

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

**SEMENTES E MINIESTAQUIA EM *Nectandra megapotamica*
(Spreng.) Mez. E SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO EM
Handroanthus chrysotrichus (MART. ex DC.) J. MATTOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Silvia Machado dos Santos Rabaioli

Santa Maria, RS, Brasil

2014

SEMENTES E MINIESTAQUIA EM *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. E SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO EM *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.) J. MATTOS

Silvia Machado dos Santos Rabaioli

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

Machado dos Santos Rabaiolli, Silvia
SEMENTES E MINIESTAQUIA EM *Nectandra megapotamica*
(Spreng.) Mez. E SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO EM
Handroanthus chrysotrichus (MART. ex DC.) J. MATTOS /
Silvia Machado dos Santos Rabaiolli.-2014.
99 p.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Coorientadora: Maristela Machado Araujo
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Canela-preta 2. Ipê-amarelo 3. Propagação
vegetativa 4. Rizogênese 5. Aclimatização I. Silveira
Reiniger, Lia Rejane II. Machado Araujo, Maristela III.
Título.

©2014

Todos os direitos autorais reservados a Silvia Machado dos Santos Rabaiolli. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por do autor.

Endereço eletrônico: silviaufsm@gmail.com

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**SEMENTES E MINIESTAQUIA EM *Nectandra megapotamica*
(Spreng.) Mez. E SEMENTES E MICROPROPAÇÃO EM
Handroanthus chrysotrichus (MART. ex DC.) J. MATTOS**

Elaborada por
Silvia Machado dos Santos Rabaioli

Como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA



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



Aline Ferreira Paim, Dr^a



Aline Ritter Curti, Dr^a (UFSM)



Candida Elisa Manfio, Dr^a (UNICRUZ)

Santa Maria, 22 de dezembro de 2014.

“Age e verá os resultados.
Quando te esforças, a vida também se
esforça para te ajudar”.

(CHICO XAVIER)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por dar-me forças para vencer os obstáculos.

À minha mãe Nilda (*in memoriam*) que me acompanhou em apenas uma etapa desta caminhada, mas que foi exemplo de mulher batalhadora e mãe amorosa. Esta conquista é pra ti, que nunca mediu esforços para que meus sonhos fossem realizados. Mãe, meu anjo da guarda, obrigada por tudo, continua iluminando o meu caminho!

Ao meu pai, pelo apoio e incentivo.

Ao Joel, pelo amor, carinho e companheirismo; por toda paciência e incentivo em todos os momentos. Teu apoio e companhia foram fundamentais em cada etapa deste trabalho. Obrigada por tudo, meu amor! Aos nossos “filhos de quatro patas” Francisco, Gelatina e Melissa, por todos os momentos de alegria e companheirismo.

Aos meus sogros, Jandir e Theresinha, pelo incentivo, amor e ajuda nas coletas das sementes de canela.

À toda minha família, em especial a vó Ilma pelo carinho e amor.

À minha orientadora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, por todas as oportunidades e confiança em mim depositadas. Agradeço pela amizade, paciência e inúmeros ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de profissional e pessoa íntegra e humana.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, que viabilizou a execução deste trabalho.

À banca por se dispor a avaliar este trabalho.

Às queridas Aline Curti e Aline Paim, pela amizade, por todo o auxílio, pelas valiosas sugestões e conhecimentos transmitidos, e também às amigas Charlene e Karol, pela parceria, pela ajuda, pelas conversas, palavras de incentivo e pelos momentos de alegria, vocês são presentes que a UFSM me deu.

Aos demais colegas do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, obrigada pelo auxílio no desempenho das atividades no laboratório, na casa de vegetação e pelos momentos de descontração e amizade.

Aos amigos e compadres Ana, João e afilhada Maria Luiza, obrigada pela amizade, pelos inúmeros momentos de risadas e parceria.

Às colegas e amigas da 42ª, pelo companheirismo, amizade e momentos de alegria compartilhados.

Às minhas grandes amigas, Simone e Leila, pelo apoio, mesmo quando estive ausente, pela amizade e companheirismo de sempre.

Aos queridos Melissa e Paulo, pela grande amizade, e pela constante ajuda com os assuntos burocráticos.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram para que esse trabalho fosse realizado.

Muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

SEMENTES E MINIESTAQUIA EM *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. E SEMENTES E MICROPROPAÇÃO EM *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.) J. MATTOS

AUTOR: SILVIA MACHADO DOS SANTOS RABAIOLLI

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Santa Maria, 22 de dezembro de 2014.

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos são espécies florestais nativas brasileiras que possuem grande importância econômica, ecológica, silvicultural e ornamental. No entanto, em *N. megapotamica* ocorre perda da viabilidade de suas sementes após a coleta, e em *H. chrysotrichus* geralmente o poder germinativo das sementes decresce acentuadamente após o armazenamento. Em decorrência disso, são necessários estudos que permitam conhecer melhor as características dessas espécies, para obtenção de mudas de boa qualidade, com condições de resistir às condições adversas, sobreviver e crescer em um nível compatível com o economicamente esperado. Desta maneira, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar metodologias que possam contribuir para a propagação vegetativa de *N. megapotamica* e *H. chrysotrichus*. Para *N. megapotamica* foram avaliados aspectos da qualidade física, fisiológica e sanitária de um lote de sementes, avaliando diferentes meios de cultivo, além de analisar a rizogênese *ex vitro* de brotações de *N. megapotamica* expostas a diferentes concentrações de AIB, por meio da técnica de miniestaquia. Em *H. chrysotrichus* foram conduzidos testes de qualidade fisiológica e sanitária de sementes de dois lotes diferentes, armazenadas em refrigerador, em dois períodos distintos. Para a multiplicação, foram testados diferentes antioxidantes (Polivinilpirrolidona ou carvão ativado) no controle da oxidação fenólica em segmentos nodais. Para a rizogênese *in vitro*, brotações micropropagadas foram submetidas a tratamentos em que foram testados meios nutritivos com vermiculita, na presença ou ausência de ágar, bem como a aclimatização *ex vitro* das mudas produzidas. Os resultados obtidos indicaram que as sementes de *N. megapotamica* possuem variações quanto aos aspectos biométricos, alto grau de umidade e associação com microrganismos. Para a rizogênese em brotações via miniestaquia, foi possível promover o enraizamento das miniestacas submetidas à imersão em solução contendo 1000 mg L⁻¹ de AIB, aos 60 dias em casa de vegetação, no entanto esse período de avaliação não foi suficiente e estudos adicionais devem ser realizados. Já para *H. chrysotrichus* observou-se que as sementes apresentam diferenças na sua qualidade fisiológica e sanitária, e perdem a sua viabilidade após armazenamento em refrigerador. O antioxidante carvão ativado mostrou-se mais eficiente em promover o controle da oxidação fenólica em segmentos nodais de *H. chrysotrichus*. O enraizamento *in vitro* das brotações foi bem-sucedido em meio ½WPM, com vermiculita, na ausência de ágar e as mudas apresentaram bom desempenho durante a aclimatização.

Palavras-chave: Canela-preta. Ipê-amarelo. Propagação vegetativa. Rizogênese. Aclimatização.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

SEEDS AND MINICUTTING IN *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. AND SEEDS AND MICROPROPAGATION IN *Handroanthus chrysotrichus* (MART. Ex DC.) J. Mattos

AUTHOR: SILVIA MACHADO DOS SANTOS RABAIOLLI

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Santa Maria, RS, December 22th, 2014.

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez. and *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos are Brazilian native species that have great economic importance, ecological, silvicultural and ornamental. However, there is loss of viability of the seeds after collection, and usually the germination decreases sharply after storage. As a result, studies are needed that allow better understand the nature of these species, to obtain good quality seedlings, with conditions to resist adverse conditions, survive and grow at a level compatible with the expected economically. Thus, the general objective of this study was to evaluate methodologies that can contribute to the propagation of *N. megapotamica* and *H. chrysotrichus*. In *N. megapotamica* were evaluated the physical, physiological and sanitary quality of a seed lot, assessing different culture media, and analyzing the ex vitro rooting of shoots of *N. megapotamica* exposed to different concentrations of IBA, through minicutting. In *H. chrysotrichus* were conducted in physiological and health quality tests from two different seed lots, stored in a refrigerator at different ages. For multiplication, different antioxidants were tested (Polyvinylpyrrolidone – PVP and activated charcoal) in the control of phenolic oxidation in nodal segments. For rooting in vitro micropropagated shoots were subjected to treatments which have been tested in media containing vermiculite in the presence or absence of agar, and the acclimatization of the plants produced. The results indicated that the seeds of *N. megapotamica* showed variations as biometric aspects, high humidity and association with microorganisms. For rooting, it was possible to promote the rooting of cuttings in solution of 1000 mg L⁻¹ IBA, 60 days in a greenhouse, however this evaluation was not enough and additional studies will be conducted. As for *H. chrysotrichus* was observed that the seeds differ in their physiological and sanitary quality, and lose their viability after storage in a refrigerator. The antioxidant activated charcoal was more effective on the control of phenolic oxidation in nodal segments of *H. chrysotrichus*. The medium ½WPM with vermiculite, in the absence of agar favored the in vitro rooting of shoots and seedlings performed well during acclimatization.

Keywords: Canela-preta. Ipê-amarelo. Vegetative propagation. Rhizogenesis. Acclimatization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aspecto do fuste, folhas e frutos característicos da espécie *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 18
- Figura 2 - Aspecto do fuste, folhas, flores, frutos e sementes característicos da espécie *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 20
- Figura 3 - Representação do mapa com as áreas de coleta de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 30
- Figura 4 - Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento, largura e espessura de um lote sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. da produção de 2014, avaliado em fevereiro do mesmo ano. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 39
- Figura 5 - Sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. avaliadas no teste de sanidade pelo método do 'blotter test'. Em A) aspecto geral das sementes com contaminação fúngica; em B) semente com contaminação fúngica onde pode ser observado o gênero *Fusarium* sp., em cor clara. Barra =1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 42
- Figura 6 -- Aspectos das brotações obtidas pela germinação *in vitro* de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: A) plântula obtida em meio nutritivo MS, aos 20 dias de cultivo; B) e C) brotação obtida pela germinação *in vitro* aos 45 dias de cultivo. Barra =1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 46
- Figura 7 - Miniestaquia em *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das concentrações de soluções à base de ácido 3-indolbutírico – AIB em que foram imersas por 10s, ao longo de 60 dias de avaliações. A) Sobrevivência média (%); B) Formação de raízes (%); C) Número de raízes; e D) Formação de calos (%). Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 48
- Figura 8 - Número médio de folhas formadas em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, em função da interação entre os diferentes antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado) e o período de avaliação (7, 14, 21 ou 28 dias), independentemente da idade dos explantes (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 67
- Figura 9 - Porcentagem média de oxidação fenólica em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, em função da interação entre os diferentes antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado) e o período de avaliação (7, 14, 21 ou 28 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014. 69

- Figura 10 - A) Brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), aos 28 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM e adição de 1 gL^{-1} de carvão ativado apresentando sinais de clorose e pouco desenvolvimento *in vitro*; B) Explante com aspecto clorótico. Barra=1cm. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....69
- Figura 11 - Rizogênese *in vitro* em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*. A) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita e 7 g L^{-1} ágar; B) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita e $3,5 \text{ gL}^{-1}$ ágar; e C) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita na ausência de ágar. Barra=1cm. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.74
- Figura 12 - Rizogênese *in vitro* em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*. A) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita e 7 g L^{-1} ágar; B) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita e $3,5 \text{ gL}^{-1}$ ágar; e C) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita na ausência de ágar. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Comprimento, largura e espessura (mm) de um lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. da produção de 2014, avaliado em fevereiro do mesmo ano. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. .38
- Tabela 2 - Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados no lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. da produção de 2014, avaliadas no teste de sanidade pelo método do 'blotter test' em fevereiro do mesmo ano. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.41
- Tabela 3 - Médias de porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. de um lote da produção de 2014, após 45 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2014. ..45
- Tabela 4 - Médias de formação de raízes (%) em miniestacas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função do período de avaliação, independentemente da concentração de ácido indolbutírico - AIB (0; 1000; 2000 ou 4000 mg L⁻¹). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.48
- Tabela 5 - Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, avaliadas no teste de sanidade, em função da interação entre os dois períodos de armazenamento e os lotes 2011 ou 2013. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.59
- Tabela 6 - Médias de porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, de dois lotes distintos, em dois períodos de armazenamento em refrigerador. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.....64
- Tabela 7 - Sobrevivência média (%) de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos, aos 28 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), em função dos diferentes antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado), independentemente do período de avaliação e idade dos explantes. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.66
- Tabela 8 - Oxidação fenólica (%) de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart ex DC.) J. Mattos, aos 28 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), em função da interação entre antioxidantes (polivinilpirrolidona, carvão ativado ou ácido ascórbico) e idade dos explantes (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.71
- Tabela 9 - Oxidação fenólica (%) de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart ex DC.) J. Mattos, aos 28 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), em função da interação entre antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado) e idade dos explantes (30 ou 60 dias).Santa Maria, RS, UFSM, 2014.73

- Tabela 10 - Médias de porcentagem de sobrevivência, número de folhas e porcentagem de clorose foliar em mudas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos, 7 dias após a retirada da cobertura dos recipientes e 14 dias de aclimatização *ex vitro* em sala de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....76
- Tabela 11 - Número de folhas em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, aos 28 dias de aclimatização em casa de vegetação, em função das concentrações de ágar acrescidas ao meio, combinadas com 3,8 g de vermiculita provenientes do ensaio de rizogênese *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.77

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Descrição das espécies	18
2.1.1 <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	18
2.1.2 <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	20
2.2 Qualidade de sementes	21
2.3 Propagação vegetativa em espécies florestais	25
3 CAPITULO 1	29
QUALIDADE DE SEMENTES E MINIESTAQUIA EM <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
3.3 Material e Métodos	30
3.3.1 Determinação do grau de umidade do lote de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	29
3.3.2 Aspecto biométrico do lote de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	37
3.3.3 Qualidade sanitária do lote de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	32
3.3.4 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	33
3.3.5 Miniestaquia - Enraizamento de miniestacas de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. em função da concentração de Ácido 3-Indolbutírico (AIB)	35
3.4 Resultados e discussões	36
3.4.1 Determinação do grau de umidade do lote de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	36
3.4.2 Aspecto biométrico do lote de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	37
3.4.3 Qualidade sanitária do lote de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	41
3.4.4 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	44
3.4.5 Miniestaquia – Efeito da concentração de Ácido 3-Indol Butírico (AIB) sobre o enraizamento de miniestacas de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.	47
3.5 Conclusões	51
4 CAPITULO 2	52

QUALIDADE DE SEMENTES, MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO EX VITRO EM <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (MART. ex DC) J. MATTOS	52
4.1 Objetivo geral	52
4.2 Objetivos específicos	52
4.3 Material e métodos	53
4.3.1 Análise da qualidade sanitária de dois lotes de sementes de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento	53
4.3.2 Análise da qualidade fisiológica de dois lotes de sementes de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento	54
4.3.3 Efeito de antioxidantes no controle da oxidação fenólica no estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	55
4.3.4 Efeito do ágar na rizogênese <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	56
4.3.5 Aclimatização <i>ex vitro</i> de plantas micropropagadas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	57
4.3.6 Análises estatísticas	57
4.4 Resultados e discussões	58
4.4.1 Análise da qualidade sanitária de dois lotes de sementes de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento	58
4.4.2 Análise da qualidade fisiológica de dois lotes de sementes de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento	63
4.4.3 Efeito de antioxidantes no controle da oxidação fenólica no estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	65
4.4.4 Efeito do ágar na rizogênese <i>in vitro</i> de brotações de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	72
4.4.5 Aclimatização <i>ex vitro</i> de plantas micropropagadas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) J. Mattos	76
4.5 Conclusões	79
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

INTRODUÇÃO

A perda da biodiversidade na Terra tem consequências sobre a qualidade de vida das pessoas e sobre a economia mundial. Cerca de 40% dos fármacos prescritos em todo o mundo possuem ingredientes ativos que são extraídos ou originados de plantas e animais (BEGON, 2007). Desde o período colonial brasileiro, a Mata Atlântica sofre um intenso processo de destruição pela utilização irracional dos recursos, sendo que os principais ciclos econômicos, desde a exploração do pau-brasil, a mineração do ouro, a criação de gado, as plantações de cana-de-açúcar e café, a exportação de produtos madeireiros e não madeireiros foram, aos poucos, reduzindo e fragmentando as florestas naturais (CAMPANILI; SCHAFFER, 2010). Em decorrência disso, as populações e fragmentos florestais restantes perdem qualidade genética – pela perda de genes e alelos, aumento da homoziguidade e da depressão por endogamia, a qual têm consequências na redução da qualidade fisiológica, física e sanitária das sementes produzidas.

Nesse contexto, a perda da viabilidade das sementes pouco tempo após sua coleta, é frequentemente observada em muitas espécies nativas, como em *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (canela-preta). Em *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo) o curto período de viabilidade das sementes durante o armazenamento e sua floração anual são, também, fatores que podem dificultar a produção de mudas desta espécie. Em vista disso, inúmeros trabalhos com espécies florestais nativas vêm sendo desenvolvidos, com a finalidade de solucionar o entrave relacionado à propagação pela via seminal e produzir mudas adaptadas ao ambiente e de alta qualidade para repor os recursos perdidos. Neste sentido, a utilização de técnicas de propagação vegetativa permite um aumento na produtividade de mudas, mantendo as características favoráveis dos indivíduos selecionados (XAVIER et al., 2009).

Para *Nectandra megapotamica* não foram observados relatos na literatura de estudos relacionados ao melhoramento genético e produção de mudas de qualidade. Em relação a *Handroanthus chrysotrichus*, por outro lado, já foram realizados, pelo nosso Grupo de Pesquisa, diversos ensaios, sendo obtidas informações relevantes relacionadas ao estabelecimento, multiplicação e rizogênese *in vitro*, bem como à anatomia foliar dessa espécie (PAIM, 2011; PAIM, 2014).

Entretanto, devem ser realizados estudos complementares visando otimizar os resultados obtidos. Considerado o exposto, o presente trabalho, realizado com essas duas espécies florestais, está organizado em dois capítulos, divididos de acordo com a espécie estudada, a saber:

- No capítulo I, foi avaliada a qualidade de sementes de *Nectandra megapotamica* e a germinação *in vitro* em diferentes substratos. Adicionalmente, devido às dificuldades em obter resultados referentes à micropropagação dessa espécie, foi conduzido um ensaio referente à rizogênese *ex vitro* de brotações, utilizando-se a técnica de miniestaquia.

- No capítulo II, foram avaliadas a qualidade fisiológica e sanitária de dois lotes de sementes de *Handroanthus chrysotrichus*, submetidas a dois períodos de armazenamento. Igualmente, foi testado o efeito de diferentes antioxidantes sobre a oxidação fenólica de segmentos nodais, com duas idades, cultivados *in vitro*. Também foi testado o efeito de diferentes concentrações de ágar sobre a rizogênese *in vitro* de plantas de *H. chrysotrichus*, assim como a posterior aclimatização das mudas obtidas em casa de vegetação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição das espécies

2.1.1 *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Integrante da família Lauraceae, *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., é conhecida popularmente como canela-preta, canela-imbuia ou canela fedorenta. É uma espécie arbórea, nativa da Floresta Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecídua e Decídua, de ocorrência natural nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (MARCHIORI, 1997) do Brasil.



Figura 1 – Aspecto do fuste, folhas e frutos característicos da espécie *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

É classificada como uma espécie do grupo sucessional secundário (LORENZI, 2008), inicial ou tardio, segundo diferentes autores. A canela-preta é uma árvore perenefoliada de grande porte, que pode atingir de 15 a 30 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro à altura do peito, com tronco, geralmente, um pouco tortuoso. A casca, de cor escura com escamas, desprende-se em placas deixando cicatrizes muito características. Apresenta folhas alternas, simples, glabras, medindo de 7 a 15 cm de comprimento por 2 a 4 cm de largura, sem domácias e com cheiro forte. As flores aparecem nos meses de agosto a outubro e o amadurecimento dos frutos ocorre de janeiro até abril (MARCHIORI, 1997; REITZ et al., 1989), ocorrendo dispersão ornitócora. Os frutos são do tipo drupa monospérmica escura, forma ovóide, superfície lisa com finas pontuações areoladas de cor amarelo-creme (KUNIYOSHI, 1983) (Figura 1). A semente tem endocarpo oblongo-ovóide, cor castanha com superfície finamente pulverulenta (KUNIYOSHI, 1983). Pode apresentar até 3,5 mil sementes por quilograma.

