensar o uso de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) ou suplementar o meio nutritivo com até 20 µM da auxina a fim de melhorar a qualidade do sistema radicular (maior número de raízes e maior formação de raízes secundárias) já na fase de rizogênese *in vitro*;

- Na aclimatização considerando-se o efeito do Ácido 3-Indolbutírico (AIB), é necessário estender o período de aclimatização para 80 dias (*in vitro* e *ex vitro*).

- É indicado o uso do volume de 20 mL de meio nutritivo associado a 30 cm³ de vermiculita como meio de cultivo na fase de rizogênese *in vitro*;

- Na aclimatização considerando-se o efeito apenas do meio de cultivo, é necessário estender o período de aclimatização para 90 dias (*in vitro* e *ex vitro*)

- Nota-se o desempenho inicial das plantas micropropagadas de açaíta-cavalo em apenas 30 dias após o plantio.

- Na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* e rizogênese *in vitro* os genótipos de açaíta-cavalo tendem a ser moderadamente tolerantes ao alumínio.

7 REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa; UFV, Imprensa Universitária, 442 p. 2004.
- ALI B, HASAN SA, HAYAT S, HAYAT Q, YADAV S, FARIDUDDIN Q, AHMAD A. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Environmental and Experimental Botany**. 2008. 153-159 p.
- ANDREOLLA, T. L. P. Rizogênese *in vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (SPRENGEL). 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.
- ANTONIAZZI, A. P. et al. Eficiência de recipientes no desenvolvimento de mudas de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 313-317, jul./set. 2013.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.262-297.
- BARRUETO CID, L.P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília; Embrapa/Cenargen, 2000. p. 55 - 81.
- BENEDETTI, E.L..Tolerância da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ao alumínio. 30 de julho de 2012. 72 p. Tese (Doutorado)-Universidade federal de Viçosa.Viçosa-MG.
- BENEDETTI, E. L. et al. **Alumínio estimula o crescimento radicular de erva-mate?** Pesq. flor. bras., Colombo, v. 37, n. 90, p. 139-147, abr./jun. 2017
- BEUTLER, A.N.; FERNANDES, L.A.; FAQUIN, V. Efeito do alumínio sobre o crescimento de duas espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p.923-928, 2001.
- BIGHETTI, A. E. **Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini**. *Lecta*, São Paulo, v. 22, n. 1/2, p. 53-58, 2004. BRUNELLI, A. A.; LEAL, J. J.; LONGO, F. G. (Coord.). **Madeiras: material para o design**. São Paulo: SCTDE, 1997. 73 p.
- 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, CNPq, 1990.p. 340-345.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1, Brasília: EMBRAPA, 1998. p.87-131.

CARVALHO, P. E. R. **Açoita-Cavalo (*Luehea divaricata*)**, Circular Técnica, 1.ed., 147, 2008 CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

COUTO, M.; OLIVEIRA, R. P.; FORTES, G. R. L. **Multiplificação in vitro dos porta-enxertos de *Prunus* sp. 'Barrier' e 'Cadamam'**, Joboticabal, v. 26, n. 1, p. 5-7, abr., 2004.

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

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

CURTI, A. R.; **Formação de raízes em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert**. 2014. 130 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

CUSTÓDIO, C.C.; BOMFIM, D.C.; SATURNINO, S. M.; MACHADO NETO, N.B. **Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja**. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 59, n.1, p.145-153, 2002.

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

DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SUTTER; E.G.; SHACKEL, K.A. **Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil**. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 95, p. 225-232, 1995

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in Plant Tissue Culture**. Press Syndicate of the University of Cambridge, Melbourne, 1995.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 531-541, 2001.

ERIG, A. C., et al. 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.

FACHINELLO, J. C. *et al.* **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179 p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas. 2005. 222 p.

FARIAS, J.A.D. **Contribuição para a silvicultura de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini (Acoita-Cavalo)**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Florestal) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria,RS.

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.

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

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

FLÔRES, A.V. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.

FONSECA, E. P. **Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume., *Cedrela fissilis* Vell. e *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. produzidas sob diferentes períodos de sombreamento.** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2000. 113 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, 2000.

