

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

Karol Buuron da Silva

**RIZOGÊNESE *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Luehea divaricata*
Mart. & Zucc.**

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Karol Buuron da Silva

RIZOGÊNESE *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

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

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

Santa Maria, RS, Brasil
2016

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

Silva, Karol Buuron da
Rizogênese in vitro e aclimatização de *Luehea*
divaricata Mart. & Zucc. / Karol Buuron da Silva.-2016.
84 f.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2016

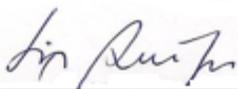
1. Açaita-cavalo 2. Micropropagação 3. Auxina 4.
Substratos alternativos I. Reiniger, Lia Rejane Silveira
II. Título.

Karol Buuron da Silva

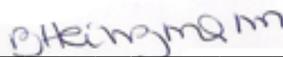
RIZOGÊNESE *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

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

Aprovado em 19 de fevereiro de 2016:



**Lia Rejane Silveira Reiniger, Profª Drª (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**



Berta Maria Heinzmann, Profª Drª (UFSM)



Enrique Asterio Benitez León, Prof. Dr (UNA)

Santa Maria, 19 de fevereiro de 2016.

“Sempre em frente,
não temos tempo a perder...”

Renato Russo

Aos meus pais Gedi e Sandra,
pelo amor e exemplo de vida...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Andrei, pelo amor incondicional, carinho e amizade, por toda paciência, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

A minha orientadora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela oportunidade, pelo ensino e dedicação para que fosse possível a conquista de mais esta etapa da minha vida. Muito obrigada!

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

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

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

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

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

Muito obrigada!

RESUMO

RIZOGÊNESE *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

AUTOR: Karol Buuron da Silva

ORIENTADORA: Lia Rejane Silveira Reiniger

Diante da necessidade de recuperação da cobertura florestal original do bioma Mata Atlântica, é imprescindível a adoção de programas de restauração de áreas desmatadas utilizando espécies florestais nativas. *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini, conhecida popularmente como açoita-cavalo, é uma espécie florestal nativa do bioma Mata Atlântica muito utilizada para a recuperação de áreas. Trata-se de uma espécie florestal que tem sua madeira empregada para as mais diversas finalidades, fato que contribuiu para a redução de suas populações naturais, ocasionando dificuldades para encontrar sementes viáveis da espécie. Diante desse fato, a micropropagação torna-se uma alternativa viável para a produção de mudas de alta qualidade, propiciando, assim, a formação de populações saudáveis para o uso em projetos de recuperação de áreas degradadas. Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar os processos de enraizamento *in vitro* e aclimatização da espécie, e, para isso, foram avaliadas, inicialmente, diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM na rizogênese *in vitro* de brotações de *Luehea divaricata*. Em seguida, foram estudados os efeitos da adição, ao meio nutritivo, do Ácido Indolbutírico (AIB) como tratamento “pulse” e do Ácido Naftalenoacético (ANA) para o enraizamento *in vitro* da espécie. O efeito da combinação do volume de vermiculita com o meio nutritivo WPM/2 na rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata* também foi analisado, bem como a implicação de concentrações de sacarose e diferentes substratos na aclimatização da espécie. Os resultados obtidos indicam que o meio nutritivo WPM/2 apresentou resultados mais promissores para o desenvolvimento de *Luehea divaricata*, alcançando valores de 44,52% na formação de raízes primárias aos 45 dias de cultivo *in vitro*. O tratamento “pulse” com diferentes concentrações de AIB e o emprego de concentrações de ANA não são eficientes para a rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*. As combinações de 20mL de meio nutritivo + 15cm³ de vermiculita, 20mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita e 30mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita são mais promissoras na rizogênese *in vitro* da espécie, proporcionando médias de 39,61% no enraizamento aos 45 dias de cultivo. Por fim, para a fase de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* podem ser utilizados os substratos à base de casca de pinus bio-estabilizada e à base de turfa, calcário calcítico e casca de pinus compostada, independentemente das concentrações de sacarose testadas durante o cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: Açoita-cavalo. Micropropagação. Auxina. Substratos alternativos.