Ratificando sugestões anteriores, de que a viabilidade das sementes após a colheita é inferior a 90 dias (LORENZI, 2008), estudo realizado posteriormente concluiu que a espécie apresenta características recalcitrantes (HIRANO, 2004), corroborando resultados obtidos por Carvalho (1994), Carvalho (2000) e Carvalho (2003). Em decorrência dessa característica de recalcitrância, a conservação em câmara fria e úmida foi superior àquela efetuada em refrigerador e em ambiente natural. Enquanto na câmara fria a viabilidade se manteve até os 216 dias, em ambiente natural e refrigerador, se perdeu a partir dos 31 dias (HIRANO, 2004).

A madeira é moderadamente pesada e de fácil trabalhabilidade, adequada para construção civil, esquadrias e tábuas em geral (LORENZI, 1998). Por suas excelentes características xilotecnológicas, poderia ter variadas aplicações, no entanto, essa madeira tem sido desprezada devido ao odor desagradável, que pode retornar quando exposta a locais úmidos (REITZ et al., 1989).

A espécie é utilizada na medicina tradicional por apresentar finalidades terapêuticas, tais como analgésica, antireumática e antiinflamatória (GARCEZ et al., 2009). Além disso, os óleos essenciais da espécie indicam potencial farmacológico, pois possuem atividade microbiana contra *Staphylococcus aureus*, atividade antiinflamatória e antitumoral (APEL et al., 2006). Adicionalmente, ligninas, fenilpropanóides e alcaloides foram relatados como componentes de *Nectandra megapotamica*, alguns dos quais têm atividade contra *Trypanosoma cruzi*, o agente

etiológico da doença de Chagas (FILHO et al., 2008). Consideradas as propriedades mencionadas, a espécie têm grande importância econômica, justificando a realização de estudos relacionados a sua propagação.

2.1.2 *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC.) J. Mattos é uma espécie arbórea integrante da família Bignoniaceae, conhecida popularmente como ipê-amarelo, ipê-amarelo cascudo, ipê-do-morro, entre outros. Ocorre naturalmente do Nordeste ao Sul do Brasil. É uma planta decídua, heliófita, característica de formações abertas da floresta pluvial do alto da encosta atlântica (CARVALHO, 2006; LORENZI, 2008).



Figura 2 - Aspecto do fuste, folhas, flores, frutos e sementes característicos da espécie *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

A espécie pode atingir uma altura entre 4 e 10 m. É considerada caducifólia, floresce no período de julho a outubro e os frutos amadurecem entre os meses de outubro a dezembro (LORENZI, 2008) (Figura 2).

A exuberância durante o florescimento faz com que a espécie seja utilizada na arborização de ruas, praças, parques e avenidas (LORENZI, 2008); por sua beleza, é considerada a flor-símbolo do Brasil (RIZZINI, 1971). Além disso, apresenta madeira moderadamente pesada, de grande durabilidade, sendo usada amplamente na construção civil, carpintaria, marcenaria, laminação e indústria moveleira, produzindo, também, corante para tingir seda e algodão. Adicionalmente, a espécie é recomendada para projetos de recuperação de áreas degradadas, de matas ciliares e demais áreas de preservação permanente e reflorestamentos com finalidades comerciais (CARVALHO, 2006; LORENZI, 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

As características ecológicas da espécie tornam seu estudo importante devido ao seu amplo aproveitamento econômico, ornamental e medicinal, entre outros (OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, as espécies desse gênero produzem grande quantidade de sementes (LORENZI, 2008), porém, podem perder a viabilidade durante o armazenamento, apresentando problemas de germinação e conservação (OLIVEIRA et al., 2005). Igualmente, há anos em que ocorre pouca produção de sementes (SOUZA et al., 2005).

Levando-se em conta essas limitações, justificam-se estudos adicionais sobre a espécie, incluindo-se alternativas de multiplicação *in vitro* para a obtenção de mudas de alta qualidade.

2.2 Qualidade de sementes

A semente deve apresentar características que propiciem a qualidade do produto final, que é a produção de mudas fortes e saudáveis. Uma semente de boa qualidade é essencial para tornar mais eficientes processos, como o armazenamento, possibilitando maior adaptação as condições de clima e solo na produção de mudas com características superiores. A qualidade da semente está relacionada à sua natureza genética, física, fisiológica e sanitária, e é fundamental para qualquer programa de produção de mudas voltado tanto para plantios

comerciais, como para restauração de áreas degradadas e conservação dos recursos genéticos (OLIVEIRA, 2012).

Para tanto, é fundamental que as sementes sejam submetidas a um estudo de suas qualidades após a coleta e beneficiamento, possibilitando um maior conhecimento do potencial de desenvolvimento das futuras mudas (MEDEIROS; NOGUEIRA, 2006; OLIVEIRA, 2012). Vários testes podem ser utilizados para analisar a qualidade de sementes, os quais devem ser baseados em técnicas padronizadas pelas Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009) e pelas Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (BRASIL, 2013).

A qualidade fisiológica das sementes engloba atributos como germinação, vigor, longevidade, entre outros, os quais indicam sua capacidade de desempenhar funções vitais. O teste de germinação fornece dados que expressam a qualidade fisiológica de um determinado lote de sementes para fins de semeadura ou armazenamento, e permite, também, estabelecer comparação entre diferentes lotes, bem como, as condições adequadas em diferentes períodos de armazenamento (FIGLIOLIA, 1995; OLIVEIRA, 2012). O índice de velocidade de germinação (IVG) determina o vigor relativo do lote, avaliando a velocidade de germinação de sementes no teste de germinação (NAKAGAWA, 1994), ou seja, lotes que apresentam maior velocidade de germinação de sementes são mais vigorosos, pois existe uma relação direta entre a velocidade de germinação e o vigor de sementes (MAGUIRE, 1962).

O desempenho fisiológico das sementes durante o armazenamento é um dos principais aspectos determinantes de seu êxito (HONG et al., 1996), haja vista que, sementes de diferentes espécies exigem condições especiais para a sua conservação. Em uma classificação inicial, as sementes foram divididas em dois grupos em relação à tolerância à secagem e a temperaturas baixas: sementes ortodoxas e recalcitrantes (ROBERTS, 1973). Aquelas consideradas ortodoxas, toleram a secagem a baixos níveis de umidade e temperaturas no armazenamento, podendo ser secas até cerca de 5% de umidade, acondicionadas em embalagem hermética e submetidas à temperatura de -180°C , o que permite a conservação da sua viabilidade por longo prazo (IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources, citado pela FAO, 1993). Já as sementes recalcitrantes não sobrevivem à secagem a baixos níveis de umidade e não podem ser armazenadas por longo prazo (ROBERTS, 1973). Um comportamento intermediário entre essas duas

classes de sementes foi, posteriormente, proposto (ELLIS et al.,1990), e essas sementes, denominadas intermediárias, toleram a desidratação somente até o teor de água entre 7% e 10% e não toleram temperaturas baixas por período prolongado.

Adicionalmente, outra classificação (BONNER, 1990) foi elaborada especialmente para as sementes florestais, a qual incluiu uma subdivisão nos dois grupos iniciais, a seguir descrita: 1) ortodoxas verdadeiras: sementes que toleram a secagem abaixo de 10% de umidade e, quando submetidas a temperaturas abaixo de zero, podem ser armazenadas por períodos relativamente longos, ou seja, durante 50 anos ou mais. Como exemplos desta classe podem ser citadas espécies temperadas como aquelas dos gêneros *Abies*, *Larix*, e *Pinus*, dentre outras, e espécies tropicais, como aquelas dos gêneros *Acacia*, *Eucalyptus* e *Casuarina*, dentre outras; 2) sub-ortodoxas: são sementes que podem ser armazenadas sob as mesmas condições que àquelas do grupo anterior, mas, no máximo, por seis anos. São observadas, neste grupo, sementes com alto nível de lipídios, como aquelas de *Juglans nigra* e sementes pequenas com tegumento fino, como aquelas das espécies dos gêneros *Salix* e *Populus*; 3) temperadas recalcitrantes: são sementes sensíveis à dessecação a baixos níveis de umidade, mas, que podem ser armazenadas por vários anos, em temperaturas próximas do congelamento. Neste grupo estão classificadas sementes de *Acer saccharinum*, *Quercus* spp. e *Aesculus hippocastanum*, por exemplo. Sementes secas até o grau de umidade em torno de 30% a 50%, armazenadas em ambiente com alta umidade relativa e com troca de gases podem ser conservadas durante 12 a 30 meses; e, por fim, 4) tropicais-recalcitrantes: são as sementes que, igualmente, devem ser armazenadas em condições de alta umidade relativa e com troca de gases, porém, apresentam maior sensibilidade a baixas temperaturas e à dessecação. Constituem exemplos desta classe: sementes de *Theobroma cacao* e *Hevea brasiliensis* (CHIN, 1989) e de *Nectandra membranaceae*, espécie de Lauraceae (GONZÁLEZ, 1991).

Há que se esclarecer que as classificações anteriormente mencionadas levam em consideração o desempenho das sementes quando submetidas a temperaturas e umidade relativa baixas, principalmente no que diz respeito à temperatura, cuja avaliação deve ser efetuada em condições próximas ao congelamento. Adicionalmente, há inferências de associações entre o desempenho das sementes no armazenamento e o grupo ecológico a que a espécie pertence. Nesse sentido, foram propostos dois grupos, sendo o primeiro formado pelas pioneiras e o segundo,

pelas climácicas, sendo estas, ainda, subdivididas em exigentes em luz ou tolerantes à sombra para um adequado crescimento de suas plântulas (SWAINE; WHITMORE, 1988). As sementes de espécies pioneiras, que se regeneram por meio de banco de sementes, necessitam de luminosidade intensa para a germinação e, normalmente, possuem dormência e alta longevidade, podendo ser armazenadas por longo prazo (KAGEYAMA; VIANA, 1991), correspondendo ao comportamento ortodoxo de armazenamento (ROBERTS, 1973). Por sua vez, as climácicas, cujas sementes não necessitam de luz direta para a germinação e o crescimento da plântula, apresentam reduzida longevidade e regeneram-se, principalmente, por meio de banco de plântulas. Dentro deste grupo podem ser verificadas sementes recalcitrantes que são ricas em lipídios (KAGEYAMA; VIANA, 1991). Espécies clímax, normalmente, apresentam comportamento sazonal na produção de sementes (BONNER, 1990), o que dificulta a sua oferta regular para programas florestais e as vulnerabiliza em relação às ações antrópicas, tornando-as, inclusive, mais suscetíveis à erosão genética e, eventualmente, à extinção. Esse é justamente o caso de uma espécie da família Lauraceae, *Nectandra grandiflora* (SEMA, 2002).

Sementes de cinco espécies florestais da família Lauraceae (*Nectandra grandiflora*, *Nectandra lanceolata*, *Nectandra oppositifolia*, *Ocotea corymbosa* e *Ocotea pulchella*) foram submetidas à avaliação da germinação e do grau de umidade antes e após a secagem artificial. As sementes apresentaram comportamento recalcitrante, devido à sensibilidade à secagem (CARVALHO, 2006)

A qualidade física das sementes pode ser avaliada, por sua vez, por atributos como teor de umidade, tamanho e peso de mil sementes. A determinação do grau de umidade tem como objetivo apontar o conteúdo de água presente na semente, a fim de estabelecer parâmetros adequados para a manutenção da qualidade fisiológica, contribuindo para longevidade no armazenamento das sementes (BONNER, 1991; BRASIL, 2009; OLIVEIRA, 2012). A biometria de frutos e sementes pode fornecer informações importantes que ajudam a detectar a presença de variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie, bem como, as relações entre esta variabilidade e os fatores ambientais (GONÇALVES, et al., 2013). O peso de mil sementes é uma medida de qualidade que possui diferentes finalidades, destacando-se a comparação da qualidade de diferentes lotes de sementes, e também, o cálculo da densidade de semeadura (BRASIL, 2009).

Já a qualidade sanitária das sementes pode ser avaliada por meio do teste de sanidade, o qual pode indicar a presença, junto das sementes, de microrganismos patogênicos ou não, os quais têm potencialidade para afetar a germinação das sementes, e também, o desempenho das plantas e sua produtividade (OLIVEIRA, 2012).

Diante do exposto, pode-se afirmar que a avaliação dos diversos atributos de qualidade de um lote de sementes é de grande importância para a obtenção de resultados satisfatórios na produção de mudas, permitindo que se estabeleça uma população de plantas adaptadas às condições de campo (OLIVEIRA, 2012).

2.3 Propagação vegetativa em espécies florestais

As espécies florestais possuem grande importância, haja vista realizarem serviços ambientais como, por exemplo, a proteção dos recursos hídricos, dentre outros, e por produzirem produtos madeireiros e não madeireiros, como matéria-prima para a construção, biomassa para polpa celulósica e papel, energia industrial, substâncias e moléculas para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003). Em decorrência disso, os programas de melhoramento de espécies florestais vêm selecionando populações e indivíduos portadores de características de interesse, como maior produtividade, tolerância a estresses abióticos, tolerância a herbicidas, resistência a pragas e doenças, melhoria na qualidade fotossintética (DI CIERO, 2014).

A propagação vegetativa em espécies florestais, associada a programas de melhoramento genético, permite um aumento na produtividade em menor espaço de tempo e maior uniformidade das plantações, gerando madeira de qualidade e homogênea, pela multiplicação de plantas selecionadas (ALFENAS et al., 2009). Isso se verifica porque a propagação vegetativa captura o componente genético total sendo possível a obtenção de maiores ganhos dentro de uma mesma geração comparada à reprodução sexuada. Por outro lado, na reprodução sexuada, consegue-se fixar apenas o componente genético aditivo de superioridade (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Dentre as principais técnicas de propagação vegetativa de plantas, podem-se destacar a estaquia, a microestaquia, a miniestaquia, e a propagação por meio de cultura de tecidos (micropropagação e embriogênese somática) (WENDLING et al., 2002). A cultura de tecidos é um dos métodos com maior relevância na propagação vegetativa por necessitar de menor espaço físico e por não depender das condições climáticas. No melhoramento de espécies arbóreas, em especial, pode ser empregada na conservação *in vitro* de germoplasma, na aceleração dos programas de melhoramento, na multiplicação de clones superiores visando à produção de mudas, no rejuvenescimento de clones selecionados na fase adulta; e, também, apresentar potencialidade para a obtenção de sementes sintéticas, dentre outros (XAVIER et al., 2009).

Por meio da cultura de tecidos, fragmentos de tecidos vegetais vivos compostos por células individuais, tecidos ou órgãos, denominados “explantes”, são retirados de plantas previamente selecionadas e cultivados em meio nutritivo definido, sob condições assépticas (SERAFINI et al., 2001). Para que as plantas se desenvolvam no cultivo *in vitro*, utilizam-se meios nutritivos determinados, com formulações que atendem às necessidades de cada vegetal e, quando necessário, podem ser usados reguladores de crescimento (DODDS; ROBERTS, 1995). Dessa forma, os meios de cultura apresentam, em sua composição, condições para que as plantas se desenvolvam, como energia proveniente da luz, água, elementos minerais, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O sucesso de um sistema de micropropagação envolve vários fatores, dentre os quais se podem citar: genótipos, tipos de explantes, componentes do meio nutritivo, fitorreguladores e ambientes de cultivo. Além disso, outras variáveis podem afetar o processo de micropropagação das espécies florestais nativas, como a recalitrância ao cultivo *in vitro*, a contaminação por micro-organismos, a oxidação fenólica, a senescência foliar, entre outros (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PAIM, 2014).

A micropropagação em diversas espécies florestais nativas dos biomas brasileiros Mata Atlântica e Pampa tem sido objeto de investigação em diversos trabalhos realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa, podendo-se citar *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) (LEÓN, 2014; FLÔRES et al., 2011), *Peltophorum dubium* (canafístula) (CURTI; REINIGER, 2014; CURTI 2014; BASSAN et al., 2006),

Eugenia involucrata (cerejeira-do-mato) (GOLLE et al, 2013), *Hadroanthus chrysotrichus* (ipê-amarelo) (PAIM, 2014), entre outros.

Outra metodologia importante de propagação de espécies florestais é a miniestaquia, que foi desenvolvida com a finalidade de aprimorar a estaquia convencional, buscando-se diminuir algumas dificuldades encontradas no processo de produção de mudas de certas espécies, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento do sistema radicular e ao estabelecimento das mudas a campo. É uma técnica que visa a maximização da qualidade e uniformidade da futura árvore (TEIXEIRA, 2001). Em programas de melhoramento genético, a miniestaquia surge como uma ferramenta especialmente útil para manter a constituição de um genótipo selecionado ou de indivíduos superiores identificados nas populações (SANTOS et al., 2011). Sua execução consiste na superação da dominância apical pela poda da planta matriz, a qual emite novas brotações denominadas miniestacas, as quais são utilizadas para o enraizamento e formação de novas mudas, em função da época do ano, condições estruturais, desenvolvimento da espécie e condições nutricionais (WENDLING et al., 2002). A propagação vegetativa via miniestaquia tem sido amplamente utilizada por empresas florestais para a produção comercial de mudas.

O uso das diversas técnicas de propagação vegetativa tem contribuído significativamente na ampliação da porcentagem de propágulos enraizados, bem como na melhoria da qualidade do sistema radicular, tornando satisfatório o desenvolvimento das mudas a campo (ALFENAS et al., 2009). A escolha da técnica a ser utilizada varia de acordo com a espécie envolvida, a época do ano, o tipo e quantidade de material disponível e das condições ambientais, entre outros fatores (WENDLING et al., 2002).

O melhoramento de espécies florestais nativas, por meio da utilização dessas técnicas vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Entretanto, existem etapas consideradas como entraves da técnica, os quais necessitam de estudos adicionais. Dentre os principais obstáculos podem-se destacar a formação e o desenvolvimento de raízes e a aclimatização das mudas produzidas (LEÓN, 2014).

A formação de raízes é um dos fatores limitantes do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, sendo assim, o uso de auxinas, bem como, alterações na composição de alguns componentes dos meios nutritivos, podem auxiliar na obtenção de resultados mais promissores (CURTI; REINIGER, 2014). Nesse sentido, embora o ágar seja o agente solidificante mais utilizado para rizogênese *in*

in vitro, tem-se observado que o sistema radicular formado em brotações cultivadas na presença desse agente é fraco e não possui pelos absorventes (ROCHA et al., 2006), acarretando em baixa sobrevivência das plantas após o transplante para casa de vegetação (PASQUAL et al., 2000). Além disto, dentre os componentes do meio nutritivo, o ágar é a substância de maior custo (LEITE, 1995).

O uso de substratos alternativos para o enraizamento, com a finalidade de promover um sistema radicular mais apropriado para a adaptação das mudas em casa de vegetação já foi testado em diversos trabalhos (DAMIANI; SCHUCH, 2009; HOFFMANN et al., 2001; PASQUAL et al., 2000; ROCHA et al., 2006; VIEIRA et al., 2007). Dessa forma, a utilização de vermiculita, perlita ou espumas de poliuretano embebidas em meio líquido podem ser alternativas mais baratas e proporcionar melhores resultados do que o uso do ágar (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A aclimatização e rustificação das mudas produzidas *in vitro* é a última etapa do processo, a sobrevivência e desenvolvimento de plantas nessa fase podem ser uma barreira em diferentes espécies. A transferência do ambiente protegido para o ambiente natural e com reduzida umidade tem levado à perda de mudas, baixa taxa de crescimento e período prolongado na obtenção de plantas completamente adaptadas (ANTONIAZZI et al., 2013).

O sucesso da aclimatização é dependente do controle de fatores, como temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (OLIVEIRA et al., 2013). Em estudo realizado com microestacas de *Cabralea canjerana* ao aclimatizá-las em casa de vegetação durante 30 dias, com temperatura e umidade relativa controladas, foram observados 90% de sobrevivência das mudas (ROCHA et al., 2007).

Nesta fase, as plantas passam de uma condição asséptica e heterotrófica, para uma condição autotrófica e necessitam desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática (DIAZ-PEREZ et al., 1995), precisam rapidamente incrementar a absorção de sais (XAVIER, et al., 2009) e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO₂ (VANTELGEN et al., 1992). As plantas devem ser expostas gradualmente à redução na umidade do ar e temperatura instável, a fim de que possam sobreviver e se desenvolver sem complicações em condições naturais de campo (SOUZA JÚNIOR et al. 2001). Em decorrência disso, esse processo deve ser realizado em etapas e cuidadosamente, para evitar a perda de mudas.

3 CAPITULO 1

QUALIDADE DE SEMENTES E MINIESTAQUIA EM *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar aspectos da qualidade física, fisiológica e sanitária de um lote de sementes e o efeito do Ácido 3-Indolbutírico (AIB) sobre o enraizamento de miniestacas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. .