FORTUNATO, R. P.; NICOLOSO, F. T. Toxidez de alumínio em plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride) **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.89-95, 2004.

FOWLER, J. A. P.; Superação de dormência e armazenamento de sementes de espécies florestais. In: GALVÃO, A.P.M. (Ed.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais.** Brasília: EMBRAPA, 2000. p.77-100.

FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 72-79, 2006.

FREITAS, T. P. **Propagação de ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus* Mattos) por miniestaquia.** 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2012.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, organogênese, calogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** Tese de doutorado. 2010. 158f. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

GOMES, J. M.; PAIVA, H. N. **Viveiros Florestais: propagação sexuada.** Viçosa: UFV, 2011. 116 p.

GONÇALVES, J. L. M. et al. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETI, V. (Ed.). **Nutrição e fertilização florestal.** Piracicaba: IPEF, p. 309-350, 2005.

GOULART, P. B. et al. Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 522-532, jul./set. 2014.

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

HAASE, D. L. Understanding Forest Seedling Quality: Measurements and Interpretation. **Tree Planters' Notes**, Washington, 52(2): 24-30, 2008. Hall JL Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany** 53: 1-11. 2002.

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

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915 p.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; JOSÉ SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. R. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

HIROTA, M. M. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**: período 2011/2012. Relatório técnico. São Paulo: [s. n.], 2013. 61 p. IBF, Instituto Brasileiro de Florestas. **Bioma Mata Atlântica**. Disponível em: <<https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica>>. Acesso em: 15 de out. de 2019.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. **How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency**. Annual Review of Plant Biology, v.55, p.459-493, 2004.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, T.H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. 484p.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. **Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “in vitro” do porta-enxerto de pereira oh x f97**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, abr/jun,2000

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

LEÓN, E. A. B. **Qualidade de sementes, micropropagação, conservação *in vitro* e Isolamento De DNA genômico de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.** 2014. 209 f.

Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

LIU, N. et al. Salicylic acid involved in the process of aluminum induced citrate exudation in *Glycine max*L. **Plant and Soil**, v.83, n.352, p.85–97, 2011.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v.30, p.421-327, 1981.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4. ed. São Paulo: Odessa/Instituto Plantarum, v.1, 2002. 368 p.

LORENZI, H.; **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 6. ed. São Paulo: Editora Plantarum, v.1, 2014. p.251.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P.; ANGYALOSSYALFONSO, V. **Manual de identificação das principais madeiras comerciais brasileiras**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S/A - IPT: PROMOCET, 1983. 241 p.

MALAVOLTA, E. **Elementos de Nutrição Mineral de Plantas**. São Paulo: Editora agrônômica Ceres Ltda. 1980. 251 p.

MARKS, T. R. et al. A role for polar auxin transport in rhizogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 189-198, 2002

MCGRATH, S.P., Chaudri, A.M., Giller, K.E. Long term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. **Journal of Industrial Microbiology** 14, 1995.

MELO, L. A. et al. Quality and initial growth of seedlings *Mimosa caesalpinifolia* Benth. produced in different volumes of containers. **Ciência Florestal**, 28(1): 47-55, 2018.

MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVA, M.A. **Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n.7, p.843-846, 2003.

MENDONÇA et al., Avaliação silvicultural de dez espécies nativas da Mata Atlântica. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 277-290, jan.-mar., 2017

MORAES NETO, S. P et al. Crescimento de mudas de algumas espécies arbóreas que ocorrem na mata atlântica, em função do nível de luminosidade. **Revista Árvore**, v.24, n. 1, p. 35-45, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; MOREIRA, F. W. Característica de germinação de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. **Acta Amazônica**, 26, 3-16, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15,n3,p. 473- 479. 1962.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.

OLIVEIRA, M. J. V. **Enraizamento de microestacas e miniestacas de mamoeiro híbrido uenf/caliman 02** 102 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre ES, 2014.

PASQUAL, M. Meios de cultura. **Curso de Pós-Graduação “lato sensu” (especialização) a distância cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA, 2001.

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.