ABSTRACT

RHIZOGENESIS *IN VITRO* AND ACCLIMATIZATION OF *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

AUTHOR: Karol Buuron da Silva
ADVISOR: Lia Rejane Silveira Reiniger

In front of the need to recover the original forest cover of the Atlantic Forest, it is necessary to adopt restoration programs of deforested areas using native species. *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini, popularly known as açoita-cavalo, is a native tree specie of the Atlantic Forest biome widely used for the recovery of areas. It is a forest species that has its wood used for many different purposes, which contributed to the reduction of their natural populations, causing difficulties to find viable seeds of the species. Given this fact, the micropropagation becomes a viable alternative for the production of high quality seedlings, providing thus the formation of healthy populations for use in restoration projects of degraded areas. This way, this study aimed to optimize the rooting *in vitro* process and acclimatization of the species, and, for this, different concentrations of salts of the WPM nutritive medium for *in vitro* root formation shoots of *Luehea divaricata* were initially evaluated. Then, the effects of the addition indolebutyric acid (IBA) as a treatment "pulse" and naphthaleneacetic acid (NAA) in the nutritive medium were studied for rooting *in vitro* specie. The effect of the combination of vermiculite volume with the nutritive medium WPM/2 in root formation *in vitro* of *Luehea divaricata* was also analyzed in this study, as well as the implication of sucrose and different concentrations of substrates in the species acclimatization. The nutritive medium WPM/2 showed the most promising results for the development of *Luehea divaricata*, reaching values of 44,52% in the formation of primary roots after 45 days of *in vitro* culture. Treatment "pulse" with different concentrations of IBA and the use of NAA concentrations are not efficient for *in vitro* root formation in *Luehea divaricata*. The combinations of 20mL of nutritive medium + 15cm³ vermiculite, 20mL of nutritive medium + 30cm³ of vermiculite and 30mL of nutritive medium + 30cm³ of vermiculite were more promising for *in vitro* root formation in the species, providing averages of 39,61% in the rooting after 45 days of cultivation. Finally, for acclimatization *in vitro* and *ex vitro* substrates based on bio-stabilized pinus bark or based on turf, calcareous calcitic and composted pinus bark may be used, independently of sucrose concentrations tested during *in vitro* cultivation.

Key-words: Açoita-cavalo. Micropropagation. Auxin. Alternative substrates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Aspecto da árvore adulta, folhas, flores, frutos e sementes característicos da espécie *Luehea divaricata* (açoita-cavalo)...18
- Figura 2 – Sobrevivência média (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função das diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM - (25%, 50%, 75% ou 100%), independentemente do período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....33
- Figura 3 – Estabelecimento médio (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função das diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM - (25%, 50%, 75% ou 100%), independentemente do período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....34
- Figura 4 – Representação ilustrativa das brotações enraizadas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), cultivadas em meio nutritivo WPM, com concentração de sais conforme o tratamento, após 45 dias de cultivo *in vitro*. A) 25%; B) 50%; C) 75%; e D) 100%. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....37
- Figura 5 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo WPM/2 após 30 dias de cultivo *in vitro* em função dos tratamentos “pulse” com ácido indolbutírico – AIB: A) na ausência; B) 5 μ M; C) 10 μ M; D) 15 μ M; e E) 20 μ M. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....41
- Figura 6 – Média de contaminação microbiana (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função das diferentes concentrações de ácido naftalenoacético - ANA (0, 5, 10, 15 ou 20 μ M), no meio nutritivo WPM/2, independentemente do período de cultivo (15; 30 ou 45 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....45
- Figura 7 – Média de formação de calos (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo (15, 30 ou 45 dias) e as diferentes concentrações de ácido naftalenoacético – ANA (0, 5, 10, 15 ou 20 μ M), no meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....47
- Figura 8 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo WPM/2 após 45 dias de cultivo *in vitro*, com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético - ANA: A) na ausência; B) 5 μ M; C) 10 μ M; D) 15 μ M; e E) 20 μ M. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....48
- Figura 9 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas após 45 dias *in vitro* em meio de cultivo composto por meio nutritivo WPM/2 e vermiculita: A - 10mL de meio nutritivo + 15cm³ de vermiculita; B - 10mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita; C - 20mL de meio nutritivo +