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar um lote de sementes de *N. megapotamica* em relação a alguns aspectos da qualidade física.
- Analisar a qualidade sanitária de um lote de sementes de *N. megapotamica*.
- Avaliar e selecionar o meio de cultivo mais eficiente para a germinação *in vitro* de sementes de *N. megapotamica*.
- Avaliar o efeito de do Ácido 3-Indolbutírico (AIB) sobre o enraizamento de miniestacas de *N. megapotamica*.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Determinação do grau de umidade do lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Para a realização das análises de qualidade de sementes e germinação *in vitro* foram coletados frutos maduros em árvores de *Nectandra megapotamica* em desenvolvimento em áreas de ocorrência natural de florestas, no Nordeste do estado de Rio Grande do Sul, mais especificamente nos municípios de Arvorezinha, Ilópolis e Putinga (Figura 3).

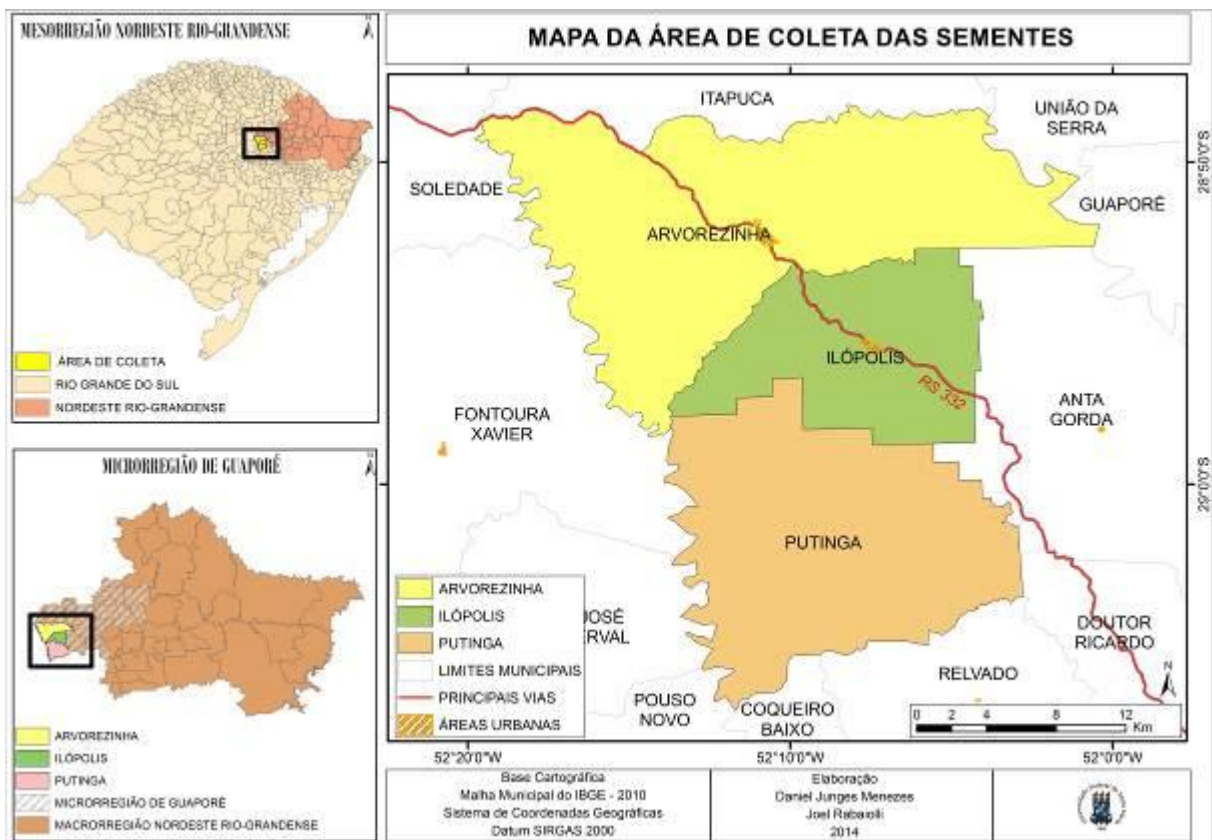


Figura 3 - Representação do mapa com as áreas de coleta de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Os frutos foram coletados nas árvores com o auxílio de um podão, em diversos momentos, durante o mês de janeiro de 2014, que consistiu na época de

dispersão das sementes, quando já eram observadas quedas espontâneas. Os frutos possuíam coloração marrom e seus endocarpos não estavam muito desidratados na época de coleta, o que se intensificou 30 dias depois.

Os frutos, contendo as sementes, foram armazenados em sacos plásticos devidamente identificados e, no início de fevereiro de 2014, foram armazenados em temperatura ambiente, acondicionados sobre folhas de jornal, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os frutos continham o endocarpo firmemente aderido à superfície do tegumento e, em decorrência da dificuldade de remoção, foram usados os frutos inteiros, os quais serão denominados doravante “sementes”. Adicionalmente, foi efetuada uma triagem no material, haja vista que, aproximadamente, 40% das sementes estavam com sinais de deterioração, provavelmente ocasionada por larvas de insetos. Como consequência, o número amostral foi diminuído, e, por isso, alguns experimentos têm um número reduzido de repetições.

Após esse procedimento, as sementes foram colocadas em sacos de papel Kraft e armazenadas em refrigerador à temperatura de 8-10°C, aproximadamente, até o momento da utilização nos experimentos descritos na sequência, os quais foram realizados em: 07 e 12 de fevereiro de 2014 – biometria e umidade; sanidade – 12 de fevereiro; e germinação *in vitro*: 17 de março, correspondendo a um período de 30 a 60 dias de armazenamento.

O grau de umidade foi determinado conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com algumas modificações, devido ao número reduzido de sementes sem danos obtidas na coleta. Foi empregado o método da estufa a 105±3°C por 24 h utilizando-se duas repetições de 1,0 g de sementes. Como recipiente foi utilizado papel alumínio, medindo 20 cm de comprimento por 15 cm de largura e com massa de 1,358 g.

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

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

Onde:

P = massa inicial, constituída pela massa do recipiente mais o massa da semente úmida;

p = massa final, constituída pela massa do recipiente mais a massa da semente seca;

t = tara, massa do recipiente.

Os resultados foram expressos em porcentagens, com base na massa das sementes úmidas.

3.3.2 Aspecto biométrico do lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Para as avaliações biométricas, foram utilizadas 100 sementes, medindo-se o comprimento, a largura e a espessura, com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. O comprimento foi medido da base até o ápice e a largura e espessura, medidas na linha mediana das sementes. Os dados foram analisados em planilha eletrônica Excel. Para cada dimensão foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Os dados foram classificados por meio de distribuição de frequência e plotados em histogramas (VALADARES et al., 2009).

O peso de mil sementes foi determinado conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com algumas modificações, devido ao número reduzido de sementes sem danos obtidas na coleta. Foram utilizadas três repetições de 100 sementes, as quais foram retiradas aleatoriamente dos sacos de papel em que estavam armazenadas. Foram estimadas a média, a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores obtidos nas pesagens.

3.3.3 Qualidade sanitária do lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

O ensaio visando à caracterização da qualidade sanitária de sementes de *Nectandra megapotamica* foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM. Para a avaliação da sanidade das sementes foi utilizado o método “blotter test” ou teste do papel filtro, conforme

recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro repetições com 25 sementes cada, totalizando 100 sementes, as quais foram distribuídas e analisadas em delineamento inteiramente casualizado. Para o experimento, foram usadas caixas plásticas do tipo “gerbox”, com dimensões de 11 cm x 11 cm x 3 cm, que foram previamente desinfestadas usando-se algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v).

Posteriormente, as sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada. A inoculação das sementes foi efetuada com o auxílio de pinças, previamente autoclavadas e desinfestadas. Em seguida, as caixas foram fechadas e inseridas dentro de sacos plásticos, para evitar a perda de umidade, e acondicionadas em sala com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de $20\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

A avaliação de sanidade foi realizada aos sete dias, identificando-se os gêneros fúngicos por meio da observação das sementes individualmente. Esses dados foram utilizados para determinar a porcentagem de incidência dos gêneros fúngicos em cada caixa “gerbox”. Os gêneros fúngicos foram identificados por meio da visualização em microscópio estereoscópio, com base na observação e posterior comparação com a literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

3.3.4 Germinação *in vitro* de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo unifatorial. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo meio nutritivo (conforme o tratamento) e três sementes em cada frasco, com oito repetições, sendo que os tratamentos consistiram de diferentes meios de cultivo, com a seguinte composição:

T1 – 30 mL de meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962);

T2 – 30 mL de meio nutritivo MS, acrescido de 3,8 g de vermiculita granulometria fina;

T3 – 30 mL de meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS);

T4 – 30 mL de meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS, acrescido de 3,8 g de vermiculita granulometria fina;

T5 – 30 mL de meio ágar-água a 0,7% (p/v).

Ao meio de cultivo MS ou $\frac{1}{2}$ MS foram acrescentados 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 ou 50 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão durante 15 min.

Inicialmente, foi realizada a desinfestação superficial das sementes de *Nectandra megapotamica*, que consistiu na imersão das sementes, na câmara de fluxo laminar, em solução de etanol a 70% (v/v) durante 30 s, sendo, em seguida, submersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 4,0% (v/v) durante 15 min, e posteriormente, as sementes passaram por três enxágues com água estéril. Após a inoculação os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C \pm 2, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 μ mol m⁻² s⁻¹, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 45 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação. As variáveis observadas foram germinação, contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes) e contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes), todas expressas em porcentagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram transformadas, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

3.3.5 Miniestaquia – Efeito da concentração de Ácido 3-Indol Butírico (AIB) sobre o enraizamento de miniestacas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Para a realização deste experimento foi formado um minijardim clonal, a partir de mudas oriundas de regeneração, coletadas a campo, as quais foram cultivadas em casa de vegetação em vasos flexíveis com capacidade para 4 L, contendo uma mistura composta por substrato comercial à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais, na proporção 1:1 (v/v) e vermiculita na proporção de 3:1 (v/v). Após o estabelecimento, as mudas receberam, semanalmente, uma aplicação de 100 mL de solução de NPK (5-20-20) a 1,5 g L⁻¹ em cada vaso. Posteriormente, visando estimular a ocorrência de brotações laterais, as mudas foram decepadas a uma altura de, aproximadamente, 10 cm, mantendo-se apenas 1 a 2 pares de folhas, para constituírem as minicepas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x3, em que o fator “A” foi constituído das concentrações de AIB (0; 1000; 2000 ou 4000 mg L⁻¹) e o fator “B”, do período das avaliações (30, 45 ou 60 dias), totalizando 12 tratamentos. As miniestacas foram confeccionadas a partir da porção apical de brotações de minicepas, contendo de 7 a 10 cm e 1 a 2 pares de folhas cortadas ao meio. Durante a coleta, as miniestacas foram acondicionadas em caixa de isopor contendo água destilada para evitar a perda de umidade. Em seguida, as miniestacas foram imersas em solução hidroalcoólica (50% etanol e 50% de água destilada, v/v) contendo AIB, conforme o tratamento, por 10 s.

Após, as miniestacas foram colocadas em copos plásticos de 300 mL, contendo substrato, os quais foram acondicionados em bandejas plásticas com dimensões de 20 x 40 x 60 cm. Para cada tratamento foi utilizada uma bandeja devidamente identificada e contendo 12 miniestacas. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização e temperatura controlada (UR 80% e 25°C).

Decorridos 30, 45 e 60 dias, as miniestacas foram avaliadas quanto à sobrevivência (%), formação de raízes (%), número de raízes, comprimento médio de raízes (cm), formação de calos na base das miniestacas (%) e número de folhas.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias, pelo teste de Bartlett, as variáveis foram

transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi realizado teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro para os tratamentos qualitativos e análise de regressão polinomial, para os quantitativos. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

3.4 Resultados e discussões

3.4.1 Determinação do grau de umidade do lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

As sementes de *N. megapotamica* apresentaram grau médio de umidade de 31,3%, após cerca de 30 dias de armazenamento, inicialmente em condições ambientais e, depois, em refrigerador. Estudo anterior realizado com sementes coletadas em frutos também maduros de *N. megapotamica* ratifica a média observada, sendo registrados valores semelhantes, de, no máximo, 40,9% (coleta e análise em 23/10/2002) que se reduziu para 38,8%, cerca de uma semana depois (HIRANO, 2004) e confirmando seu comportamento recalcitrante.

Os resultados verificados para a espécie também estão de acordo com aqueles obtidos para outras espécies da família Lauraceae, como *Ocotea puberula* (canela guaíca), em que foi registrado um teor de umidade em torno de 46% em sementes de frutos maduros (HIRANO; POSSAMAI, 2008), *Ocotea corymbosa*, em que o teor de umidade foi mais baixo (inferior a 40%), enquanto para *Ocotea pulchella* (canela-lageana) ficou em torno de 42%. Igualmente, sementes recalcitrantes de *Machilus kusanoi* (espécie pertencente à família Lauraceae,

encontrada em países asiáticos) apresentaram 38% de umidade (CHIEN; LIN, 1997).

O alto grau de umidade das sementes, observado nesse lote de *N. megapotamica*, é uma das principais causas da perda do poder germinativo durante o armazenamento, a qual decorre do aumento na taxa respiratória e da ação de micro-organismos, sendo que teores de água superiores a 20% podem ocasionar o aquecimento da massa de sementes a uma temperatura letal (DESAI et al., 1997).

Outro fator que pode ter contribuído para o grau de umidade observado é a constituição química das sementes de *N. megapotamica*, as quais são oleaginosas (GARCEZ et al., 2009), o que é considerada a principal interferência sobre o ponto de equilíbrio higroscópico em determinada condição de secagem (CARVALHO et al., 2008).

3.4.2 Aspecto biométrico do lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

O lote de sementes de *N. megapotamica* avaliado apresentou grande variação no que diz respeito ao tamanho, conforme pode ser observado na Tabela 1, em que estão apresentados os valores de comprimento, largura e espessura das sementes. Essa heterogeneidade no tamanho das sementes pode ser creditada, principalmente, à influência de fatores ambientais não controlados, tais como variações de temperatura, comprimento do dia, incidência de chuvas, idade da planta e, também, por diferenças genéticas (SILVA, et al., 2001). O comprimento médio foi de $9,73 \pm 1,27$ mm, a largura, de $6,73 \pm 0,93$ mm, e a espessura, $3,63 \pm 0,52$ mm. Em outro estudo realizado com a espécie em uma área de Floresta Estacional Decidual no Rio Grande do Sul (KRÜGEL et al., 2006), as sementes apresentaram dimensões semelhantes: $9,64 \pm 1,20$ mm de comprimento e $6,89 \pm 0,70$ mm de largura.

Isso também foi registrado em outras espécies da família Lauraceae, como, por exemplo, em *Cryptocarya moschata* (canela-nhutinga), em que a amplitude de variação no comprimento dos frutos foi de 14,5 a 30,6 mm e na largura, de 13,3 a 25,5 mm, com médias de 23,5 e 19,1 mm respectivamente. Em *Ocotea catharinensis*

(canela-sebo) a variação do comprimento dos frutos foi de 11,4 a 26,0 mm e largura de 7,7 a 15,6 mm, com médias de 18,6 e 11,5 mm, respectivamente, e em *Endlicheria paniculata* (canela-do-brejo), o comprimento variou de 15,7 a 31,5 mm e a largura, de 10,02 a 18,7 mm (MORAES; PAOLI, 1996).

Tabela 1 - Comprimento, largura e espessura (mm) de um lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. da produção de 2014, avaliado em fevereiro do mesmo ano. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Parâmetro	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)
Mínimo	6,51	4,72	3,00
Média	9,73	6,73	3,63
Máximo	12,86	8,80	5,89
Desvio Padrão	1,27	0,93	0,52
CV (%)	13,05	13,85	14,32

CV= Coeficiente de Variação

Os coeficientes de variação observados nas dimensões das sementes, nunca inferiores a 13%, podem ser reflexo dessa heterogeneidade no lote de sementes avaliado, haja vista que a coleta foi feita de forma aleatória, em diferentes galhos de 10 plantas matrizes em desenvolvimento em três municípios. Em estudo realizado com *Hancornia speciosa* (mangabeira), os coeficientes de variação para essas mesmas variáveis foram semelhantes (12,58%, 12,63% e 13,61%, respectivamente, para comprimento, largura e espessura) (GONÇALVES et al., 2013). Na classificação de Pimentel-Gomes (1990), que não leva em consideração as espécies e nem o tipo de experimento realizado, coeficientes de variação inferiores a 20% são considerados baixos ou médios.

Na Figura 4, são apresentados histogramas de frequência para comprimento, largura e espessura, em cinco classes formadas a partir da amplitude de variação individual dessas características. Os dados obtidos demonstram que, em espécies nativas, como é o caso de *N. megapotamica*, é comum a ocorrência de variações em características biométricas, como também foi constatado em sementes de

Tabebuia aurea (ipê-amarelo-do-cerrado) que apresentaram amplitudes de variação de 17,3 mm a 22,9 mm no comprimento e 13,3 mm a 17,3 mm na largura (OLIVEIRA et al., 2006). Igualmente, sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Alemão) apresentaram variação no comprimento (17,14 a 21,76 mm), largura (9,07 a 11,73 mm) e espessura (3,95 a 6,49 mm) (NOGUERIA, et al., 2012). O tamanho das sementes pode variar entre indivíduos da mesma espécie, de ano para ano e, também, dentro de uma mesma planta (PIÑA-RODRIGUES; AGUIAR, 1993). Na maioria dos casos, dentro da mesma espécie, existem variações individuais, que podem estar associadas às diferenças fenotípicas determinadas pelas variações ambientais durante o desenvolvimento das sementes (OLIVEIRA, 2012).

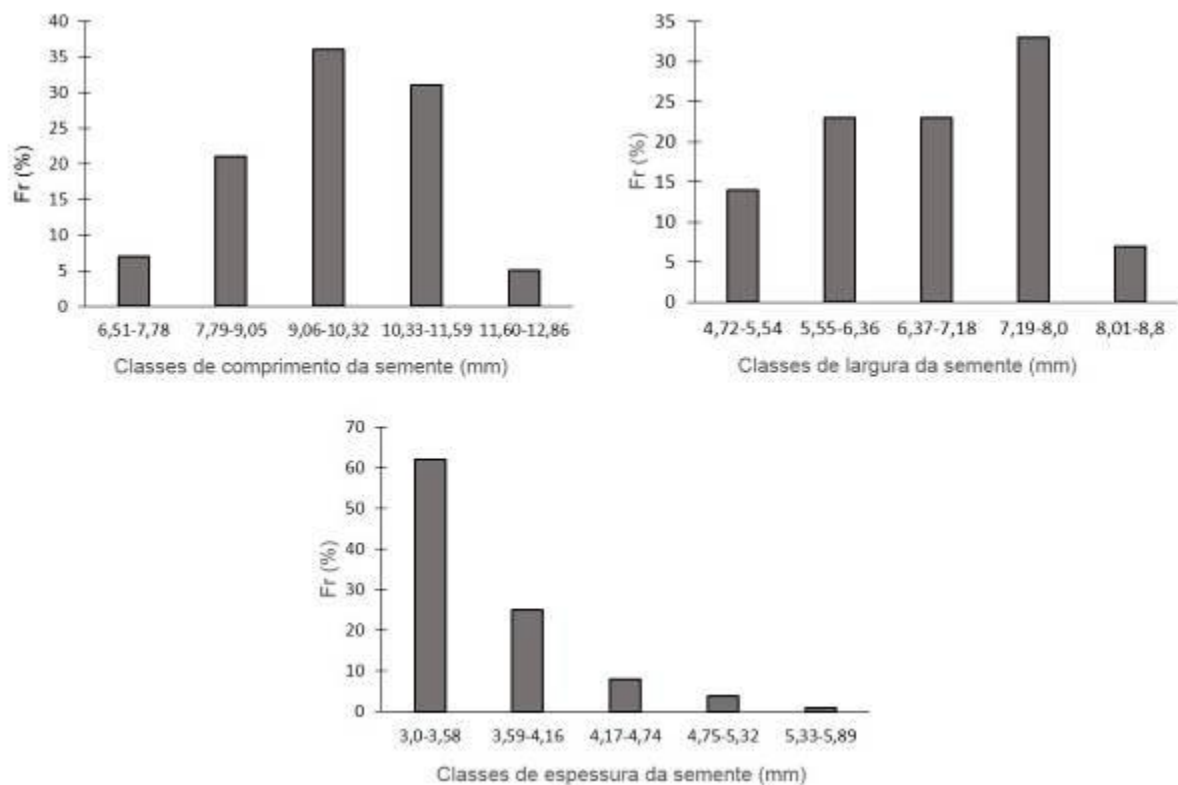


Figura 4 - Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento, largura e espessura de um lote sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. da produção de 2014, avaliado em fevereiro do mesmo ano. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

No entanto, a variação observada nas dimensões das sementes de *N. megapotamica* não deve ser atribuída apenas a fatores ambientais, mas, também,

pode representar um indício da reserva de variabilidade genética populacional. Desse modo, estudos sobre a biometria dos frutos e sementes da espécie devem ser aprofundados, ampliando-se o número de ambientes. Da mesma maneira, justificam a necessidade de investigar-se a diversidade dessa espécie em nível molecular.