PEREIRA, J. M. et al., Efeito do alumínio sobre a absorção, o acúmulo e o fracionamento do fósforo em sorgo. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.4, p.961-967, 2008.

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

PIRES, P. P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Ácido indol butírico e ortotropismo na miniestaquia de Araucaria angustifolia. **Revista Árvore**, v. 37, p. 393-399, 2013.

POSCHENRIEDER, C., et al. A glance into aluminium toxicity and resistance in plants. **Sci. Total Environ.**, v.400, p.356-368, 2008.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus, 2008, 44 p. (Documento 61).

RABAIOLLI, S.M. S. **Sementes e miniestaquia em *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. E sementes e micropropagação em *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.) J. MATTOS**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

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.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. [S.l.]: Herbário Barbosa Rodrigues; Secretaria da Agricultura e Abastecimento-DRNR, 1988. 525 p.

RIBEIRO M. A. Q. et al., Aluminum effects on growth photosynthesis, and mineral nutrition of cacao genotypes. **Journal of Plant Nutrition**. 2013. 1161-1179 p.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil - Manual de dendrologia Brasileira**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 294p.

ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. MICROPROPAGAÇÃO DE *Cabralea canjerana*. **Rev. Árvore**, v.31, n.1, p.43-50, 2007.

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.

ROGALSKI, M. et al. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p.293-296, 2003.

ROSSIELLO, R. O. P.; NETTO, J. J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. 432 p.

SAIDELLES, F. L. F. et al. Crescimento inicial de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em três classes de solos, na região central do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 17-25, 2003.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SALVADOR, J. O., MOREIRA, A., MALAVOLTA, E., CABRAL, C. P. Influencia do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.24, n.4, p.787-796, 2000.

SANCHEZ-CHACÓN, C. D.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K.; PACHECO, M. T. **Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1797-1808, 2002.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. C; DENARDI, F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto de macieira 'Seleção 69' tolerante à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*). **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.757-762, 2001.

SANTIN, D. et al., Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por miniestacas juvenis e por sementes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 571-579, 2015.

SANTOS, A.S.A.; MACHADO, I.S.; LEÃO, A.L.; RAMOS, A.A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith): a influência das citocininas sintéticas na cultura de tecido. **Revista de Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.8, n.35, jul./dez. 2005.

SANTOS, G. A. et al.; **Uso da miniestaquia na propagação clonal de *Cedrela fissilis* (Cedro-Rosa)**. In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE

FLORESTAS, 6., 2000, Porto Seguro. Resumos Técnicos... Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera, 2000. p. 203.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; FERREIRA, M. G. R.; ROCHA, J. F.; ESPÍNDULA, M. C.; ALVES, E. A.. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Coffea Canephora*.. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, p. 12-19, 2014.

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.

SASSO, V. M. **Efeito do alumínio sobre parâmetros bioquímicos DE *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini em sistema hidropônico**. 69ª Reunião Anual da SBPC - UFMG - Belo Horizonte/MG. 2017

SILVA, A. T. da; M. Pasqual; J. S. Ishida & L. E. C. Antunes. **Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro***. *Pesq. Agropec. Bras.*, 30(1): 48-53. 1995.

SILVA, C. G. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 2007.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N.; CARVALHO, D. C.; SANTOS, J. D.; GUERRA, E. P. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* *Symphyomyrtus*. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, p. 179-184, 2011.

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

SILVA, K. B. et. al, Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Revista Ciencia Florestal**. Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1282-1295, 2019.

SOARES, G.C.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M.W. **Efeito do Tempo de Exposição do AIB no Meio de Cultura no Enraizamento *in vitro* de Mirtilo**. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 8., 2006, Pelotas. Anais... 2006.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; SCHÜTZ, R.; **Flora arbórea e arborecente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Paulo: Rima/Novo Ambiente. 350p. 2006. SOUZA JUNIOR, E.E.; BARBOZA, S.B.S.C.; SOUZA, L.A.C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Pérola), **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás – MG, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

SOUZA, M. R. **Classificação de madeiras para instrumentos musicais**. Brasília, DF: IBDF: DE:LPF, 1983. 21 p.