- 15cm³ de vermiculita; D - 20mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita; E - 30mL de meio nutritivo + 15cm³ de vermiculita; e F - 30mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....55
- Figura 10 – Média de formação de raiz primária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de sacarose, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....62
- Figura 11 – Média de número de folhas em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de sacarose, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....63
- Figura 12 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM/2 e sacarose conforme o tratamento: A) na ausência; B) 10g L⁻¹; C) 20g L⁻¹; e D) 30g L⁻¹. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....64
- Figura 13 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após cinco dias em sala de cultivo sob condições controladas, cultivadas em substrato, conforme o tratamento, com os copos plásticos cobertos, no primeiro período de aclimatização e tendo sido previamente cultivadas em meio nutritivo WPM/2 na ausência ou presença de sacarose, conforme o tratamento: A) ausência de sacarose: 1) H-decker®; 2) vermiculita; 3) MecPlant; B) 10g L⁻¹: 4) H-decker®; 5) vermiculita; 6) MecPlant®; C) 20g L⁻¹: 7) H-decker®; 8) vermiculita; 9) MecPlant®; D) 30g L⁻¹: 10) H-decker®; 11) vermiculita; e 12) MecPlant®. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....66
- Figura 14 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após cinco dias em sala de cultivo sob condições controladas, cultivadas em substrato, conforme o tratamento, com os copos plásticos descobertos, no segundo período de aclimatização e tendo sido previamente cultivadas em meio nutritivo WPM/2 na ausência ou presença de sacarose, conforme o tratamento: A) ausência: 1) H-decker®; 2) vermiculita; 3) MecPlant; B) 10g L⁻¹: 4) H-decker®; 5) vermiculita; 6) MecPlant®; C) 20g L⁻¹: 7) H-decker®; 8) vermiculita; 9) MecPlant®; D) 30g L⁻¹: 10) H-decker®; 11) vermiculita; e 12) MecPlant®. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....71
- Figura 15 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 30 dias em casa de vegetação, no terceiro período de aclimatização, tendo sido previamente cultivadas *in vitro* em meio nutritivo WPM/2 contendo sacarose, em concentração conforme o tratamento, e posteriormente em substrato, conforme o tratamento: 4) 10g L⁻¹ - H-decker®; 7) 20g L⁻¹ - H-decker®; 9) 20g L⁻¹ - MecPlant®; 10) 30g L⁻¹ - H-decker®; e 12) 30g L⁻¹ - MecPlant®. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição dos diferentes meios de cultivo (combinações de volumes de vermiculita e meio nutritivo WPM/2) avaliados no experimento de rizogênese <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.....	31
Tabela 2 –	Médias de formação de raiz primária (%) e raiz secundária (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de avaliação (15, 30 ou 45 dias), independentemente da concentração de sais do meio nutritivo WPM - (25%, 50%, 75% ou 100%). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	36
Tabela 3 –	Médias de sobrevivência (%), formação de raiz primária (%) e raiz secundária (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de avaliação (15 ou 30 dias), independentemente do emprego de ácido indolbutírico – AIB (0, 5, 10, 15 ou 20 µM) em tratamento “pulse” por 15 dias, no meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	39
Tabela 4 –	Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), contaminação microbiana (%) e formação de raiz primária (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de avaliação (15, 30 ou 45), independentemente do emprego de ácido naftalenoacético - ANA (0, 5, 10, 15 ou 20µM), no meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	44
Tabela 5 –	Médias de sobrevivência (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo <i>in vitro</i> (15, 30 ou 45 dias) e os diferentes meios de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM.....	50
Tabela 6 –	Médias de estabelecimento (%) e formação de raiz primária (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) em função do período de cultivo <i>in vitro</i> (15, 30 ou 45 dias), independentemente do meio de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	52
Tabela 7 –	Médias de raiz secundária (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo <i>in vitro</i> (15, 30 ou 45 dias) e os diferentes meios de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	53
Tabela 8 –	Médias de contaminação microbiana (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo <i>in vitro</i> (15, 30 ou 45 dias) e os diferentes meios de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.....	54
Tabela 9 –	Médias de altura (cm) e número de folhas em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo <i>in vitro</i> (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no primeiro período de aclimatização, após cinco dias em sala de cultivo com os copos plásticos cobertos. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....	65