O peso médio de mil sementes de *N. megapotamica* foi de 288,76 g, correspondendo a 3.487 sementes kg⁻¹, sendo consideradas sementes grandes, de acordo com Brasil (2009) e ISTA (2004), que as consideram assim quando apresentam peso de mil sementes maior que 200 g e menos que 5.000 unidades kg⁻¹. O desvio-padrão foi de 16,03 e o coeficiente de variação (CV), de 5,55%, o que permite afirmar que as estimativas podem ser consideradas confiáveis. O resultado obtido é semelhante ao proposto por Carvalho (2008) para a espécie, com o número de sementes por quilograma variando de 1.400 (LONGHI, 1995) a 3.500 (DURIGAN et al., 1997). Por outro lado, o peso médio de mil sementes verificado para *N. megapotamica* no presente estudo é maior que aqueles observados em outras espécies do gênero, como *N. grandiflora*, *N. lanceolata* e *N. oppositifolia*, que apresentaram 462, 950 e 1275 sementes por quilograma (CARVALHO, 2006). Adicionalmente, deve ser considerado que sementes recalcitrantes de espécies tropicais têm sido caracterizadas como sementes grandes (BONNER, 1990; KAGEYAMA e VIANA, 1991).

Outro aspecto que deve ser considerado é o fato de que a espécie em estudo pertence ao grupo ecológico das climácicas, corroborando as sugestões de Kageyama e Viana (1991) e de Pammenter e Berjak (2000), de que sementes recalcitrantes são típicas desse tipo de espécie. Outras quatro espécies de Lauraceae pertencentes ao grupo ecológico das espécies clímax também foram registradas como tendo sementes recalcitrantes (DAVIDE et al., 2003).

O peso das sementes de determinada espécie é uma característica extremamente plástica, alterando-se dependendo da planta matriz, do local da coleta dos frutos, e do ano (PIÑA-RODRIGUES; AGUIAR, 1993). Variações no tamanho e peso de sementes podem ser atribuídas a fatores ambientais, como a disponibilidade de água, que é considerada essencial para a produção dos frutos (TABARELLI et al., 2003).

Diante da dificuldade de se obter informações sobre as características biométricas das sementes de espécies florestais nativas, essas informações

poderão contribuir no reconhecimento da espécie em levantamentos florísticos (ARAÚJO et al., 2004) e auxiliar no planejamento da coleta de frutos, para a produção de mudas em viveiro com o objetivo de recompor áreas degradadas (SOUZA, et al., 2007).

3.4.3 Qualidade sanitária do lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

No lote de sementes avaliado houve maior incidência do gênero *Fusarium* sp., seguido do gênero *Rhizoctonia* sp., além de outros de menor incidência como e *Aspergillus* sp., *Phoma* sp., *Botrytis*, sp. e *Rhizopus* sp. (Tabela 2) (Figura 5). A precisão do experimento pode ser considerada satisfatória, obtendo-se valores de coeficiente de variação (CV) de 7,53 a 15,74%, considerados baixos ou médios, pela classificação de Pimentel-Gomes (1990).

Tabela 2 - Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados no lote de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. da produção de 2014, avaliadas no teste de sanidade pelo método do 'blotter test' em fevereiro do mesmo ano. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

	Gênero fúngico					
	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phoma</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizoctonia</i>
Média (%)	23,00	13,00	87,00	15,00	11,00	67,00
CV (%)	7,53	13,32	15,03	11,54	15,74	8,82

CV= Coeficiente de Variação

O gênero fúngico *Fusarium* sp., identificado no presente ensaio em maior porcentagem, também foi observado com elevada incidência em outro trabalho com sementes de *N. megapotamica* (HIRANO, 2004). Em estudos que relataram as condições sanitárias de sementes de outras espécies da família Lauraceae, como *Ocotea puberula* (canela guaíca) e *Ocotea odorifera* (canela-sassafrás), foram

identificados o gênero *Penicilium* sp. e *Fusarium* sp. (HIRANO, 2004), sendo o último igualmente observado no presente trabalho. Em *Nectandra lanceolata* (canela-cedro) foi detectada a presença dos gêneros fúngicos *Fusarium* sp. e *Rhizopus* sp. Por sua vez, em *Ocotea pulchella* (canela-lageana) foi observado *Clonostachys* sp., além de outros gêneros comuns aos observados no presente trabalho, como os já mencionados *Fusarium* sp. e *Rhizopus* sp. (CARVALHO, 2006).

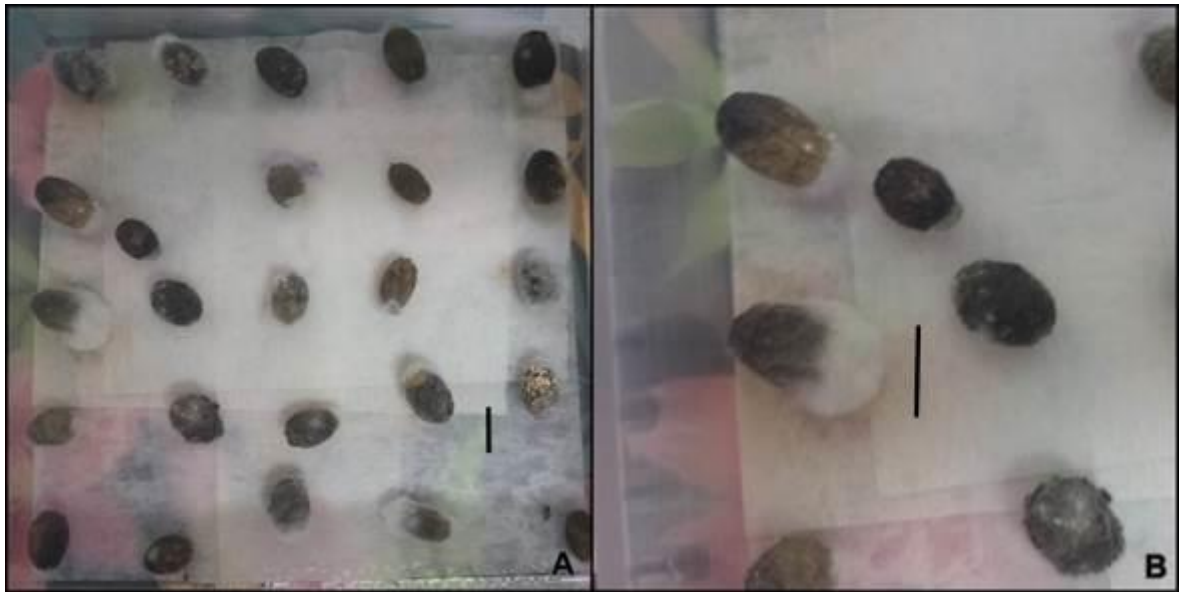


Figura 5 – Sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. avaliadas no teste de sanidade pelo método do 'blotter test'. Em A) aspecto geral das sementes com contaminação fúngica; em B) semente com contaminação fúngica onde pode ser observado o gênero *Fusarium* sp., em cor clara. Barra =1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Entre os gêneros de fungos identificados associados a sementes de espécies florestais nativas, muitos são considerados saprófitas externos, na maioria dos ensaios de sanidade, podendo-se citar: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Pythium*, entre outros (MEDEIROS et al., 1992; OLIVEIRA, 2012). Alguns são caracterizados por seu rápido crescimento e agressividade, considerados patogênicos a várias espécies, causando a morte da semente antes mesmo da germinação, como é o caso de *Fusarium* sp. (MENTEN, 1995; BOTELHO, 2006). O gênero *Fusarium* sp. é classificado como fungo de campo, pois pode invadir as sementes ainda na planta-

mãe, estabelecendo-se antes da colheita, ou seja, no período crescimento e maturação dos frutos (WETZEL, 1987).

Em estudo efetuado em sementes de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo), membro da família Malvaceae, foram identificados os gêneros fúngicos: *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phoma* sp. e *Cladosporium* sp. Assim, como no presente estudo, o gênero *Fusarium* sp. apresentou a maior incidência, conforme revelado após o emprego do teste do papel filtro em um dos lotes avaliados (MACIEL et al., 2013). Em sementes de *Jacaranda mimosifolia* (jacarandá-mimoso) da família Bignoniaceae, foram observados os fungos de armazenamento *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., e, também, alguns potencialmente patogênicos, como *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. (BOVOLINI et al., 2011).

Phoma sp. foi relatado em *Tabebuia serratifolia* (ipê-do-cerrado) e *Tabebuia impetiginosa* (ipê-roxo) e pode ser considerado patógeno de espécies florestais (BOTELHO, 2006). Em um estudo da população fúngica de 18 espécies florestais em diferentes estados, foi destacada a incidência de *Phoma* sp. associado a essas sementes (CARNEIRO, 1986). No presente trabalho foi observada uma reduzida incidência deste gênero fúngico (média de 15%, Tabela 2) em sementes de *N. megapotamica*.

Alguns fungos, dentre eles *Rhizoctonia* sp., possuem uma ampla gama de hospedeiros e são os grandes responsáveis pela podridão de raízes, lesões em hastes, tombamento de mudas, manchas foliares. Essa característica é decorrente do fato que esses micro-organismos apresentam estruturas de reprodução que os possibilitam habitar o solo e sobreviver nas sementes por longos períodos (FERREIRA, 1989; RESENDE et al., 2008). Ilustrando essa questão, em *Commiphora leptophloeos* (imburana) pertencente à família Burseraceae, *Rhizoctonia* sp. destacou-se pela grande incidência nas sementes de diversos lotes avaliados (FAIAD, et al., 1997)

A ocorrência de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. é comum em sementes florestais, sendo que estes gêneros podem ser transportados do local de coleta para o laboratório (PIÑA-RODRIGUES, 1988). Os gêneros fúngicos *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. foram observados em menor porcentagem no presente estudo (23% e 11% respectivamente, Tabela 2). Em sementes de *Cybistax*

antisiphilitica (ipê-verde), foi observado um aumento na incidência de *Aspergillus* sp. no período de armazenamento (MELO, 2009).

Aspergillus e *Rhizopus* são classificados como fungos de armazenamento (DHINGRA, 1985) e estão associados à deterioração das sementes, sua ação é dependente das condições físicas e fisiológicas das mesmas, por ocasião do início da armazenagem, e dos fatores ambientais que predominam nesse período (RUIZ FILHO et al., 2004). Em vista disso, a menor ocorrência destes gêneros nas sementes de *N. megapotamica* pode ter sido ocasionada pelo fato do teste de sanidade ter sido realizado pouco tempo após a coleta das sementes.

Em geral, quanto menor o teor de umidade das sementes, menor sua atividade fisiológica e menor a atividade dos agentes patogênicos (KRAMER; KOZLOWSKI, 1972). As sementes de *N. megapotamica* apresentaram teor de umidade de 31,3 %, este fato pode ter contribuído para a ocorrência dos gêneros fúngicos observados, haja vista que um alto teor de umidade causa aumento na taxa respiratória, contribuindo para o aparecimento de fungos.

3.4.4 Germinação *in vitro* de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Para a germinação *in vitro* houve efeito significativo ($p=0,0030$), porém para a contaminação fúngica ($p=0,486$) e bacteriana ($p=0,2311$) não foi observado efeito significativo dos meios de cultivo avaliados. A maior porcentagem de germinação foi observada quando foi empregado o meio nutritivo MS na ausência de vermiculita (50,80%), o qual diferiu, significativamente, dos demais tratamentos (Tabela 3) (Figura 6). Esse resultado indica que o meio de cultivo mais adequado para a germinação *in vitro* de sementes de *N. megapotamica* é o meio MS na sua composição integral de sais. Pode-se dizer que, a concentração sais, no meio nutritivo, considerando-se a espécie e o potencial osmótico de suas sementes, poderá promover ou retardar a germinação (DODD; DONOVAN, 1999), pois durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que fazem parte dos meios de cultivo não influenciam diretamente a nutrição, mas também exercem influência no crescimento celular e na morfogênese através de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996).

Tabela 3 - Médias de porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. de um lote da produção de 2014, após 45 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tratamentos	Germinação (%)
T1 – Meio MS	50,80 a*
T2 – Meio MS + vermiculita	29,14 b
T3 – Meio ½MS	29,14 b
T4 – Meio ½MS + vermiculita	24,97 b
T5 – Ágar-água	4,16 b
Média	31,64
IV**	10,91

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Em *Ocotea porosa* (Lauraceae), conhecida popularmente como imbuia, a média de sementes germinadas e sadias foi superior a 90% em meio MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose (MORITZ, et al., 2009). Em outro estudo com esta mesma espécie, a porcentagem de embriões germinados, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, nos meios nutritivos MS e MS cujas concentrações de sais foram reduzidas à metade (½MS), foi de 67,7 e 74,2% de germinação respectivamente (PELEGRINI, 2008). Para *Persea willdenovii* (pau-andrade) (Lauraceae), a porcentagem média de germinação das sementes foi de 15,5% em meio MS, acrescido de Ácido 3-Indol Butírico - AIB aos 68 dias de cultivo *in vitro* (FIOR, et al., 2007). Estudos envolvendo o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de espécies da família Lauraceae não são frequentes na literatura (MORITZ et al., 2009). Para *N. megapotamica* não foram observados na literatura estudos sobre o desempenho da espécie em relação à germinação *in vitro*. Em um trabalho realizado com a germinação *ex vitro* de sementes dessa espécie, a porcentagem de germinação foi de 56% em substrato solo de floresta (HIRANO, 2004).



Figura 6 – Aspectos das brotações obtidas pela germinação *in vitro* de sementes de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: A) plântula obtida em meio nutritivo MS, aos 20 dias de cultivo; B) e C) brotação obtida pela germinação *in vitro* aos 45 dias de cultivo. Barra =1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

No presente estudo foram observadas baixas médias de contaminação fúngica (0,25%) e bacteriana (0,075%), portanto o processo de desinfestação superficial das sementes com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 4,0% (v/v) durante 15 min pode ser considerado eficiente. O hipoclorito de sódio é utilizado com frequência para a desinfestação de explantes no cultivo *in vitro* e a concentração varia de acordo com a espécie (MORITZ et al., 2009). Em estudo com a espécie *Swietenia macrophylla* (mogno) pertencente à família meliaceae, as sementes foram desinfestadas após a retirada do tegumento, em soluções com hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0; 2,5; e 5,0% (v/v), e mantidas embebidas por 10, 20, 30 e 40 minutos. As menores porcentagens de contaminação (10 e 15%) foram observadas em sementes desinfestadas em 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio por 30 e 20 minutos, respectivamente (COUTO et al., 2004). Já em estudo realizado

com *Persea willdenovii* (Lauraceae) a imersão das sementes em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,0% i. a. por 15 min não mostrou-se eficiente, sendo que as sementes apresentaram grande proporção de contaminação por micro-organismos de origem fúngica e bacteriana (74%) (FIOR, et al., 2007).

Sendo assim, pode-se afirmar que estudos com diferentes meios nutritivos que favoreçam a germinação *in vitro* de espécies com tendência à recalcitrância, como é o caso de *N. megapotamica*, são fundamentais para maximizar a taxa de germinação, e obter plântulas uniformes com qualidade genética e fitossanitária adequada (STEIN et al., 2007).

3.4.5 Miniestaquia – Efeito da concentração de Ácido 3-Indol Butírico (AIB) sobre o enraizamento de miniestacas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Para a sobrevivência das miniestacas houve efeito significativo somente do fator principal concentração de AIB ($p=0,0020$; $IV= 8,77\%$), sendo observado um ajuste linear decrescente (Figura 7A). A maior sobrevivência das miniestacas (100%) foi observada na ausência de auxina e na sua presença, na concentração de 1000 mg L^{-1} , nas concentrações 2000 e 4000 mg L^{-1} a porcentagem de sobrevivência foi de $83,3$ e $80,55\%$, respectivamente. Altas concentrações de auxina podem causar inibição no desenvolvimento inicial das brotações, provocando queda das folhas, necrose na base da estaca, podendo até promover a morte do material vegetativo (HARTMANN et al., 2002). Contudo, mesmo com a utilização de 4.000 mg L^{-1} de AIB, as porcentagens de sobrevivência observadas neste trabalho podem ser consideradas altas, e corroboram com aquelas existentes na literatura, como, por exemplo, para a miniestaquia em *Peltophorum dubium* (canafístula) família fabaceae, em que foram utilizadas as mesmas concentrações de AIB do presente estudo, a maior sobrevivência foi, igualmente, observada na ausência da auxina na base das miniestacas, decrescendo na sua presença e, também, à medida que aumentaram suas concentrações (CURTI, 2014). Da mesma maneira, em miniestacas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) da família das aquifoliáceas, submetidas a diferentes dosagens de AIB, foram observados valores médios de 75%

de sobrevivência para mudas de 120 dias de idade (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003).

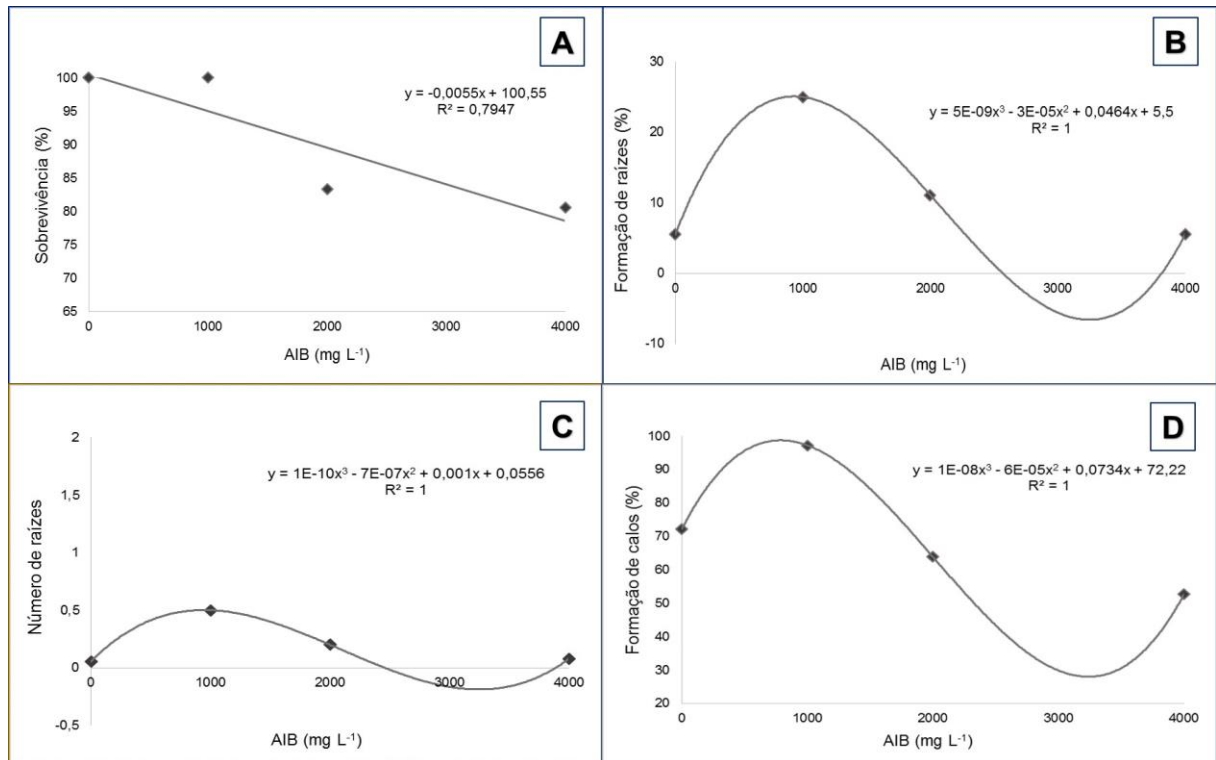


Figura 7 – Miniestaca em *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função das concentrações de soluções à base de ácido 3-indolbutírico – AIB em que foram imersas por 10s, ao longo de 60 dias de avaliações. A) Sobrevivência média (%); B) Formação de raízes (%); C) Número de raízes; e D) Formação de calos (%). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Para a formação de raízes nas miniestacas foi observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de AIB ($p=0,0131$) e dias de avaliação ($p=0,0000$), não sendo observada interação significativa. O IV da variável foi de 23,69%. Em relação ao emprego da auxina, foi observado um comportamento cúbico das concentrações de AIB, sendo que a formação de raízes foi favorecida na concentração de 1000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 7B).