SOUZA, C. A. M.; OLIVEIRA, R. B.; MARTINS FILHO, S.; LIMA, J. S. Desenvolvimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubação. **Ciência Florestal**, 16, 243-249, 2006.

SOUZA, F. V. D. *et al.* Aclimatização. *In*: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 131-140.

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

SOUZA, M. C. M. R. *et al.* **Avaliação dos teores de alumínio encontrados em análises de solo do município de Ibiapina – CE**. II Workshop Internacional de Inovações Tecnológicas na irrigação e I Simpósio Brasileiro sobre o uso múltiplo da água; Anais. Fortaleza- CE, 2008.

STORCK L; GARCIA DC; LOPES SJ; ESTEFANEL V. 2011. Experimentação vegetal. Santa Maria: UFSM. 200p.

SUTTER, E. **Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture**. Journal of American Society for Horticultural Science, Washington, v.113, n.2, p.234-238, 1988

TABALDI, L. A. **Avaliação bioquímica-fisiológica de clones de Batata em relação ao alumínio**. Santa Maria, RS, 2008. (Tese de Doutorado). 182p.

TABALDI, L.A. *et al.* Micronutrient concentration in potato clones with distinct physiological sensitivity to Al stress. **Ciência Rural**, v.39, p.379-385, 2009

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. Ed. 6. 2017. 888p.

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

TANAKA, J. *et al.* **Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae)**, Química Nova, v. 28, n. 5, p. 834 – 837, 2005.

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

VANTELGEN, H.J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. **Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants**. Acta Botanica Neerlandica, Amsterdam, v.41, n.4, p.453-459, 1992.

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

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

WENDLING, I. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras.** Colombo: Embrapa Florestas, 2004, 46 p. (Documentos, 91).

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v.45, p.473-486, 2014.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: princípios e técnicas.** 1. ed. v.1. Viçosa: UFV, 2009. 272 p.

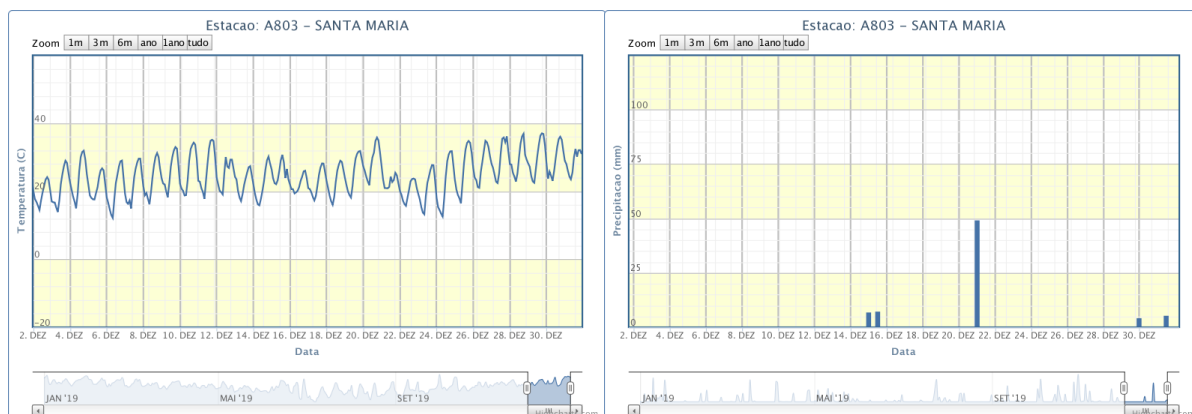
XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L.; **Silvicultura clonal - Princípios e Técnicas.** 2 ed., Viçosa: UFV, 2013. 280p

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiol.**, v.125, p.199-208, 2001.

Yi M, Yi H, Li H, Wu L . Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. **Environmental Toxicology.** 2010. 124-129 p.

8 ANEXOS

Anexo A – Valores médios de temperaturas e precipitação para o município de Santa Maria – RS, durante o mês de dezembro de 2019, período do desempenho inicial a campo das mudas micropropagadas de acoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart & Zucc.) em função do meio de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Rede de dados INMET (2020)