Tabela 10 – Médias de sobrevivência (%) e estabelecimento (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo <i>in vitro</i> (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no segundo período de aclimatização, após cinco dias em sala de cultivo com os copos plásticos descobertos. Santa Maria, RS, 2015.....	68
Tabela 11 – Médias de altura (cm), folhas com clorose, número de folhas e folhas saudáveis (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo <i>in vitro</i> (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no segundo período de aclimatização, após cinco dias em sala de cultivo com os copos plásticos descobertos. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....	70
Tabela 12 – Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), formação de raiz primária (%) e secundária (%) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo <i>in vitro</i> (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no terceiro período de aclimatização, após 30 dias em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....	72
Tabela 13 – Médias de número de folhas, altura (cm), comprimento de raiz (cm), massa fresca (mg) e massa seca (mg) em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo <i>in vitro</i> (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no terceiro período de aclimatização, após 30 dias em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.....	18
3.2 CULTURA DE TECIDOS EM ESPÉCIES FLORESTAIS.....	19
3.3 RIZOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE ESPÉCIES LENHOSAS.....	22
3.4 ACLIMATIZAÇÃO DE ESPÉCIES LENHOSAS.....	24
4 CAPÍTULO I	27
Rizogênese <i>in vitro</i> em brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc	27
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1.1 Rizogênese <i>in vitro</i> com diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM	27
4.1.2 Rizogênese <i>in vitro</i> com tratamento “pulse” de Ácido Indolbutírico (AIB)....	28
4.1.3 Efeito de diferentes concentrações de Ácido Naftalenoacético (ANA) na rizogênese <i>in vitro</i> de <i>Luehea divaricata</i>	29
4.1.4 Rizogênese <i>in vitro</i> com diferentes meios de cultivo	30
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.2.1 Rizogênese <i>in vitro</i> com diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM	32
4.2.2 Rizogênese <i>in vitro</i> com tratamento “pulse” de Ácido Indolbutírico (AIB)....	38
4.2.3 Efeito de diferentes concentrações de Ácido Naftalenoacético (ANA) na rizogênese <i>in vitro</i> de <i>Luehea divaricata</i>	43
4.2.4 Rizogênese <i>in vitro</i> com diferentes meios de cultivo	50
4.3 CONCLUSÕES	56
5 CAPÍTULO II	58
Aclimatização <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de brotações de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc	58
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
5.1.1 Concentrações de sacarose e diferentes substratos para a aclimatização de <i>Luehea divaricata</i>	58
5.1.2 Análises estatísticas	60
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.2.1 Concentrações de sacarose e diferentes substratos para a aclimatização de <i>Luehea divaricata</i>	61
5.3 CONCLUSÕES	76
6 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é formada por um conjunto de formações florestais e ecossistemas que se estendiam, originalmente, em 17 estados do território brasileiro. Atualmente, os remanescentes de vegetação nativa estão reduzidos a cerca de 22% de sua cobertura original, e mesmo reduzida e muito fragmentada, estima-se que na Mata Atlântica existam cerca de 20.000 espécies vegetais, incluindo diversas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção. Essa riqueza é maior que a de alguns continentes do mundo, e por esse motivo a região é altamente prioritária para a conservação da biodiversidade mundial (BRASIL, 2015).

A cobertura de áreas protegidas na Mata Atlântica avançou expressivamente ao longo dos últimos anos, principalmente devido à forte contribuição dos governos federais, estaduais, municipais e da iniciativa privada. Além do investimento na ampliação e consolidação das áreas protegidas, as estratégias para a conservação da biodiversidade visam contemplar também formas inovadoras de incentivos para a conservação e uso sustentável da biodiversidade, tais como a promoção da recuperação de áreas degradadas e do uso sustentável da vegetação nativa (BRASIL, 2015).

Diante da necessidade de recuperação de sua cobertura florestal original, é imprescindível a adoção de um extenso programa de restauração de áreas desmatadas e degradadas, e para isso deverão ser utilizadas, sobretudo, espécies nativas (DUTRA, 2013). Uma espécie nativa do bioma Mata Atlântica muito utilizada para a recuperação de áreas é *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini, conhecida popularmente como açoita-cavalo. Trata-se de uma espécie florestal que tem sua madeira empregada para as mais diversas finalidades, fato que contribuiu para o extrativismo predatório e a redução de suas populações naturais. Com esta redução, são enfrentadas dificuldades para encontrar sementes da espécie, visto que a sua viabilidade é irregular. Alguns estudos já realizados apontam que após 60 dias da colheita germinaram 50% menos do que quando semeadas imediatamente após a coleta. A germinação das sementes também pode ser considerada lenta e com taxas moderadas, variando entre 20% e 75%, o que dificulta a propagação seminal da espécie (LORENZI, 2008; CARVALHO, 2003).

Outro fato que pode dificultar o desenvolvimento de mudas de *Luehea divaricata*, por meio de sementes, é a qualidade do lote disponível. Ainda que estes propágulos

sejam provenientes de matrizes conhecidas, com características fenotípicas favoráveis, há uma grande dificuldade em conseguir sementes de boa qualidade, com adequada viabilidade e baixa contaminação por micro-organismos. Diante desse fato, a micropropagação da espécie torna-se uma alternativa viável para a produção de mudas de alta qualidade, propiciando, assim, a formação de populações saudias para o uso em projetos de recuperação de áreas degradadas. A propagação *in vitro* possibilita a produção de mudas a partir de qualquer tecido da planta doadora, mantendo estáveis as características genotípicas de interesse, aumentando em grande escala a produtividade, ocupando menor espaço, produzindo durante todo ano, além de manter a produção isenta de riscos ambientais e climáticos, e dentro dos padrões desejáveis de fitossanidade (FLÔRES, 2007).