Em relação ao período de avaliação, a maior média de formação de raízes ocorreu aos 60 dias (Tabela 4), no entanto, esse valor ainda é baixo, levando-se em consideração resultados obtidos anteriormente para *Sapium glandulatum* (leiteiro) pertencente à família Euphorbiaceae, em que aos 3 meses de avaliação, o enraizamento das miniestacas foi de 80,56% (FERREIRA et al., 2010), bem como,

para *Calophyllum brasiliense* (guanandi), da família Clusiaceae, em que a porcentagem de formação de raízes foi de 85%, aos 90 dias em casa de vegetação (SILVA, et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados por outros autores, com *Eucalyptus grandis* (eucalipto) (TITON et al., 2003) e *Cedrella fissilis* (cedro) (XAVIER et al., 2003). Isto pode indicar que é necessário um período superior de avaliação para miniestacas de *N. megapotamica* para que ocorra formação de raízes, em porcentagens satisfatórias, visto que o período para enraizamento em casa de vegetação é variável entre espécies, sendo que, para as nativas, existe uma variação de 2 a 4 meses para a formação do sistema radicial (OLIVEIRA et al., 2001).

Tabela 4 - Médias de formação de raízes (%) em miniestacas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., em função do período de avaliação, independentemente da concentração de ácido indolbutírico - AIB (0; 1000; 2000 ou 4000 mg L⁻¹). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Período de avaliação (dias)	Formação de raízes (%)
30	2,08 b*
45	2,08 b
60	31,25 a
Média	11,80
IV**	23,69

*médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Para a variável número de raízes foi observado efeito significativo apenas do fator concentrações de AIB (p=0,0131; IV=23,69%), ajustando-se para uma equação polinomial de terceiro grau das concentrações de AIB em relação ao número de raízes (Figura 7C). Conforme citado anteriormente, pode-se inferir que é necessário um período superior de avaliação para miniestacas de *N. megapotamica* para que ocorra um bom desenvolvimento do sistema radicular e um maior número de raízes por estaca, tendo em vista que os valores verificados no presente estudo são

inferiores aos obtidos para outras espécies arbóreas nativas, como, por exemplo, para a miniestaca em *Peltophorum dubium* (canafístula), aos 90 dias de cultivo, foram obtidas em torno de 3 raízes por miniestaca (CURTI, 2014).

Para o comprimento médio de raízes não houve efeito significativo dos fatores testados e nem da interação dos mesmos (IV=25,93%), observando-se uma média de 1,02 cm. Esse valor foi inferior ao que tem sido observado em outras espécies arbóreas como *Peltophorum dubium* (canafístula) (CURTI, 2014) e *Toona ciliata* (cedro) (SILVA et al., 2012) em que foram observadas raízes com mais de 3 cm de comprimento. Da mesma forma, para o número de folhas não ocorreu efeito significativo dos fatores avaliados (IV=21,72%), sendo observada uma média geral de 3,51 folhas por miniestaca.

Para a formação de calos foi observado efeito significativo apenas das concentrações de AIB testadas ($p=0,0002$; IV=17,18%), sendo observado comportamento cúbico para as concentrações da auxina, em que observou-se intensa formação de calos na base das estacas (97,22%) na concentração 1000 mg L^{-1} (Figura 7D). No entanto, a menor porcentagem de formação de calos na concentração de 4000 mg L^{-1} de AIB pode ser atribuída à menor sobrevivência observada neste tratamento. Apesar disso, nas miniestacas sobreviventes, a formação de calos foi intensa. Em *Nectandra nitidula* (canela-do-mato), a aplicação de AIB não influenciou os resultados obtidos, sendo observada uma alta proporção de estacas vivas, e grande capacidade de cicatrização de tecidos, pela formação rápida de calos (SANTOS et al., 2011).

Dessa forma, em espécies com predisposição ao enraizamento, geralmente, a formação de raízes adventícias acontece de forma direta, entretanto em espécies de difícil enraizamento, a iniciação de radicial ocorre normalmente de forma indireta, com a pré-formação de calo. Todavia, a formação do calo não é imprescindível ao enraizamento adventício, pois, apesar de serem processos que ocorrem simultaneamente sob condições adequadas, a ontogênese de raízes e calos é independente (HARTMANN et al., 2002).

Diante do exposto, as variações observadas nas miniestacas de *N. megapotamica* podem ser atribuídas, em parte, à variação genética existente entre elas, às concentrações de auxinas utilizadas, à época de coleta, entre outros, os quais podem estar relacionados ao desenvolvimento de raízes (SANTOS, et al., 2011). Assim, são necessários estudos complementares para a obtenção de

miniestacas de *N. megapotamica* com maiores médias de enraizamento, as quais devem ser submetidas, posteriormente, à aclimatização.

3.5 Conclusões

O grau de umidade de sementes de *Nectandra megapotamica* é de 31,3%. O peso médio de mil sementes de *N. megapotamica*, é de 288,76 g, correspondendo a 3.487 sementes Kg⁻¹.

O gênero fúngico *Fusarium* sp. é o mais incidente no lote de sementes avaliadas.

A germinação *in vitro* de sementes de *N. megapotamica* é mais eficiente em meio nutritivo MS.

A formação de raízes em miniestacas de *N. megapotamica* é favorecida na concentração 1000 mg L⁻¹ de AIB, aos 60 dias de cultivo. No entanto, é necessário um período maior em casa de vegetação a fim de promover um maior enraizamento.

4 CAPITULO 2

QUALIDADE DE SEMENTES, MICROPROPAGAÇÃO E ACLIATIZAÇÃO *EX VITRO* EM *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.) J. MATTOS

4.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo contribuir com informações relacionadas à qualidade de sementes, micropropagação e aclimatização *ex vitro* de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, de maneira a aprimorar a produção de mudas dessa espécie florestal nativa do Brasil.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar a qualidade sanitária e a capacidade germinativa de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* provenientes de dois lotes de sementes, avaliados em dois períodos de armazenamento.
- Avaliar o efeito de diferentes antioxidantes sobre a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *H. chrysotrichus*.
- Avaliar o efeito da presença ou ausência de ágar na rizogênese *in vitro* de *H. chrysotrichus*.
- Avaliar a aclimatização *ex vitro* das plantas obtidas na cultura de tecidos.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Análise da qualidade sanitária de dois lotes de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento

O ensaio visando à caracterização da qualidade sanitária de sementes de *H. chrysotrichus* foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

As sementes utilizadas neste ensaio consistiram de um lote proveniente do interior do Rio Grande do Sul (Lote 2011) e de um lote adquirido de uma empresa localizada no interior de São Paulo (Lote 2013). Os lotes estavam armazenados em refrigerador à temperatura de 8–10 °C desde o ano de sua produção. A avaliação da qualidade sanitária dos dois lotes de sementes foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 2 x 2, correspondendo aos lotes (Lote 2011 e Lote 2013) e aos períodos de armazenamento (janeiro de 2014, aproximadamente 3 anos para o primeiro lote e 1 ano para o segundo, e setembro de 2014, correspondendo a 3 anos e 8 meses para o lote de 2011 e a 1 ano e 8 meses para aquele produzido em 2013). As sementes foram inoculadas, em papel filtro, utilizando-se 25 sementes em cada uma das quatro repetições para cada lote de sementes.

Para a avaliação da sanidade das sementes foi utilizado o método “blotter test” ou teste do papel filtro, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Para o experimento, foram usadas caixas plásticas do tipo “gerbox”, com dimensões de 11cm x 11cm x 3cm, que foram previamente desinfestadas usando algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v).

Posteriormente, as sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada. A inoculação das sementes foi efetuada com o auxílio de pinças previamente autoclavadas e desinfestadas. Em seguida, as caixas foram fechadas e inseridas dentro de sacos plásticos, para evitar a perda de umidade e acondicionadas em sala com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de 20µmol m⁻² s⁻¹.

A avaliação de sanidade foi realizada aos sete dias, identificando-se os gêneros fúngicos por meio da observação das sementes individualmente, esses dados foram utilizados para determinar a porcentagem de incidência dos gêneros fúngicos em cada lote. Os gêneros fúngicos foram identificados por meio da visualização em microscópio estereoscópio, com base na observação e posterior comparação com a literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

4.3.2 Análise da qualidade fisiológica de dois lotes de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento

O teste de germinação de sementes de *H. chrysotrichus* foi realizado no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia (UFSM). A avaliação da qualidade fisiológica dos dois lotes de sementes foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial correspondendo aos dois lotes (Lote 2011 e Lote 2013) e dois períodos (janeiro de 2014 e setembro de 2014) de armazenamento em refrigerador à temperatura de 8–10°C. Foram utilizadas oito repetições de 25 sementes para cada lote.

O ensaio para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi realizado seguindo-se as recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Inicialmente, foi efetuada a desinfestação das caixas plásticas tipo “gerbox”, com o auxílio de algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, foram colocadas duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água estéril. Posteriormente, foi realizada a desinfestação superficial das sementes, por meio da imersão em etanol a 70% (v/v) durante 30 s, logo após as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de cálcio [Ca(OCl)₂] a 3% (p/v) por 10 min e, na sequência, passaram por um enxague triplo em água estéril. As sementes foram inoculadas com o auxílio de pinças desinfestadas com algodão embebido em solução de NaOCl a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Posteriormente à inoculação das sementes, as caixas plásticas foram fechadas e colocadas dentro de sacos plásticos para evitar a perda de umidade. Na sequência, as caixas foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de 25°C±3,

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

Foram realizadas quatro avaliações, com intervalos de sete dias cada, sendo consideradas germinadas as sementes que romperam o tegumento e emitiram radícula. Devido a elevada incidência de gêneros fúngicos ao longo das avaliações, foram analisadas apenas as variáveis porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG). Para a avaliação do IVG foi utilizada a expressão proposta por Maguire (1962):

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

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

4.3.3 Efeito de antioxidantes no controle da oxidação fenólica no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo trifatorial $3 \times 4 \times 2$, em que o fator “A” consistiu dos diferentes antioxidantes (testemunha; 1 g L^{-1} polivinilpirrolidona (PVP) ou 1 g L^{-1} carvão ativado), o fator “B”, do período de avaliação (7, 14, 21 ou 28 dias) e o fator “C”, da idade dos explantes (30 ou 60 dias).

Foram utilizadas duas fontes de explantes, segmentos nodais isolados de plântulas de origem seminal cultivadas *in vitro* em meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), reduzido à metade da concentração de sais ($\frac{1}{2}$ WPM), por 30 dias (explantes com 30 dias); e segmentos nodais isolados de plântulas de origem seminal cultivadas *in vitro* que permaneceram em meio ($\frac{1}{2}$ WPM) por 30 dias e que, após esse período, foram transferidos para o meio fresco de igual composição por mais 30 dias, totalizando 60 dias (explantes com 60 dias).

O meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM foi acrescido dos antioxidantes (conforme o tratamento), 30 g L^{-1} de sacarose, 50 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes cada, sendo utilizadas 12

repetições por tratamento, com um total de 288 explantes. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar e, posteriormente, os meios nutritivos foram autoclavados a 121°C e 1 atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 ou 28 dias, sendo consideradas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência dos explantes (explantes com coloração verde), número de folhas por explante, porcentagem de clorose foliar (amarelecimento das folhas) e porcentagem de oxidação fenólica (escurecimento na base dos explantes).

4.3.4 Efeito do ágar na rizogênese *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

O presente ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, em que os tratamentos foram constituídos das diferentes concentrações de ágar (0; 3,5 ou 7 g L⁻¹) adicionadas ao meio nutritivo, totalizando três tratamentos, com oito repetições cada, perfazendo um total de 72 explantes. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes. As brotações utilizadas neste ensaio, foram provenientes de plântulas germinadas *in vitro* e, na sequência, cultivadas, durante 30 dias, em meio nutritivo WPM, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar, sem a adição de fitorreguladores.

Decorrido esse período, os explantes foram inoculados, em câmara de fluxo laminar, em meio nutritivo WPM, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol. Adicionalmente, conforme o tratamento, foi acrescentado, ao meio nutritivo, ágar, na concentração de acordo com o tratamento, e 3,8 g de vermiculita. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar (para os meios que o continham) e, posteriormente, os meios nutritivos foram autoclavados a 121°C e 1atm de pressão

por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

A avaliação foi realizada após 30 dias de cultivo *in vitro*. As variáveis analisadas foram: sobrevivência (explantes com coloração verde), explantes com formação de raiz primária e com formação de raiz secundária, todas expressas em porcentagem, e também, o número de folhas por explante e o comprimento médio de raízes (cm).

4.3.5 Aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

As plantas cultivadas no ensaio anterior, conforme descrito no item (4.3.4), após 30 dias de cultivo *in vitro* foram submetidas à aclimatização *ex vitro* e avaliadas em diferentes períodos, a seguir descritos, conforme utilizado por León (2014), com algumas modificações. A unidade experimental consistiu de um copo plástico, contendo uma planta, sendo distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizadas, no mínimo, 10 mudas oriundas de cada tratamento (0; 3,5 ou 7g L^{-1} de ágar) em que havia sido induzida a formação de raízes, totalizando 42 plantas. Os tratamentos consistiram das diferentes concentrações de ágar (0; 3,5 ou 7g L^{-1} de ágar), provenientes do experimento anterior (4.3.4).

1º período de aclimatização *ex vitro* (7 dias em sala de crescimento, com os copos cobertos)

As mudas foram transferidas para copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, com capacidade para 300 mL contendo 250 mL de substrato [mistura de vermiculita e substrato comercial, à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais, na proporção 1:1 (v/v)]. Os copos plásticos foram cobertos com outro copo, de igual capacidade, também com o fundo perfurado, a fim de manter a umidade no interior do copo e permitir que ocorressem trocas gasosas, promovendo um microclima adequado à aclimatização. Em seguida, os copos plásticos com as plantas, foram distribuídos em bandejas plásticas contendo, em sua base, uma lâmina de água destilada de 10mm. As bandejas foram dispostas em sala de

crescimento sob temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de $20\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Diariamente, foi verificada a umidade no interior dos copos e, quando necessário, foram acrescentados 10 mL de água destilada para manter o turgor hídrico das plantas.

2º período de aclimatização *ex vitro* (7 dias em sala de crescimento, com os copos abertos)

Decorridos sete dias desde o início da aclimatização foram retiradas as coberturas dos recipientes, em seguida foi realizada a avaliação do 1º período de aclimatização *ex vitro*, sendo consideradas as variáveis: porcentagem de sobrevivência (plantas com coloração verde), número de folhas por planta, porcentagem de clorose foliar (amarelecimento das folhas) e incremento em altura das plantas (cm). Os copos foram dispostos, novamente, em sala de crescimento, onde permaneceram por mais 7 dias e foi realizada a avaliação do 2º período de aclimatização *ex vitro*, sendo consideradas as variáveis: porcentagem de sobrevivência (plantas com coloração verde), número de folhas por planta, porcentagem de clorose foliar (amarelecimento das folhas) e incremento em altura das plantas (cm).

3º período de aclimatização *ex vitro* (28 dias em casa de vegetação)

A seguir, aos 21 dias de aclimatização, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação. Em seguida, foram acondicionadas em vasos plásticos, com capacidade para 1 L, os quais foram totalmente preenchidos com substrato [mistura de vermiculita e substrato comercial, à base de casca de pinus, corretivo de acidez, fertilizantes minerais, na proporção 1:1 (v/v)]. Os vasos foram dispostos em casa de vegetação, onde permaneceram por mais 28 dias, e então foi realizada a avaliação do 3º período de aclimatização *ex vitro*, sendo consideradas as variáveis: porcentagem de sobrevivência (plantas com coloração verde), número de folhas por planta, porcentagem de clorose foliar (amarelecimento das folhas) e incremento em altura das plantas (cm), totalizando 49 dias de aclimatização *ex vitro*.

4.3.6 Análises estatísticas

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias, pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi realizado teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro para os tratamentos qualitativos e análise de regressão polinomial, para os quantitativos. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

4.4 Resultados e discussões

4.4.1 Análise da qualidade sanitária de dois lotes de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento

Houve efeito significativo da interação entre os dois fatores principais, período de armazenamento e lotes, para os gêneros fúngicos *Alternaria* sp. (p=0,0000), *Botrytis* sp. (p=0,0000), assim, como também, para *Curvularia* sp. (p=0,0002), *Phoma* sp. (p=0,0432), *Rhizoctonia* sp. (p=0,0028) e *Rhizopus* sp. (p=0,0198) (Tabela 5). Já para *Aspergillus* sp. (17%), *Eppiccocum* sp. (30,7%), *Fusarium* sp. (23%) e *Penicillium* sp. (0,75%) não houve efeito significativo dos fatores principais lotes e período de armazenamento, nem da interação entre eles.

Tabela 5 - Porcentagem média de incidência dos gêneros fúngicos identificados nas sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, avaliadas no teste de sanidade, em função da interação entre os dois períodos de armazenamento e os lotes 2011 ou 2013. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Lote	-----Gênero fúngico-----					
	<i>Alternaria</i> sp.		<i>Botrytis</i> sp.		<i>Curvularia</i> sp.	
	-----Período*-----					
	1	2	1	2	1	2
Lote 2011	63,0 Bb**	14,0 Aa	0,0 Aa	19,0 Bb	0,0 Aa	4,0 Aa
Lote 2013	7,0 Aa	65,0 Bb	4,0 Aa	1,5 Aa	41,0 Bb	11,0 Aa
IV	8,48		17,92		12,55	
Média	37,25		6,12		14,0	

Lote	-----Gênero fúngico-----					
	<i>Phoma</i> sp.		<i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>Rhizophus</i> sp.	
	-----Período-----					
	1	2	1	2	1	2
Lote 2011	26,0 Ba	0,0 Aa	22,0 Aa	15,0 Aa	39,0 Aa	52,5 Aa
Lote 2013	22,0 Aa	17,0 Ab	11,0 Aa	58,0 Bb	58,0 Ab	98,0 Bb
IV***	14,60		17,15		4,36	
Média	16,25		26,5		61,87	

*1= primeiro período de armazenamento e, 2= segundo período de armazenamento, após oito meses.
 Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. As letras 'a' e 'A', representam o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. *IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Houve incidência do gênero fúngico *Alternaria* sp. nos dois lotes avaliados e, também, nos dois períodos, sendo que no lote 2011, a maior incidência foi no primeiro período de avaliação (63%), reduzindo-se no segundo período; já no lote 2013, a maior média foi observada no segundo período de avaliação (65%). Para *Botrytis* sp. e *Curvularia* sp. houve incidência nos dois lotes avaliados, porém no lote 2011, esses gêneros fúngicos estiveram presentes apenas no segundo período de avaliação. Em relação à *Curvularia* sp., no Lote de 2013, da mesma maneira que foi observado em relação à *Alternaria* sp. no Lote 2011, houve uma redução em sua

incidência no segundo período de avaliação. Sugere-se que tenha havido o controle desse gênero por algum outro fungo com ação antagonista.

Phoma sp. contaminou sementes do lote de 2013 nos dois períodos de avaliação, porém no lote de 2011, apenas no primeiro período avaliado foi observada a presença deste gênero fúngico, de maneira semelhante ao que ocorreu em relação a *Alternaria* sp. e *Curvularia* sp., e que foi comentado anteriormente. Para *Rhizoctonia* sp., o lote 2013 mostrou aumento na incidência desse gênero fúngico no segundo período de avaliação, enquanto que, no lote 2011, a porcentagem desse gênero fúngico não diferiu significativamente após oito meses de armazenamento em refrigerador.

O gênero *Rhizopus* sp. apresentou elevada porcentagem média de ocorrência (61,87%) nos dois lotes observados, sendo que o lote 2013, em especial, apresentou elevada incidência desse gênero fúngico no segundo período de avaliação (98%). Já o lote 2011 apresentou médias de incidência que não diferiram significativamente (39 e 52,5%) entre si no primeiro e segundo período avaliados respectivamente.

No primeiro período de avaliação observou-se, que, no lote 2013, houve maior incidência de gêneros fúngicos associados às sementes de *H. chrysotrichus*, sendo observada a ocorrência de nove gêneros diferentes e, oito para o lote 2011. Para o segundo período constatou-se a ocorrência de nove gêneros de fungos para cada lote. Dessa maneira, pode-se dizer que no presente estudo, os dois lotes foram afetados significativamente por diversos gêneros fúngicos, esse fator pode contribuir para a redução na qualidade fisiológica das sementes.

Em estudo com sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), avaliadas em dois períodos de armazenamento foram identificados em maior incidência: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Epicoccum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. e *Rhizoctonia* sp., e constatou-se que alguns gêneros fúngicos identificados imediatamente após o beneficiamento das sementes, não persistiram após seis meses de armazenamento, bem como as sementes foram infestadas por novos gêneros fúngicos durante o período armazenamento (LEÓN, 2014). Essa variação na ocorrência dos gêneros fúngicos pode ser explicada, como sendo consequência das características dos frutos que abrigam as sementes, e, principalmente, da forma como foram coletadas, beneficiadas e armazenadas

(FERREIRA, 1989), incluindo-se nessa questão, a presença de gêneros fúngicos que se controlam mutuamente.