Já foram desenvolvidos alguns estudos (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010; FLÔRES, 2011; LEÓN, 2014) no nosso Grupo de Pesquisa, relacionados ao estabelecimento, multiplicação e rizogênese *in vitro* dessa espécie, os quais, coletivamente, têm como meta desenvolver um protocolo completo de micropropagação. Assim, o presente estudo teve como objetivo otimizar os processos de enraizamento *in vitro* e aclimatização *in vitro* e *ex vitro* da espécie, visando contribuir para o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação de *Luehea divaricata* como alternativa para produção de mudas de alta qualidade, seja para implantação de novas populações ou recuperação de áreas degradadas, assim, como também, para subsidiar a realização de outros trabalhos destinados à conservação de germoplasma, garantindo, dessa maneira, a disponibilidade de material propagativo para o futuro.

Considerado o exposto, o presente trabalho está organizado em dois capítulos, a saber:

- No capítulo I foi avaliada a rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*, por meio da micropropagação, testando-se diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM, diferentes fontes de auxinas e combinações de meio nutritivo WPM com o substrato vermiculita, doravante denominadas meio de cultivo.

- No capítulo II foi avaliada a aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de *Luehea divaricata*, levando em consideração concentrações de sacarose e diferentes substratos para o desenvolvimento da espécie em casa de vegetação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com o processo de micropropagação de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., otimizando as etapas de rizogênese *in vitro* e de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* das brotações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as respostas rizogênicas das brotações de *Luehea divaricata* em diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM.
- Analisar o período mínimo necessário para o desenvolvimento eficiente de raízes durante o cultivo *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata*.
- Estudar o efeito da adição do Ácido Indolbutírico (AIB) ao meio nutritivo como tratamento “pulse” para o enraizamento *in vitro* de *Luehea divaricata*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Ácido Naftalenoacético (ANA) na rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*.
- Analisar o efeito de diferentes meios de cultivo (combinações de volumes de vermiculita e de meio nutritivo WPM/2) na rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*.
- Avaliar o efeito de concentrações de sacarose e diferentes substratos na aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de plantas de *Luehea divaricata*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

Luehea divaricata Martius et Zuccarini é uma espécie florestal, integrante da família Malvaceae, conhecida popularmente como açoita-cavalo, caiboti, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, pau-de-canga. A espécie ocorre naturalmente desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul na mata semidecídua. É uma planta heliófita, característica das florestas aluviais, que apresenta dispersão irregular e descontínua, sendo particularmente frequente ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a floresta é mais aberta e nas formações secundárias (LORENZI, 2008). Ocorre preferencialmente em terrenos com textura arenosa e bem drenados, entretanto, em plantios, tem crescido melhor em solos de fertilidade química alta e de textura franca-argilosa (CARVALHO, 2003).

Figura 1 - Aspecto da árvore adulta, folhas, flores, frutos e sementes característicos da espécie *Luehea divaricata* (açoita-cavalo).



Fonte: Lorenzi (2008).

A espécie pode atingir de 5 a 25m de altura e um diâmetro de 50 a 60cm à altura do peito, com tronco geralmente tortuoso e nodoso de base alargada. A árvore é caducifólia e o fuste, comumente curto, mede até 5m de comprimento. No interior da floresta densa desenvolve troncos quase retos e bastante altos. A ramificação é cimosa ou dicotômica, os ramos são laxos, revestidos com córtex escurecido, lenticelados e glabros, quando adultos, e com pelos estrelados e cor-de-canela, no ápice dos ramos jovens (CARVALHO, 2003). Apresenta madeira moderadamente pesada, de cor clara, de boa trabalhabilidade e de acabamento delicado. A madeira é indicada para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, coronhas de armas, caixotaria, cadeiras, salto de calçados, e também para a construção civil, como ripas, molduras e rodapés (LORENZI, 2008).

O florescimento da espécie ocorre de dezembro a fevereiro, as flores hermafroditas são róseas e amarelas, dispostas em inflorescências multifloras terminais. Os frutos são cápsulas deiscentes, lenhosas, pubescente, com sementes aladas disseminadas pelo vento. Cada fruto possui de 5 a 15 sementes, e devem ser coletados quando mudam a coloração de verde para marrom-escuro, antes da deiscência ou quando a iniciam. Após a coleta, os frutos devem ser expostos ao sol para que a deiscência seja completada. Apresenta germinação moderada, variável entre 20 e 75%, e a viabilidade das sementes é muito irregular. Possui, aproximadamente, 263.000 sementes por kg (LORENZI, 2008; CARVALHO, 2003).

As folhas de *Luehea divaricata* são simples, obovadas a oblongas, quase glabras na face superior e com a face inferior densamente pubescente, recoberta por tricomas estrelados e esbranquiçada. A consistência é membranácea, e às vezes, são subcartáceas, medindo de 4,5 a 13,5cm de comprimento por 2 a 8cm de largura. *Luehea divaricata* é uma planta pioneira de rápido crescimento que não pode faltar nos reflorestamentos mistos de áreas destinadas à preservação (CARVALHO, 2003).

3.2 CULTURA DE TECIDOS EM ESPÉCIES FLORESTAIS

A biotecnologia é definida como qualquer aplicação tecnológica que utilize organismos vivos ou suas partes, para produzir ou modificar produtos, melhorar plantas,

ou desenvolver micro-organismos para usos específicos. Devido à importância econômica das espécies florestais, árvores com características fenotípicas desejáveis vêm sendo selecionadas ao longo do tempo e incorporadas em programas de melhoramento visando à obtenção de genótipos mais produtivos. Com isso, a biotecnologia florestal constituída por técnicas de cultura de tecidos, de marcadores moleculares e de transformação genética, dentre outras, têm-se unido ao melhoramento convencional para permitir a obtenção desses genótipos com maior produtividade e qualidade (SARTORETTO et al., 2008).

A propagação vegetativa está entre os principais métodos de multiplicação de espécies florestais, a qual é extremamente vantajosa quando comparada à reprodução sexuada, pois permite reproduzir o componente genético total, com maiores ganhos em uma mesma geração (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Neste contexto encontram-se as técnicas de cultura de tecidos vegetais, dentre as quais destacam-se àquelas que oferecem potencial para a rápida multiplicação *in vitro*.

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como a manutenção, propagação e regeneração de certas partes da planta, em um ambiente livre de micro-organismos e em condições controladas (*in vitro*), baseada na teoria da totipotência celular (TERMIGNONI, 2005). Em programas de melhoramento florestal, a micropropagação é a técnica de cultura de tecidos mais utilizada, pois permite a manutenção e multiplicação rápida de mudas, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, possibilitando a obtenção de clones mais produtivos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dentro de um conceito amplo, a cultura de tecidos envolve várias técnicas, mediante as quais um fragmento de tecido vegetal, denominado explante, é cultivado de forma asséptica em um meio nutritivo sob condições controladas de temperatura e luminosidade. Mediante o emprego racional de suas técnicas, a cultura de tecidos pode tanto propiciar a produção comercial contínua de milhares de mudas de alta qualidade e com a fidelidade genética preservada, como gerar variabilidade, fator importante para o melhoramento genético (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

A micropropagação ganhou grande impulso na década de 1970 e, neste período, surgiu o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*, elaborado por Murashige (1974) (TORRES et al., 1998) e a seguir descrito:

- Estágio I – seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas.
- Estágio II – multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação.
- Estágio III – transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplantio das plantas obtidas para substrato ou solo.

No cultivo *in vitro* utilizam-se meios nutritivos com micronutrientes, macronutrientes, vitaminas, fonte de carboidratos, para que as plantas se desenvolvam adequadamente. Dentre os principais meios nutritivos utilizados para o cultivo *in vitro* de espécies arbóreas, pode-se citar o MS, desenvolvido por Murashige & Skoog (1962) e o 'Woody Plant Medium' - WPM, formulado por Lloyd & McCown (1980). O meio WPM foi desenvolvido especialmente para o cultivo de brotações de espécies lenhosas. Este meio nutritivo apresenta 1/4 das concentrações de íons de nitrato, amônia e potássio do meio MS e os níveis de PO_4^{3-} dobrados (NICIOLI, 2006). Quando necessário, e dependendo da fase de cultivo que a espécie se encontra, são adicionados aos meios nutritivos os reguladores de crescimento, principalmente auxinas, citocininas e giberelinas (BARRUETO CID, 2000).

Os reguladores de crescimento exercem sua ação por ligação a receptores específicos, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (GUERRA et al., 1999). Elevadas concentrações de citocininas e baixas concentrações de auxinas induzem a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e calos, ao ponto que baixas concentrações de citocininas e altas de auxinas favorecem a formação das raízes e calos, inibindo o desenvolvimento de gemas. Em geral, a rizogênese é induzida pela presença isolada de auxina ou em combinação com uma citocinina em baixa concentração (SANTANA, 2003).

A micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldade de reprodução natural, baixo poder germinativo e também para casos em que os métodos convencionais de propagação vegetativa não são viáveis (SERAFINI et al., 2001). Empregar a biotecnologia para o ganho de produtividade e sustentabilidade pode ser considerado como uma das prioridades mundiais, já que a

excessiva demanda por produtos oriundos de espécies vegetais necessitam destas técnicas para sua manutenção (GOLLE, 2010).