Outro estudo realizado com sementes de *H. chrysotrichus* apontou a ocorrência de nove gêneros fúngicos em duas amostras testadas, a saber: *Cladosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Epicoccum* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Chaetomium* sp. e *Rhizoctonia* sp. (MACIEL et al., 2012). De maneira semelhante, em outro teste de sanidade realizado com duas amostras de sementes de *H. chrysotrichus* foram detectados oito gêneros de fungos, cinco dos quais potencialmente fitopatogênicos (*Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Cladosporium*, sp., *Phoma* sp. e *Phomopsis* sp.) e outros dois saprófitos (*Epicoccum* sp. e *Aspergillus* sp.) (FANTINEL et al., 2013).

Em estudo realizado objetivando avaliar a qualidade sanitária de sementes de *Tabebuia serratifolia* (ipê-do-cerrado) em períodos distintos, constatou-se a presença dos gêneros: *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp. e *Rhizopus* sp. De maneira semelhante ao observado no presente estudo, em outro trabalho com sementes de *Tabebuia serratifolia* (ipê-do-cerrado), *Rhizopus* sp. foi um dos gêneros fúngicos de maior ocorrência, atingido mais de 50% das amostras avaliadas, após o armazenamento em câmara fria (SILVA, et al., 2008). Este gênero fúngico está no grupo dos fungos classificados como de armazenamento, e está associado à deterioração e perda de viabilidade das sementes, pois se localiza preferencialmente no embrião (DHINGRA, 1985). Já em sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena), foi avaliado o efeito do período de armazenamento em relação à contaminação das sementes por fungos, e os gêneros *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Curvularia* sp. foram detectados em um lote de sementes armazenado por 2 meses (MENDES et. al, 2011).

Adicionalmente, entre os gêneros de fungos observados na maioria dos ensaios de sanidade em sementes do gênero *Tabebuia*, podem-se citar: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* spp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Diplodia* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., entre outros (SANTOS et al., 2000). Pode-se inferir que a maioria destes gêneros fúngicos são favorecidos pelo processo usual de coleta e beneficiamento de sementes.

Desta forma, o comportamento que os gêneros fúngicos apresentam no presente estudo, pode ser atribuído a diversos fatores tais como, ao comportamento

de cada patógeno em relação ao armazenamento, à presença de agentes antagonistas, bem como a forma com que o processo de coleta, transporte, beneficiamento e armazenamento das sementes é conduzido. Deve ser considerado, igualmente, que esses fungos podem se associar as sementes em todas as etapas de produção, contribuindo para a redução na sua qualidade fisiológica, disseminação de doenças em campo e transmissão para outros locais de produção (OLIVEIRA, 2012).

4.4.2 Análise da qualidade fisiológica de dois lotes de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos em dois períodos de armazenamento

Houve efeito significativo da interação entre o período de armazenamento e lotes, para as variáveis porcentagem de germinação ($p=0,0440$) e IVG ($p=0,0427$) (Tabela 6).

Observa-se, inicialmente, que o Lote 2013 apresentou melhor qualidade fisiológica em ambos os períodos de armazenamento considerados, conforme se esperava. Porém, decorridos oito meses de armazenamento em refrigerador, a porcentagem de germinação, que diminuiu nos dois lotes avaliados, foi mais intensa no lote 2011 (de 45,5% para 8%). Em decorrência disso, o IVG também registrou decréscimo para os dois lotes observados, passados os oito meses de armazenamento. O declínio do IVG constatado para os dois lotes no segundo período de avaliação pode estar vinculado à perda da viabilidade das sementes durante o período de armazenamento.

Além disso, esses valores baixos de germinação após oito meses de armazenamento podem ter sido influenciados pela grande quantidade de gêneros fúngicos detectados nas sementes de *Handroanthus chrysotrichus*, como por exemplo, a alta incidência do gênero *Rhizopus* sp. Este gênero de fungos é considerado de armazenamento e pode ser responsável pela deterioração e perda de viabilidade das sementes (DHINGRA, 1985). Estudos afirmam que, a contaminação fúngica pode influenciar, de maneira direta, na qualidade fisiológica e, até mesmo, inibir completamente a capacidade germinativa das sementes (BOTELHO, et al., 2008; CASTELLANI et al., 1996).

Tabela 6 - Médias de porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, de dois lotes distintos, em dois períodos de armazenamento em refrigerador. UFSM, Santa Maria, RS. 2014.

Lote	Germinação (%)		IVG	
	1	2	1	2
Lote 2011	45,5 Ab**	8,0 Bb	0,40 Ab	0,07 Bb
Lote 2013	66,5 Aa	41,0 Ba	0,59 Aa	0,37 Ba
IV***	3,90		1,44	
Média	40,25		0,36	

*1= primeiro período de armazenamento e, 2= segundo período de armazenamento, após oito meses.
 Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. As letras 'a' e 'A', representam o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. *IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Adicionalmente, no presente estudo, além das diferenças de germinabilidade observadas para período de armazenamento, a porcentagem de germinação das sementes *H. chrysotrichus* foram diferentes entre os dois lotes avaliados, o que pode estar relacionado, a princípio, aos seus genótipos diferenciados, bem como às condições ambientais, como local e época da coleta dessas sementes, condições climáticas durante a maturação, grau de injúria mecânica e secagem, aceleração das atividades respiratórias da semente, elevados teores de umidade, bem como, alterações químicas e fisiológicas da própria semente (NAKAGAWA, 1994; OLIVEIRA, 2012).

Em estudo realizado com sementes de *Tabebuia chrysotricha* (ipê-amarelo) (atualmente denominada *Handroanthus chrysotrichus* após sofrer uma revisão taxonômica), os melhores resultados foram obtidos quando foram armazenadas à temperatura de 10°C, porém a partir dos 60 dias de armazenamento, a viabilidade das sementes foi reduzida (MARTINS, et al., 2009). Em outro trabalho que investigou a viabilidade das sementes dessa espécie, os autores afirmaram que as sementes podem ser conservadas, sem prejuízo, em geladeira a 10 °C por aproximadamente 150 dias (CARVALHO et al., 1976).

Em sementes de *Tabebuia serratifolia* (ipê-do-cerrado) foram testadas diferentes condições de armazenamento (câmara, laboratório e geladeira), e ocorreu diminuição na germinação das sementes com o decorrer do tempo, independentemente da forma de armazenamento, indicando que ocorre perda, apesar das diferentes técnicas de armazenagem (SOUZA et al., 2005). Para esta mesma espécie, outro estudo indicou que a germinação tornou-se nula aos nove meses de armazenamento em ambiente sem condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar (SILVA et al., 2011).

Em contrapartida, alguns trabalhos relataram aumento no percentual germinativo das sementes durante o armazenamento, como em sementes de *Tabebuia aurea* (ipê-amarelo-do-cerrado), armazenadas em câmara fria, em que foram observados altos percentuais de germinação, variando de 88% a 97%, e foi constatado que a viabilidade das sementes foi mantida por até 120 dias (CABRAL et al., 2003). Em outro estudo com a mesma espécie, após armazenamento das sementes durante 360 dias, em geladeira com temperatura de 13°C, o percentual de germinação foi de 99% (NEVES et al., 2014).

De maneira geral, as sementes de *H. chrysotrichus* são consideradas ortodoxas e, por isso, o armazenamento em condições de ambiente seco e frio deve ser efetivo na manutenção da sua qualidade fisiológica (WETZEL, et al., 2003), porém, alguns trabalhos apontam que as sementes desse gênero têm tendência à perda de viabilidade em condições de armazenamento (CABRAL et al., 2003; MAEDA & MATHES, 1984; MARTINS et al., 2009; SOUZA et al., 2005), o que requer estudos mais aprofundados sobre a viabilidade das sementes de *H. chrysotrichus* após a colheita.

4.4.3 Efeito de antioxidantes no controle da oxidação fenólica no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

Para a variável sobrevivência houve efeito significativo apenas do fator principal antioxidante ($p=0,0318$), os demais fatores, isolados e as suas interações, não apresentaram efeitos significativos. O IV da variável foi 3,73 (Tabela 7).

Tabela 7 - Sobrevivência média (%) de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos, aos 28 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), em função dos diferentes antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado), independentemente do período de avaliação e idade dos explantes. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tratamento	Sobrevivência (%)
Testemunha	94,77 b*
PVP	98,94 a
Carvão	98,38 a
Média (%)	97,55
IV (%)**	3,73

* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Dentre os tratamentos testados, as maiores médias de sobrevivência foram observadas com o uso dos antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado. A inclusão de substâncias antioxidantes ao meio nutritivo tem sido relatada por diversos autores, como uma condição indispensável para o cultivo *in vitro* de algumas espécies lenhosas (CORDEIRO, et al., 2004) nas quais a sobrevivência e estabelecimento *in vitro* são dificultados pela liberação de exsudados derivados da oxidação de compostos fenólicos (WENDLING et al., 2006). Em estudo realizado com *Schizolobium amazonicum* (Paricá), foi observado que os segmentos nodais cultivados em meio MS acrescido de polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado apresentaram alta porcentagem de sobrevivência dos explantes (CORDEIRO, 2002).

A análise da variável número de folhas (IV= 11,09%) evidenciou efeito significativo para o fator principal antioxidante (p=0,0000), e, também, para a interação deste fator com o período de avaliação (p=0,0000) (Figura 8). Os demais fatores, isolados e as suas interações, não apresentaram efeitos significativos.

A presença do antioxidante PVP no meio nutritivo favoreceu a formação de maior número de folhas por explante (9,20), a qual aumentou, de maneira linear,

durante os 28 dias de cultivo *in vitro*. Em vista disso, a resposta apresentada pelos segmentos nodais de *H. chrysotrichus* em relação à formação de folhas, pode ser atribuída ao maior controle da oxidação pelo uso do PVP. Em trabalho realizado com *Syagrus oleracea* (guarirobeira) (família *Arecaceae*) os resultados foram semelhantes ao observado no presente estudo, em que o PVP foi o antioxidante que permitiu a formação do maior número médio de folhas (3,27) em plântulas de guarirobeira cultivadas *in vitro* (MELO et al., 2001). O PVP também se mostrou eficiente para o incremento do número de folhas em segmentos nodais de *Leucadendron* sp. (safari-do-sol) (SUÁREZ et al., 2010).

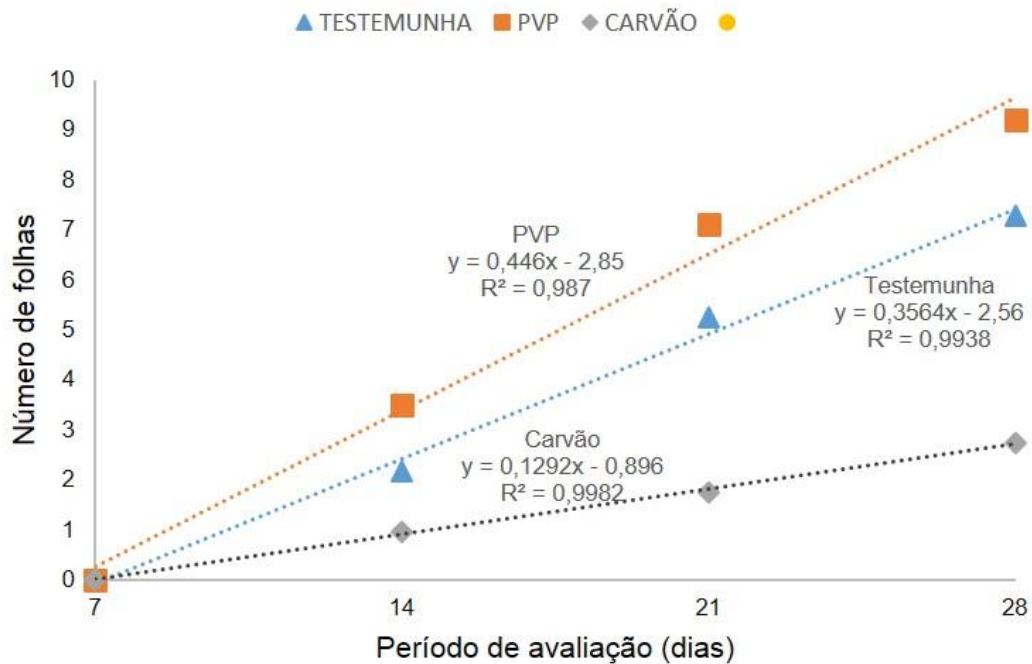


Figura 8 - Número médio de folhas formadas em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, em função da interação entre os diferentes antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado) e o período de avaliação (7, 14, 21 ou 28 dias), independentemente da idade dos explantes (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Não houve efeito significativo dos fatores testados e nem da interação para a clorose foliar (IV=20,93%), sendo observada uma média geral de 36,21%. A clorose foliar é evidenciada pelo amarelecimento das folhas e pode causar redução no crescimento das brotações (WENDLING et al., 2006).

Para o carvão ativado, houve um ajuste linear crescente, o número médio de folhas foi de 2,75 aos 28 dias de avaliação, valor inferior ao observado para o antioxidante PVP (Figura 8). Em *Syagrus oleracea* (guarirobeira), o carvão ativado provocou uma redução no desenvolvimento dos explantes aos 15 dias de cultivo *in vitro* (MELO et al., 2001). Resultado semelhante foi observado no caso de *Pistacia vera* (pistache) e *Pistacea atlântica* (carvalho-pistache) (MEDEROS-MOLINA; TRUJILLO, 1999). Isso pode estar associado ao fato do carvão ativado não ser um composto seletivo e ter efeito adsorvente (ZHOU et al., 2010), desse modo, podendo ter imobilizado parte dos elementos que compõem o meio nutritivo e adsorvido alguma substância essencial para o desenvolvimento e incremento do número de folhas.

Para a variável oxidação fenólica houve efeito significativo dos fatores isolados antioxidante ($p=0,0049$), período de avaliação ($p=0,0000$), idade dos explantes ($p=0,0000$) e, também, da interação dupla entre os fatores antioxidantes e idade dos explantes ($p=0,0001$), e da interação entre antioxidantes e período de avaliação ($p=0,0034$), indicando respostas diferenciadas dos explantes em relação aos tratamentos testados. O IV foi de 7,65%. Na Figura 9 está apresentada a curva de regressão ajustada para a interação entre antioxidantes e período de avaliação. Na Tabela 8, a interação entre antioxidantes e idade dos explantes.

Quando foi analisada a interação entre os fatores antioxidantes e período de avaliação, aos 7 dias de cultivo *in vitro*, os explantes oxidaram em maior porcentagem em todos os tratamentos. No entanto, no decorrer das demais avaliações verificou-se um comportamento contrário, havendo um decréscimo linear nas porcentagens médias de oxidação fenólica dos explantes. Apenas para o antioxidante carvão ativado, houve um ajuste quadrático, sendo que, de acordo com o cálculo da MET, a menor porcentagem de oxidação para este tratamento ocorreria aos 17 dias de cultivo *in vitro* (Figura 9).

Explantes de espécies lenhosas são bastante suscetíveis ao escurecimento *in vitro* o qual pode ser atribuído à liberação de exsudados derivados da oxidação de compostos fenólicos, resultado direto do estresse causado pela injúria nos tecidos e de reações químicas induzidas por enzimas, que modificam a composição do meio nutritivo e prejudicam o cultivo *in vitro* (ANDRADE et al., 2000).

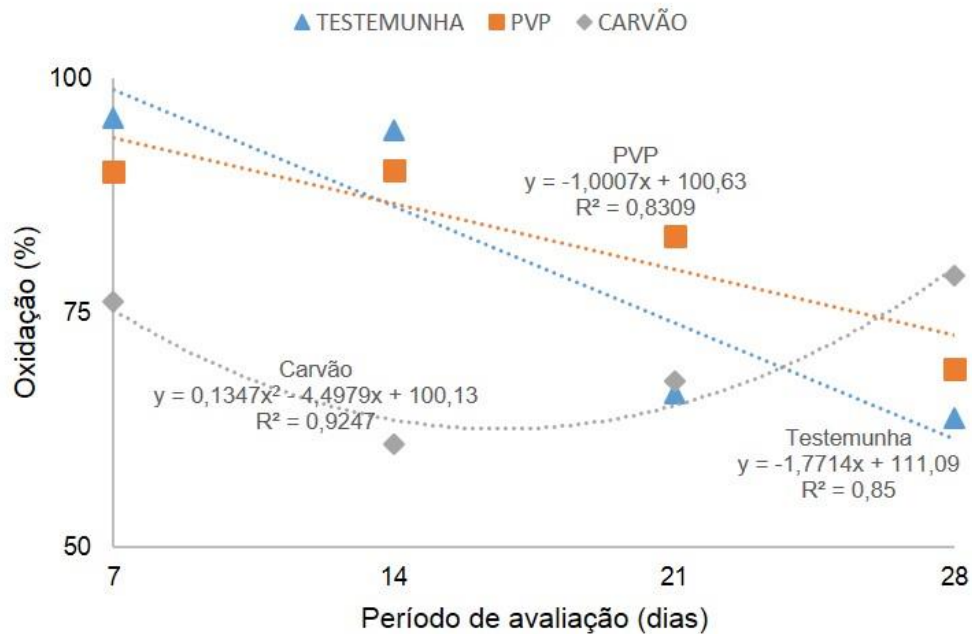


Figura 9 - Porcentagem média de oxidação fenólica em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, em função da interação entre os diferentes antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado) e o período de avaliação (7, 14, 21 ou 28 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

A ocorrência de compostos fenólicos, geralmente, está relacionada com a redução nas médias de estabelecimento e desenvolvimento dos explantes mantidos sob condições de cultivo *in vitro* (BASSAN et al., 2006). Em estudo realizado anteriormente visando a micropropagação de *H. chrysotrichus* foram observadas elevadas taxas de oxidação fenólica, em várias etapas do processo de multiplicação *in vitro*. Apesar disso, o desenvolvimento *in vitro* dos explantes não foi comprometido na maioria dos ensaios (PAIM, 2014). Da mesma forma, no presente estudo, apesar da elevada porcentagem de oxidação fenólica observada aos 7 dias de cultivo *in vitro*, no decorrer dos 28 dias de avaliação a oxidação regrediu consideravelmente até o final do experimento.

Na ausência de antioxidantes no meio nutritivo, ao longo dos 28 dias de avaliação observou-se uma diminuição na porcentagem de oxidação, ajustando-se a um modelo linear decrescente. Esse resultado pode ser considerado satisfatório levando-se em consideração o aspecto econômico, visto que a adição de

substâncias antioxidantes ao meio nutritivo pode aumentar o custo da produção *in vitro*.

Em relação ao acréscimo de carvão ativado no meio nutritivo, no presente estudo, a porcentagem de oxidação fenólica apresentada pelos explantes aos 7 dias de cultivo pode ser considerada elevada. Entretanto, nas avaliações seguintes foi observado um comportamento decrescente a partir dos 14 dias e, aumentando novamente aos 28 dias de cultivo *in vitro*.

Foi possível observar, por meio da avaliação visual, que na presença de carvão ativado, alguns explantes apresentaram clorose foliar e redução no desenvolvimento *in vitro* (Figura 10), porém a análise estatística não evidenciou diferenças significativas para esta variável. Resultado semelhante foi observado para *Syagrus oleracea* (guarirobeira), em que o carvão ativado provocou uma redução no desenvolvimento dos explantes, no entanto este foi eficiente no controle da oxidação fenólica aos 15 dias de cultivo *in vitro* (MELO et al., 2001).