3.3 RIZOGÊNESE *IN VITRO* DE ESPÉCIES LENHOSAS

Os brotos desenvolvidos pela micropropagação geralmente não apresentam raízes, e por esse motivo eles deverão passar por uma fase de enraizamento em um meio propício à indução deste órgão, permitindo que as mudas desenvolvidas nesse ambiente de cultivo possam ser transplantadas para casa de vegetação e campo. O enraizamento *in vitro* caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação. De maneira geral, a formação da raiz adventícia ocorre de uma a três semanas após o início do cultivo *in vitro*, e pode ser dividido em três etapas: indução, iniciação e alongamento das raízes. As fases de indução e iniciação geralmente são dependentes da auxina, já a fase de alongamento das raízes pode ser inibida pela presença desses reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para muitas espécies, sobretudo as herbáceas, a rizogênese *in vitro* não tem constituído grande problema, enquanto para outras, entre as quais incluem-se as lenhosas, a formação de raízes não foi alcançada (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). A maioria das plantas lenhosas, mesmo na presença de auxinas, não desenvolvem o sistema radicular, e por outro lado, outras espécies até dispensam o uso de reguladores de crescimento no seu enraizamento (SOARES et al., 2006), como é o caso de *Handroanthus chrysotrichus* (ipê-amarelo) (PAIM, 2014), *Tectona grandis* (teca) (FERNANDES, 2012) e *Salix pseudolasiogyne* (PARK et al., 2008). A dificuldade na rizogênese dessas espécies pode se agravar à medida que não se utiliza material jovem, uma vez que a restauração da competência de enraizamento diminui ao aproximar-se da fase adulta (DECCETTI, 2000).

Espécies ou mesmo cultivares diferentes reagem de maneira diversa às concentrações distintas de auxinas, à concentração ótima para determinada planta, pode ser insuficiente ou muito elevada para outra. Os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade e genótipo, o meio nutritivo, a presença de

reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, as condições ambientais de crescimento *in vitro* das culturas, são fatores que determinam o sucesso do enraizamento, assim como a qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação (DECETTI, 2000). Segundo Assis e Teixeira (1998), há várias evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada, pois se observa grande variação entre espécies, cultivares e clones, com relação à maior ou menor habilidade natural em formar raízes.

Os reguladores de crescimento estimulam o enraizamento das plantas, a maioria dos trabalhos de indução de raízes adventícias em espécies lenhosas envolve tratamentos com auxinas exógenas, como, por exemplo, o Ácido Indolbutírico (AIB), o Ácido Naftalenoacético (ANA) e o Ácido Indolacético (AIA). As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam consistentemente a formação de primórdios radiculares, principalmente em tecidos que, naturalmente, apresentam certa predisposição ao enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Conforme Hartmann (2002), as plantas podem ser divididas em três classes em relação ao efeito dos reguladores de crescimento no enraizamento:

- Fácil enraizamento: plantas que possuem todas as substâncias endógenas essenciais, mais a auxina. A auxina pode melhorar o enraizamento, mas, de modo geral, não é necessária.
- Enraizamento moderado: plantas nas quais a morfogênese de raiz acontece naturalmente, porém a auxina é necessária para otimizar o enraizamento.
- Difícil enraizamento: plantas ausentes de morfogênese de raiz ou que não possuem sensibilidade para responder à morfogênese apesar da auxina natural estar ou não presente. A aplicação da auxina externa pode viabilizar ou não o enraizamento.

Outro aspecto a ser considerado é a toxidez que pode ser provocada por elevadas concentrações de auxinas adicionadas ao meio nutritivo. A toxidez pode ser amenizada pela utilização de tratamento “pulse” durante o enraizamento *in vitro*, ou seja, no início do processo, as brotações permanecem por alguns dias na presença da auxina no meio nutritivo e, posteriormente, são transferidas para meio nutritivo fresco na ausência de reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Essa relação entre a concentração de auxina e o tempo de exposição do explante pode ser fundamental para

o desenvolvimento da rizogênese *in vitro* (NEGASH et al., 2000; BOSA et al., 2003). Para o início do desenvolvimento de raízes adventícias, como já mencionado, é necessário um alto nível de auxinas endógenas, pois há uma relação direta entre os níveis de auxina e a habilidade para iniciar raízes. Comumente, após aplicação da auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e por conseguinte há o início da formação de raízes primordiais (GASPAR; HOFINGER, 1988).