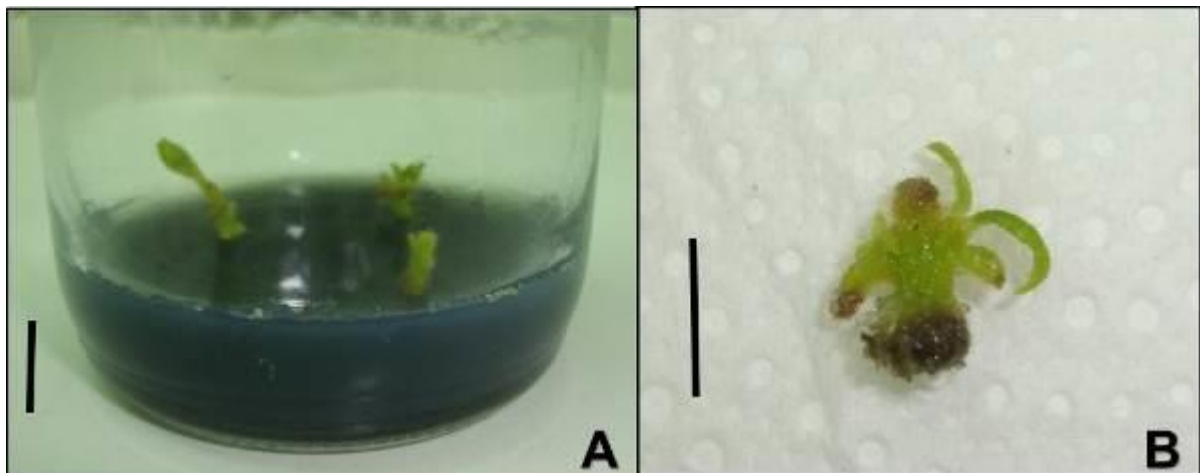


Figura 10 - A) Brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos (ipê-amarelo), aos 28 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM e adição de 1 gL^{-1} de carvão ativado apresentando sinais de clorose e pouco desenvolvimento *in vitro*; B) Explante com aspecto clorótico. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Para *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), o carvão ativado foi o tratamento que melhor controlou a oxidação de discos foliares, aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Da mesma maneira, em *Musa* spp. (bananeira) a adição de carvão ativado ao meio de nutritivo reduziu significativamente a taxa de multiplicação, porém controlou

efetivamente o nível de oxidação das brotações mantidas sob condições *in vitro* aos 30 dias (COSTA, et al., 2006). Esses resultados reforçam a ideia de que o carvão ativado adicionado ao meio nutritivo pode agir promovendo adsorção dos exsudatos liberados pelo explante evitando a oxidação fenólica (MELO, et al., 2001), bem como, pode também adsorver alguma substância essencial para o desenvolvimento das culturas, afetando o desenvolvimento *in vitro* (SILVEIRA, 2014).

Ainda em relação à porcentagem de oxidação fenólica, quando foi analisada a interação dupla entre os agentes antioxidantes e a idade dos explantes, observou-se que, explantes com 30 dias de idade, cultivados na presença de carvão ativado apresentaram menor porcentagem média de oxidação quando comparados aos explantes com 60 dias de idade (Tabela 8). Entretanto, quando foi empregado PVP ou nenhum antioxidante (testemunha), não foi observada diferença significativa na oxidação fenólica em explantes com 30 e 60 dias de idade. Explantes com 30 dias de idade também tiveram sua oxidação fenólica controlada com o emprego de carvão ativado, o que não ocorreu com o emprego de PVP e no tratamento testemunha, cujas médias de oxidação não diferiram significativamente entre si, e foram superiores a 75%.

A liberação de exsudados derivados da oxidação de compostos fenólicos no meio nutritivo tem influência direta do genótipo e do tipo de explante utilizado. Tecidos jovens em geral oxidam menos que os mais velhos (TEIXEIRA, 2006). De maneira geral, a fase de desenvolvimento do material vegetal utilizado pode influenciar no processo de sobrevivência, estabelecimento e multiplicação das culturas *in vitro*, segmentos nodais de idade mais avançada não são indicados como fonte de explantes, devido ao processo de oxidação fenólica que pode ocorrer nesses segmentos (VIEITEZ, 1980). Em estudo realizado com *Caesalpinia echinata* Lam (pau-brasil), explantes em fase jovem, apresentaram maiores níveis de substâncias oxidantes e menor porcentagem de sobrevivência e estabelecimento em relação aos explantes que se encontravam em fase juvenil (WERNER, et al., 2009). Frente ao exposto, para maior controle da oxidação fenólica *in vitro*, deve-se optar por brotações fisiologicamente ativas em estágio primário de crescimento (OLIVEIRA, et al., 2013).

Tabela 8 – Oxidação fenólica (%) de segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart ex DC.) J. Mattos, aos 28 dias de cultivo, em meio nutritivo WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), em função da interação entre antioxidantes (polivinilpirrolidona ou carvão ativado) e idade dos explantes (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tratamento	-----Idade do explante-----		Média (%)
	30 dias	60 dias	
Testemunha	76,92 Ab*	83,25 Aa	80,08
PVP	78,17 Ab	88,06 Aa	83,11
Carvão	46,83 Aa	95,04 Ba	70,93
Média (%)	67,30	88,78	78,04
IV (%)**	7,65		

* médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação

e N= número de repetições.

Com isso, torna-se necessária a realização de novos ensaios objetivando testar outros agentes antioxidantes, além de verificar outras faixas de concentrações destes.

4.4.4 Efeito do ágar na rizogênese *in vitro* de brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

Em relação à sobrevivência *in vitro* (IV= 10,11%) das brotações houve efeito significativo para o fator concentração de ágar no meio nutritivo ($p=0,0038$) (Tabela 9). Os tratamentos contendo ágar na concentração de 7 g L⁻¹ e ausência de ágar, forneceram os melhores resultados, sendo verificada uma elevada porcentagem de sobrevivência *in vitro* (100%) das brotações nestas condições. O tratamento contendo ágar na concentração de 3,5 gL⁻¹, apresentou média de porcentagem de sobrevivência *in vitro* mais reduzida (69,23%) quando comparada à média

observada nos demais tratamentos. De maneira semelhante, em outro estudo analisando o enraizamento *in vitro* de *H. chrysotrichus*, foram observadas elevadas porcentagens de sobrevivência *in vitro* das brotações em ensaio realizado em meio nutritivo ½WPM na presença de vermiculita e 7g L⁻¹ de ágar (PAIM, 2014). Da mesma forma, para a rizogênese *in vitro* de *Peltophorum dubium* (canafístula), foram observadas elevadas médias de sobrevivência *in vitro* das brotações (superiores a 90%), independentemente dos substratos (vermiculita, Plantmax® ou areia fina, combinados a presença ou ausência de ágar) adicionados ao meio nutritivo MS acrescido de 10 µM de AIB (CURTI; REINIGER, 2014).

Tabela 9 - Médias de porcentagem de sobrevivência, formação de raízes primárias e raízes secundárias em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart ex DC.) J. Mattos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo 'Wood Plant Medium' (WPM) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½WPM), em função das concentrações ágar acrescidas ao meio, combinadas com 3,8 g de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tratamento	Sobrevivência (%)	Raízes primárias (%)	Raízes secundárias (%)
½WPM+vermiculita+7 gL ⁻¹ ágar	100,00 a*	69,23 b	38,89 b
½WPM+vermiculita+3,5 gL ⁻¹ ágar	69,23 b	94,44 a	30,77 b
½WPM+vermiculita	100,00 a	100,00 a	84,61 a
Média (%)	90,9	88,64	50,00
IV (%)**	10,11	11,98	8,75

* médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. **IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Para a indução *in vitro* de raízes primárias (IV= 11,98%) e raízes secundárias (IV= 8,75%) foi verificado efeito significativo das concentrações de ágar testadas (Tabela 9). O tratamento que não incluiu ágar forneceu os melhores resultados tanto para formação *in vitro* de raízes primárias (100%) quanto de secundárias (84,61%) (Figura 11C). O tratamento contendo ágar na concentração 3,5 gL⁻¹, promoveu alta porcentagem de raízes primárias (94,44%), porém não favoreceu a formação *in vitro*

de raízes secundárias (30,77%) (Figura 11B). Já o tratamento contendo ágar na concentração 7 g L^{-1} mostrou-se menos favorável à formação de raízes primárias (69,23%) e a porcentagem de raízes secundárias também foi reduzida (38,89%) nesta condição. Foi possível observar, ainda, que devido à presença de ágar no meio nutritivo, a vermiculita ficou fortemente aderida às raízes (Figura 11A). Por se tratar de uma espécie lenhosa, esses resultados podem ser considerados promissores e constituem um grande avanço para o cultivo *in vitro* da espécie, visto que muitas espécies apresentam inúmeras dificuldades nessa fase de cultivo. Resultado semelhante foi obtido em *Prunus cerasifera* (pessegueiro), em que os tratamentos consistiram de 7 g L^{-1} de ágar ou 200 g L^{-1} de vermiculita adicionados ao meio MS combinados com 0; 2,46; 4,92 e $7,38 \text{ } \mu\text{M}$ de AIB e foi possível substituir o ágar por vermiculita, obtendo-se uma porcentagem de rizogênese *in vitro* superior a 90%, após 35 dias de cultivo (VIAGANÓ et al., 2007).

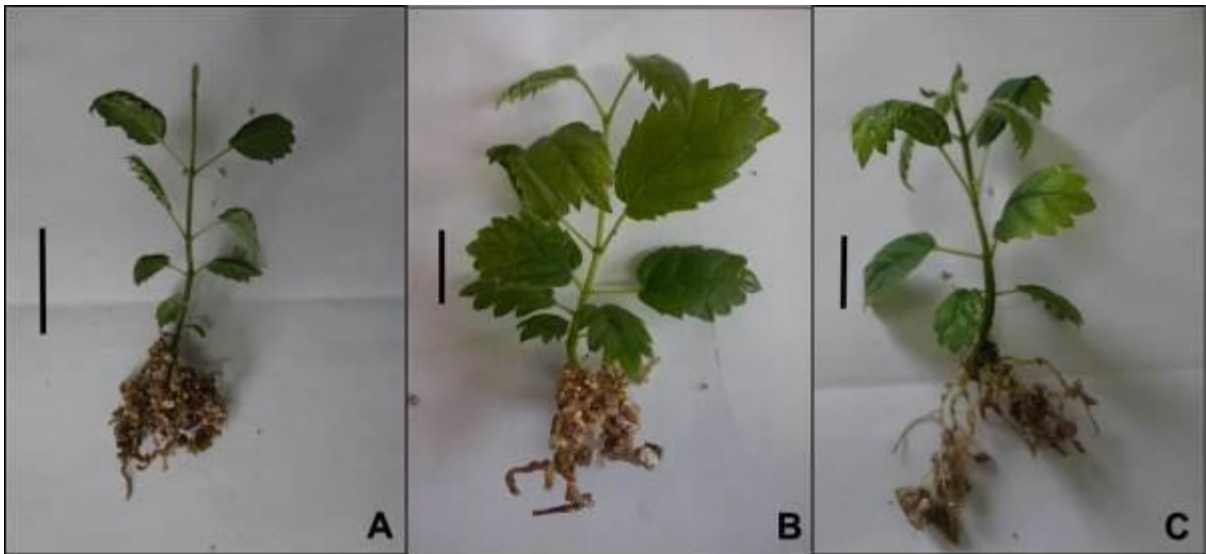


Figura 11 - Rizogênese *in vitro* em brotações de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, após 30 dias de cultivo *in vitro*. A) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita e 7 g L^{-1} ágar; B) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita e $3,5 \text{ g L}^{-1}$ ágar; e C) Formação de raízes em brotação subcultivada *in vitro* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM, acrescido de vermiculita na ausência de ágar. Barra=1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Para *Malus pumilla* (macieira), foram incorporados ao meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS três tipos de substratos (ágar, vermiculita e cinza vegetal), na presença de vermiculita

foram observadas mais de 80% das miniestacas enraizadas, e a porcentagem de formação de raízes secundárias foi de 71,6%, após 35 dias de cultivo *in vitro* (VIEIRA et al., 2007). Dessa forma, é possível inferir que a utilização de suportes físicos porosos, como a vermiculita umedecida com solução nutritiva, contribui para uma formação mais satisfatória de raízes devido a maior aeração e retenção de água no meio nutritivo (CALDAS, 1990). A aeração do meio nutritivo é importante para a formação de raízes adventícias, sendo que Zimmerman e Broome (1979), por exemplo, obtiveram melhores resultados com o uso de vermiculita adicionada ao meio nutritivo, ao invés de ágar, no enraizamento de diversas macieiras.

Já para *Peltophorum dubium* (canafístula), a maior porcentagem de enraizamento *in vitro*, foi atingida com a combinação de vermiculita e ágar adicionados ao meio nutritivo MS, após 60 dias de cultivo *in vitro* das brotações, sendo observada uma média de 36,78% de brotações com raízes (CURTI, REINIGER, 2014). Nos meios sólidos e semi-sólidos, o ágar é o agente solidificante tradicionalmente utilizado. Porém, diversos autores citam problemas na qualidade do sistema radicular formado na presença de ágar (VIEIRA et al., 2007). Além disso, dentre os componentes do meio nutritivo, o ágar é a substância de maior custo (LEITE, 1995). Desta forma, o uso de outros suportes físicos adicionados ao meio nutritivo pode ser uma alternativa mais barata que visa reduzir o custo da produção *in vitro*.

Para o comprimento médio de raízes (IV=60,10%) e número de folhas por brotação (IV= 13,20%) não foi verificado efeito significativo do fator concentração de ágar, sendo obtidas médias de 2,13 cm e 7,89, respectivamente. Em estudo anterior com *H. chrysotrichus* foi utilizado o meio $\frac{1}{2}$ WPM acrescido de vermiculita e foi obtido um comprimento médio de raízes de 0,92cm (PAIM, 2014). Alguns autores indicam que o comprimento médio de raízes mais adequado é de 2 a 3 cm, pois, dependendo do diâmetro do frasco e do número de explantes cultivados, as raízes podem enovelar-se entre si (ROCHA, et al, 2006). Em decorrência disso, as raízes mais curtas são as mais adequadas para o transplântio, pelo fato das mesmas se encontrarem em fase de crescimento ativo, facilitarem a retirada do meio nutritivo aderido e evitarem a quebra (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

4.4.5 Aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos

1º Período de aclimatização *ex vitro* (7 dias em sala de crescimento, com os copos cobertos)

No 1º período de aclimatização *ex vitro* das plantas de *H. chrysotrichus* propagadas *in vitro*, no qual ocorreu a transferência para o substrato das mudas que apresentaram raízes bem formadas, provenientes do experimento 4.2.4, as variáveis sobrevivência (IV=9,49%), número de folhas (IV=9,38%), clorose (IV=55,53%) e altura das plantas (IV=13,29%), não foram afetadas de maneira significativa pelo fator concentração de ágar. Aos 7 dias de aclimatização *ex vitro* foi observada uma média de 100% de sobrevivência das plantas. O número médio de folhas por explante foi de 7,55. Para clorose foliar a porcentagem média foi de 25% e para altura, a média observada foi de 3,29 cm. Pode-se observar, nesta etapa, que as plantas responderam de forma positiva ao gradual processo de aclimatização (Figura 12A).

2º período de aclimatização *ex vitro* (7 dias em sala de crescimento, com os copos abertos)

O 2º período de aclimatização *in vitro* das plantas de *Handroanthus chrysotrichus* ocorreu 7 dias após a retirada da cobertura dos recipientes, sendo que as plantas ainda estavam sendo cultivadas em sala de crescimento, com ambiente controlado. Neste momento, as variáveis sobrevivência (IV=11,92%), número de folhas (IV=11,73%) e clorose (IV=56,11%) apresentaram efeito significativo para o fator concentração de ágar (Tabela 10). Para a altura das plantas (IV=16,05%), não foi verificado efeito significativo do fator principal, sendo que a média geral foi de 3,3 cm.

A porcentagem de sobrevivência, no 2º período de aclimatização *ex vitro*, levando-se em consideração os tratamentos do ensaio de rizogênese *in vitro*, pode ser considerada alta nesta etapa, os tratamentos com ausência e ágar na concentração 3,5 gL⁻¹ proporcionaram 100% de sobrevivência das plantas. Já o tratamento com a maior concentração de ágar, apresentou uma média de sobrevivência inferior (72,22%). Esta resposta pode estar relacionada ao fato de que

as raízes desenvolvidas na presença de ágar geralmente são quebradiças e não possuem pelos absorventes (ROCHA, et al, 2006). Deve-se considerar, também, que a ausência de raízes secundárias em plantas micropropagadas pode ser atribuída, muitas vezes, à presença de ágar (VIAGANÓ et al., 2007). Dessa maneira, a baixa funcionalidade do sistema radicular formado no meio de enraizamento *in vitro* pode resultar em morte das mudas na fase de aclimatização (LANE, 1992). Em *Peltophorum dubium* (canafístula), foi observado que plantas desprovidas de raízes secundárias não foram capazes de enraizar e sobreviver durante a fase de aclimatização em sala de crescimento (CURTI, 2014).

Tabela 10 - Médias de porcentagem de sobrevivência, número de folhas e porcentagem de clorose foliar em mudas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) J. Mattos, 7 dias após a retirada da cobertura dos recipientes e 14 dias de aclimatização *ex vitro* em sala de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tratamento	Sobrevivência (%)	Número de folhas	Clorose (%)
½WPM+vermiculita+7gL ⁻¹ ágar*	72,22 b**	5,83 b	11,11 a
½WPM+vermiculita+3,5gL ⁻¹ ágar	100,00 a	9,33 a	11,11 a
½WPM +vermiculita	100,00 a	9,85 a	46,15 b
Média (%)	87,5	7,92	22,5
IV (%)***	11,92	11,73	56,11

*tratamentos provenientes do ensaio anterior de rizogênese *in vitro* **médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ***IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

O número de folhas por planta também foi influenciado significativamente pelos tratamentos do ensaio de rizogênese, assim como ocorreu com a sobrevivência, em que o tratamento com ausência de ágar e aquele em que o ágar estava presente na concentração 3,5 gL⁻¹ foram os que mostraram os melhores resultados (Figura 12B e C). Esse resultado permite inferir que, provavelmente, as plantas que formaram um maior número de folhas, foram as mesmas que apresentaram formação de raízes secundárias no ensaio de rizogênese *in vitro*, visto

que estas estruturas são fundamentais para se obter um sistema radicular eficiente e capaz de captar nutrientes para o crescimento e desenvolvimento da muda.

Contrariamente, para a clorose foliar, nesta etapa de aclimatização, maior porcentagem foi observada nas plantas provenientes do tratamento em que o ágar esteve ausente (46,15%), a qual diferiu significativamente dos outros dois tratamentos que incluíam o agente gelificante. O aparecimento de clorose foliar pode sinalizar algum tipo de estresse que a planta está sofrendo (WENDLING et al., 2006). Neste caso, a clorose e uma eventual posterior senescência foliar pode ser uma resposta natural das plantas, visando garantir a manutenção mínima das suas funções vitais (LEÓN, 2014). Entretanto, deve-se esclarecer que a incidência de clorose foliar observada nesta etapa, não impediu o processo de aclimatização *ex vitro* das plantas.

3º período de aclimatização *ex vitro* (28 dias em casa de vegetação)

No 3º período de aclimatização *ex vitro*, apenas a variável número de folhas (IV=19,4%) apresentou efeito significativo para o fator concentração de ágar. Observou-se maior número de folhas (13,08) nas plantas provenientes dos tratamentos em que o ágar não foi adicionado ao meio nutritivo (Tabela 11) (Figura 12 D, E e F). Um maior número de folhas formadas nesta etapa contribui para o processo de adaptação às condições ambientais, visto que elas desempenham importante papel no processo da fotossíntese.

Tabela 11 - Número de folhas em plantas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos, aos 28 dias de aclimatização em casa de vegetação, em função das concentrações de ágar acrescentadas ao meio, combinadas com 3,8 g de vermiculita provenientes do ensaio de rizogênese *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Tratamento	Número de folhas
½WPM+vermiculita+7gL ⁻¹ ágar*	8,31 b**
½WPM+vermiculita+3,5gL ⁻¹ ágar	8,89 b
½WPM +vermiculita	13,08 a
Média (%)	10,23
IV (%)***	14,71

*tratamentos provenientes do ensaio anterior de rizogênese *in vitro* **médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ***IV (Índice de variação) = $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

As variáveis sobrevivência (IV=9,82%), clorose foliar (IV=29,87%) e altura das plantas (IV=15,25%) não foram afetadas de maneira significativa pelo fator concentração de ágar. Apresentando médias de 91,43%, 2,86% e 3,97 cm respectivamente. Cabe ressaltar que a porcentagem de sobrevivência, no 3º período de aclimatização *ex vitro* pode ser considerada alta, haja vista que, em estudo anterior não foi possível promover a aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas de *H. chrysotrichus* de maneira satisfatória (PAIM, 2014). Assim, no presente estudo, pode-se afirmar que as mudas de *H. chrysotrichus* aclimatizadas apresentaram sinais de crescimento e desenvolvimento, bem como, demonstraram adaptação ao ambiente *ex vitro*. Esses resultados mostram que, provavelmente, o sistema radicular formado foi eficiente para suprir as demandas das plantas produzidas.

Para *Malus pumilla* (macieira) foi observada uma média de 93,5% de sobrevivência *ex vitro* das plantas micropropagadas em meio nutritivo contendo vermiculita e cinza vegetal, após 40 dias em estufa. Neste caso, a maior aeração proporcionada ao meio nutritivo com a adição de vermiculita permitiu a indução de raízes ramificadas com presença de pelos absorventes, que são importantes para o sucesso da fase de aclimatização (VIEIRA et al., 2007).

A fase de aclimatização *ex vitro* constitui-se em uma etapa bastante crítica, pois as plantas enraizadas *in vitro* passam de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, tornando-se suscetíveis ao estresse hídrico (XAVIER, et al., 2009). Portanto, a aclimatização deve ser realizada de forma gradual e cuidadosa (ROCHA, et al., 2008), sendo que o sucesso desta fase é dependente de vários fatores, entre os quais pode-se citar, a qualidade das brotações obtidas na fase de enraizamento, a resposta da espécie e, também, a estrutura de aclimatização (XAVIER, et al., 2009) que incluiu temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (OLIVEIRA, et al., 2013).

A aclimatização de *Didymopanax morototoni* (caixeta) foi realizada por meio da abertura gradual dos frascos de cultivo, lavagem das raízes em água corrente, utilização de substrato esterilizado e cobertura das plântulas com garrafas plásticas transparentes, obtendo-se 65% de sobrevivência (MANTOVANI et al., 1999).

Diversos trabalhos relacionados à aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas já foram realizados, em espécies como *Cabralea canjerana* (canjerana) (ROCHA et al., 2007); *Maclura tinctoria* (amora do mato) (GOMES et al., 2010); *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) (RIBAS et al., 2005); *Cydonia oblonga* (marmeleiro); (ERIG, et al., 2004); entre outros, sendo que em todos foi observada elevada taxa de sobrevivência.



Figura 12 - Etapas do processo de aclimatização *ex vitro* de plantas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos (ipê-amarelo). A) 1º período de aclimatização *ex vitro* (7 dias); B) 2º período de aclimatização *ex vitro*, recipientes sem cobertura (14 dias em sala de cultivo); C) mudas aos mudas 21 dias, ainda em sala de cultivo; D) transferência das brotações para a casa de vegetação (21 dias de aclimatização *ex vitro*); E) 3º período de aclimatização *ex vitro* (28 dias em casa de vegetação) e F) mudas após 49 dias de aclimatização *ex vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

4.5 Conclusões

A incidência de alguns gêneros fúngicos, como *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Rhizopus* sp., é afetada significativamente pelo lote e período de armazenamento. Entretanto, a associação

das sementes de *H. chrysotrichus* com outros gêneros fúngicos, como *Aspergillus* sp., *Eppiccocum* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., não é influenciada por nenhum dos fatores avaliados no presente estudo.

A germinação e o índice de velocidade de germinação também foram influenciados significativamente pelo lote e período de armazenamento. O Lote 2013 apresenta melhor qualidade fisiológica em ambos os períodos de armazenamento considerados.

O antioxidante carvão ativado é mais eficiente para promover o controle da oxidação fenólica em segmentos nodais de *H. chrysotrichus*, porém estudos adicionais devem ser efetuados.

É possível obter alta porcentagem de rizogênese *in vitro* e brotações de *H. chrysotrichus* com características adequadas para o processo de aclimatização quando cultivadas na ausência de ágar e com a adição de vermiculita ao meio nutritivo WPM, cujas concentrações de sais foram reduzidas à metade ($\frac{1}{2}$ WPM).

É possível promover a aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas de *H. chrysotrichus*, reduzindo-se o estresse causado pela diferença entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho fornece contribuições para a propagação vegetativa de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos.

Inicialmente, em relação às sementes de *N. megapotamica* verificou-se um elevado teor de água, o que pode justificar a elevada incidência de micro-organismos associados às sementes. Também foi observado que a germinação *in vitro* de sementes de *N. megapotamica* é favorecida em meio nutritivo MS na sua formulação completa de sais.

No que diz respeito à miniestaquia em *N. megapotamica*, as médias obtidas para a formação de raízes ainda são inferiores ao que tem sido registrado na literatura para outras espécies. Todavia, por se tratar de uma espécie florestal nativa do Brasil, que ainda carece de informações quanto à produção de mudas, os resultados podem ser considerados satisfatórios, sendo necessária a realização de estudos adicionais.

Em relação aos estudos com sementes de *Handroanthus chrysotrichus* verificou-se, primeiramente, que a incidência de alguns gêneros fúngicos é influenciada pelo lote e pelo período de armazenamento em refrigerador, enquanto a associação com outros micro-organismos independe desses dois fatores. A germinação e o índice de velocidade de germinação também são influenciados significativamente pelo lote e período de armazenamento, mas o lote mais novo, de 2013, conforme se esperava, apresenta melhor qualidade fisiológica em ambos os períodos de armazenamento considerados.

No que concerne aos estudos de cultura de tecidos com *H. chrysotrichus*, observou-se que o meio nutritivo WPM, cujas concentrações de sais foram reduzidas à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), adicionado de 3,8 g de vermiculita, é eficiente para produzir brotações com raízes adventícias e com características físicas adequadas para promover a aclimatização *ex vitro*. Estes resultados mostram que é possível reduzir consideravelmente o custo de produção de mudas, sem a adição de componentes, como o ágar, que é relativamente caro.

A aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas de *H. chrysotrichus* é bem sucedida, se realizada de forma gradual, que compreende desde a fase de enraizamento das brotações, aclimatização em sala de cultivo e posterior, transplante para casa de vegetação.

Finalmente, devem ser realizados estudos adicionais baseados nas principais respostas obtidas no presente estudo, visando obter resultados satisfatórios para a produção de mudas de qualidade de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

APEL, M. A.; LIMA, M. E. L.; SOUZA, A.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacology**, v. 3, p. 376-383, 2006.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ARAÚJO, E. C.; MENDONÇA, A. V. R.; BARROSO, D. G.; LAMÔNICA, K. R.; SILVA, R. F. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 104-109, 2004.

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

BARBOSA, D. C. A., HAMBURGO ALVES, J. L., PRAZERES, S. M.; PAIVA, A. M. A. Dados fenológicos de 10 espécies arbóreas de uma área de caatinga (Alagoinha - PE). **Acta Botânica Brasileira**, 3(2):109-117, 1989.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustred genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 241 p.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BONNER, F. T. Storage of seeds: potential and limitations for germoplasma conservation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 35, n. 1/2, p. 35-43, June 1990.

BONNER, F. T. Measure of moisture content. In: GORDON, A. G.; GOSLING, P.; WONG, S. P. (Eds.). **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: The International Seed Testing Association, p. 12-17, 1991.

BOTELHO, L. S. **Fungos Associados às Sementes de Ipê – amarelo (*Tabebuia serratifolia*), Ipê - roxo (*Tabebuia impetiginosa*), Aroeira - pimenteira (*Schinus terebinthifolius*) e Aroeira – salsa (*Schinus molle*):** Incidência, Efeitos na Germinação, Transmissão para Plântulas e Controle. Dissertação - Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura \Luiz de Queiroz. 2006.

BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para plântulas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BOVOLINI, M. P. et al. Qualidade sanitária de sementes da espécie da Família Bignoniaceae em diferentes condições de temperatura. **Trabalho de Pesquisa**, Universidade Federal de Santa Maria. 2011.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: De Indivíduos a Ecosistemas**. Artmed. 752p. 2007.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília: SDA/CGAL, 2013. 98p.

CABRAL, E. L., BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook. F. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, p. 340-345. 1990.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. (Biodiversidade, 34). Brasília: MMA. 408p. 2010.

CARNEIRO, J. S. Micoflora associada às sementes de essências florestais em Paraopeba, MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 556-557, 1986.

CARVALHO, D.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais ou *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Revista Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 97-106, 1990.

CARVALHO, L. R. **Conservação de sementes de espécies dos gêneros *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea* (Lauraceae)**. Tese - Universidade Federal de Lavras. Lavras: UFLA, 75 p. 2006.

CARVALHO, L. R. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**, Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, 2000, 97 p.

CARVALHO, L. R.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A; CAEVALHO, M. L. M. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2008.

CARVALHO, N. M.; GÓES, M.; AGUIAR, I. B.; FERNANDES, P. D. Armazenamento de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha*). **Científica**, v. 4, n. 3, p. 315-319, 1976.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**, Brasília, EMBRAPA Informação Tecnológica, 1.039 p. 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 2, 1. ed., 627 p. 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília, EMBRAPA Produção de Informações, 1994, 640 p.

CASTELLANI, E. D.; SILVA, A.; BARRETO, M. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. VAR.

Variegata. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.8, n.1, p.41-44, 1996.

CHIN, H. F. **Recalcitrant seeds**. Malaysia: University Pertanian Malaysia, (Extension Bulletin, 288). 17 p, 1989.

CHIEN, C. T.; LIN, T. P. Effect of harvest date on the storability of desiccation sensitive seeds of *Machilus kusanoi* Hay. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 25, n. 3, p. 361-371, 1997.

CORDEIRO, I. M. C. C. **Respostas morfogenéticas *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke)**. 2002. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. 2002.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C.; COSTA, M. P.; REIS, L. R. S. Efeito de diferentes concentrações de nitrato de amônio no controle da oxidação *in vitro* em segmento caulinar de paricá (*Schizolobium amazonicum*) Huber ex (Ducke). **Revista Ciência Agrária**, Belém, n. 41, p. 97-104, 2004.

COSTA, F. H. S et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶-Benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Rev. Bras. Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

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, 2014.

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. 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, 2014.

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

DAVIDE, A. C.; CARVALHO, L. R; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família

lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 1 p. 29-35, 2003.

DESAI, B. B.; KOTECHA, P. M.; SALUNKHE, D. K. **Seeds handbook Biology, Production, Processing and Storage**. 1 ed. New York: Basel, 1997, 627p.

DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 139-145, 1985.

DI CIERO, L. Biotecnologia florestal – Vantagens econômicas e benefícios para o meio ambiente. ESALQ/USP/SP. Disponível em: <http://www.floraefauna.com/artigos/biotecnologia_florestal.pdf> Acesso em: 01 set 2014.

DIAZ-PEREZ, 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.

DODD, G. L.; DONOVAN, L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 8, p. 1146-1153, 1999.

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

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

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, Sept. 1990.

ERIG, A. C; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, pp. 61-68, 2004.

FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; ROZANE, C.; PADILHA, L. S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de *Commiphora leptoloeos* (Mart.) J.B.Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 14-17, 1997.

FAO. **Ex situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species**. Rome: FAO, 83 p. (FAO Forestry Paper, n. 113), 1993.

FANTINEL, V. S.; OLIVEIRA, L. M. de; MUNIZ, M. F. B.; ROCHA, E. C. Detecção de fungos e transmissão de *Alternaria alternata* via sementes de ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 7, n. 2, 2013.

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; NOGUEIRA, A. C. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax com o uso de ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010.

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

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

FIGLIOLIA, M. B. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, p. 1-12, Serie Registros, 14, 1995.

FILHO, A. A. S. et al. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 10, p. 1307-1310, 2008.

FIOR, C. S. et al. Aspectos da propagação de *Persea willdenovii* Kosterm. (Lauraceae). **Rodriguésia** 58 (1): 027-044. 2007

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

GARCEZ, F.R; GARCEZ, W.S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C.H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part.2** –In Practice. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

GOLLE, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, jan./mar. 2013.

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; PAIVA, P. D. O. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 1, p. 25-30, 2010.

GONÇALVES, L. G. V. et al. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, 36(1): 31-40. 2013.

GONZÁLEZ, J. E. Contenido de humedad y germinacion de semillas de *Virola koschnyi* Warb. and *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb. **Brenesia**, San Jose, v. 35, p. 81-84, 1991.

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: SPI/Embrapa – CNPH, v. 01, 183-230, 1998.

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

HIRANO, E. **Maturação fisiológica, tolerância à dessecação e conservação de sementes de Lauráceas da mata de araucária de Santa Catarina**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

HIRANO, E.; POSSAMAI, E. Estádio de maturação do fruto e germinação de sementes de três espécies de Lauraceae. *Scientia Agraria*, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 219-223, 2008.

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

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Seed storage behaviour: a compendium**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. (IPGRI. Handbooks for Genebanks), 1996.

ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Zürich, 2004. 180 p.

KAGEYAMA, P. Y.; VIANA, V. M. Tecnologia de sementes e grupos ecológicos de espécies arbóreas tropicais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE TECNOLOGIA DE SEMENTES FLORESTAIS, 2, 1989, Atibaia, SP. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1991. p. 197-215.

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

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. T. **Physiology of wood plants**. New York, Academic Press, 1979. 811 p.

KRÜGEL, M. M.; BURGER, M. I.; ALVES, M. A. Frugivoria por aves em *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) em uma área de Floresta Estacional Decidual no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Série Zoologia, v. 96, n. 1, p. 17-24, 2006.

KUNIYOSHI, Y.S. **Morfologia da semente e germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com Araucária**, Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983, 232 p.

LANE, W. D. Micropropagation of apple (*Malus domestica* Borkh.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **High-tech and micropropagation II**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 230-243. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 18).

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F 97**. Pelotas, 1995. 50p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1995.

LEÓN, E. A. B. **Qualidade de sementes, micropropagação, conservação *in vitro* e isolamento de DNA genômico de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.** 2014. 207 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

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

LONGHI, R. A. **Livro das árvores: árvores e arvoretas do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: L&PM, 1995. 176p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACIEL, C. G. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos (ipê-amarelo). In: 4º Congresso Florestal Paranaense. **Anais...** Curitiba-PR, 2012.

MACIEL, C. G. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 75, p. 331-338, 2013.

MAEDA, J. A.; MATHES, L. A. F. Conservação de sementes de Ipê. **Bragantia**, v. 43, n.1, p.51-61, 1984.

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

MANTOVANI, N. C. et al. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria, RS: Ed. da UFSM, 1997.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S. Armazenamento de sementes de ipê-branco: teor de água e temperatura do ambiente. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 775-780, 2009.

MEDEIROS, A. C. S. et al. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*Astronium urundeuva*) (Fr. All) Engl. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 51-55, 1992.

MEDEIROS, A.C.S., NOGUEIRA, A.C. Planejamento da coleta de sementes florestais nativas. **Circular Técnica 126**, Embrapa Florestas, Colombo, PR, p. 1 – 9, 2006.

MEDEROS-MOLINA, S.; TRUJILLO, M. I. Elimination of browning exudate and in vitro development of shoots in *Pistacia vera* L. cv. Mateur and *Pistacia atlantica* desf. culture. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 68, n. 1, p. 21-24, 1999.

MELO, B., et. al. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento de plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira *Syagrus oleracea* (MART.) BECC. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

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

MENDES, S. S.; MESQUITA, J. B.; MARINO, R. H. Qualidade sanitária de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit armazenadas em câmara fria. **Natural Resources**, Aquidabã, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2011.

MENTEN, J. O. M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo: **Ciba Agro**. Cap. 3, p. 115-136. 1995.

MORAES, P. L. R.; PAOLI, A. A. S. Morfologia de frutos e sementes de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees, *Endlicheria paniculata* (Sprengel) MacBride e *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). **Revista Brasileira de Sementes**. 18:17-27. 1996.

MORITZ, A.; DEGENHARDT, J.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; LIMA, B. H. de; FRANCESCHI, C. do R. B.; FRANCISCON, L. Estabelecimento *in vitro* de *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 59, p. 37-44, 2009.

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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D; CARVALHO, N.M. Testes de vigor em sementes. **Jaboticabal**: FUNEP, p. 49-85. 1994.

NEVES, G. et al. Viabilidade e longevidade de sementes de *Tabebuia aurea* Benth. & Hook. submetidas a diferentes métodos de armazenamento. **Biosciense Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 737-742, 2014.

NOGUEIRA, F. C. B.; SILVA, J. W. L.; BEZERRA, A. M. E.; FILHO, S. M. Efeito da temperatura e luz na germinação de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Alemão) Ducke – Fabaceae. **Acta bot. bras.** 26(4): 772-778. 2012.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHELEDER, E. J. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex.DC.) Standl. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 32, n. 6, p. 1011-1018, 2008.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FÁVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; SILVA, T. T. A.; BORGES, D. I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. - Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 642-648, 2005.

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

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, O. S. **Tecnologia de sementes florestais: espécies nativas**. Curitiba: Ed. da UFPR, 404 p. 2012.

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. E *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PAIM, A. F. 2014. **Micropropagação e análise da anatomia foliar de *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.) J. MATTOS**. 186 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 56-69, 2000.

PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; MACIEL, A. L. R.; PEREIRA, A. B.; ALVES, J. M. C. Enraizamento *in vitro* de um porta-enxerto de macieira em diversos substratos. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 781-784, 2000.

PELEGRINI, L. L. **Micropropagação de *Ocotea porosa* (Ness ex Martius) Liberato Barroso (imbuia)**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Ed. Livraria Nobel S.A., 468p. 1990.

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

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Manual de análise de sementes florestais. Campinas, Fundação Cargill, 1988. p. 70-86.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; AGUIAR, I. B. Maturação e dispersão de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p.215-274. 1993.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 517-524. 2005.

RIZZINI, C.T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. **In Anais do III Simpósio sobre cerrado** (M.G. FERRI, coord.). Editora Edgard Blücher, São Paulo, p.61-64, 1971.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. SUDESUL/Herbário Barbosa Rodrigues, 1989. p. 122-129,194-200.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 3, p. 182-194, 2007.

RESENDE, M. L. V.; PÁDUA, M. A.; TOYOTA, M. Manejo das doenças associadas a viveiros florestais. In: DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. (Eds). **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. p. 141-153.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 4, p. 499-514, 1973.

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.

ROCHA, P. S. G., FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; CAMPOS, R. V. Efeito do ágar, vermiculita e sacarose no enraizamento do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 11, n. 1, p. 54-59, jan./jun., 2006.

ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

RUIZ FILHO, R. R.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; FILHO, D. S. J. Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 494-496, 2004.

SANTOS, A. F.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Revista Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 119-128, 2000.

SANTOS, F. S.; PAULA, R. C.; SABONARO, D. Z. E VALADARES, J. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex A. DC.) Standl. **Scientia Forestalis**, 37, 82: 163-173. 2009.

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

SEMA (Secretaria estadual do meio ambiente). **Lista das espécies da flora ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul**, 2002. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especiesameaçadas.pdf>>. Acesso

em: 26 nov. 2014.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, p.25 - 74. 2001.

SILVA, D. G. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2011.

SILVA, L. G, et al. Fungos associados a sementes de ipê amarelo. In: VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

SILVA, M. P. S et al. Enraizamento de miniestacas e produtividade de minicepas de cedro australiano manejadas em canaletões e tubetes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 4, p. 703-713, out.-dez., 2012.

SILVA, R. L.; OLIVEIRA, M. L. de; MONTE, M. A.; XAVIER, A. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomía Costarricense**, San José, v. 34, n. 1, p. 99-104, 2010.

SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J. E; NAVES, R. V. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia Dysenterica* DC.) no sudeste do estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23, 2: 330-334. 2001.

SILVEIRA, S. S. **Propagação *in vitro* e análise de RAPD de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess.)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

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.) Merril] cv. Pérola, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás – MG, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

SOUZA, S. C. A, et al. Biometria de frutos e predação de sementes de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn. (Fabaceae-Caesalpinioideae) provenientes de três localidades do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 864-866, jul. 2007.

SOUZA, V.C.; RISELANE, L.A.B.; ANDRADE, L.A. Vigor de sementes armazenadas de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.833-841, 2005.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; EMRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, 2007.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2003.

SWAINE, M. D.; WHITMORE, T. C. On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. **Vegetatio**, Dordrecht, v. 75, n. 1/2, p. 81-86, May 1988.

SUÁREZ, E.; PÉREZ-FRANCÉS, J. F.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. A. Use of multinodal explants for micropropagation of *Leucodendron* 'Safari Sunset'. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 3, p. 790-796, 2010.

TABARELLI, M.; VICENTE, A.; BARBOSA, D. C. A. Variation of seed dispersal spectrum of woody plants across a rainfall gradient in northeastern Brazil. **Journal of Arid Environmental**, [S.l.], v. 53, p. 197-210, 2003.

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

TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum* mediadas por rizobactérias em *Eucalyptus spp.*** 67 f. 2001. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. In: BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; REIS, G. G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

VALADARES, J.; PAULA, R. C.; MÔRO, F. V. Germinação, desenvolvimento de plântulas e teste de tetrazólio em *Poecilanthe parviflora* Benth (Fabaceae-Faboideae). **Científica**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p. 39 - 47, 2009.

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.

VIEITEZ, A. M., VIEITEZ, E. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 50, n. 2, p. 127-130, Oct. 1980.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas. (Embrapa Florestas. Documentos, 130). 2006. 54 p.

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.; SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE. 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó: EPAGRI, 2003. p. 60.

WETZEL, M. M. V. S. Fungos do armazenamento. In: Soave, J. E Wetzel, M. M. V. S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, cap. 9, p.260-274. 1987.

WETZEL, M. M. V. S. et al. **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003, 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 26).

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestacas caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 135-356, 2003.

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

ZIMMERMAN, R. H.; BROOME, O. C. *In vitro* propagation of apple cultivars. **HortScience**, v. 14, p. 478, 1979.

ZHOU, B.; WEI, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n. 3, p. 109-116, 2010.