Além disso, a diluição dos sais do meio nutritivo para 1/4, 1/2 e 1/3 da sua composição original pode, também, aumentar a eficiência do processo de enraizamento, já que altas concentrações tendem a inibir a formação dessas estruturas. Meios de uso convencional menos concentrados como MS, WPM e White (CALDAS et al., 1990) podem ser igualmente favoráveis. Entretanto, o broto pode ter o seu desenvolvimento interrompido e conseqüente morte em meios nutritivos que apresentem baixa concentração de macronutrientes, comprovando que o equilíbrio destes nutrientes é essencial nessa fase de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Outro problema ligado ao enraizamento de lenhosas é a formação de calos na base do explante durante a fase de multiplicação. A formação de calos na zona de enraizamento é indesejável, pois pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular com a planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A formação de calos na base das brotações tem sido mais frequentemente observada quando crescem em meios de cultura suplementado com a auxina ANA, embora o AIA e AIB também possam promovê-los (ERIG; SCHUCH, 2004). Nesse sentido, torna-se evidente a necessidade de estudos adicionais em relação à composição dos meios nutritivos durante a fase de enraizamento *in vitro*, a utilização ou não de reguladores de crescimento, de substratos alternativos, bem como a presença de uma fonte de carboidrato externa, uma vez que inúmeros fatores interferem na rizogênese das espécies lenhosas.

3.4 ACLIMATIZAÇÃO DE ESPÉCIES LENHOSAS

Na fase de aclimatização, as plantas são expostas à redução de umidade do ar e temperatura instável, a fim de que possam suportar a transferência para novo substrato

e, posteriormente, sobreviver e se desenvolver sem complicações em condições naturais de campo (SILVA et al., 1995). Contudo, as plantas desenvolvidas a partir do cultivo *in vitro* podem apresentar algumas deficiências anatômicas, morfológicas e fisiológicas, fatores que podem comprometer a sobrevivência devido à rápida desidratação da planta quando transferida para o ambiente *ex vitro* (GEORGE, 1993). Desse modo, a transferência das condições *in vitro* para o crescimento em ambiente externo deve ser realizada de forma gradativa e cuidadosa, para evitar danos às culturas micropropagadas.

A sobrevivência e o estabelecimento de plantas micropropagadas após sua remoção do meio nutritivo *in vitro* vêm encontrando dificuldades entre as espécies lenhosas, pois essa transferência pode levar ao estresse da planta ou até mesmo a sua morte (SOUZA JÚNIOR et al., 2001). Alguns estudos e trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de minimizar os danos causados pela transição de uma condição à outra. Souza et al. (2006) sugeriram a pré-adaptação à condição autotrófica mediante redução na concentração de sacarose no meio nutritivo, para promover a aclimatização *in vitro* buscando aumentar a capacidade fotossintética das plantas. Conforme Kozai (1991), na presença de açúcar, as plantas não desenvolvem capacidade fotoautotrófica, podendo levar a um crescimento reduzido e conseqüente morte das mudas durante a fase de aclimatização. Entretanto, é sugerido, até mesmo, aumentar o nível de sacarose na fase anterior à aclimatização, pois esse pré-condicionamento causaria um incremento nas reservas de carboidratos armazenadas pelas folhas, aumentando, assim, a energia disponível para as plantas durante o processo de aclimatização (CALVETE, 1998).

A concentração de carboidrato utilizada nos meios nutritivos pode variar de acordo com as fases de multiplicação, alongamento e enraizamento, mas, em geral, são mantidas entre 20 e 30g L⁻¹ (McCOWN, 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1988; SOUZA, 2003). No que diz respeito à fonte de carboidrato, embora alguns trabalhos tenham demonstrado a superioridade da glicose em relação à sacarose, a grande maioria das pesquisas apontam esta última como a melhor (NICOLOSO et al., 2003).

Outro fator que deve ser considerado para o início da aclimatização das plantas é a aeração dos recipientes de cultivo. A condição de esterilização, necessária aos cultivos *in vitro* e a manutenção do ambiente asséptico no interior dos frascos, impõe um

selamento severo dos recipientes, impedindo, dessa forma, trocas gasosas, tão necessárias ao bom desenvolvimento das plantas (JACKSON, 2003). Buscando minimizar essa ausência total de trocas gasosas, vários estudos têm sido realizados visando identificar recipientes e formas de vedação mais adequados para essa fase de cultivo. O fechamento dos tubos, com tampa plástica sem polivinil cloreto (PVC) ou com tampão de algodão, permite as trocas gasosas com o ambiente externo, estimula a mudança do modo de crescimento heterotrófico para fotoautotrófico durante a fase de enraizamento, facilitando e diminuindo o tempo de aclimatização. A realização de perfurações nas tampas dos frascos em um curto período, também, pode ser usada no momento inicial da aclimatização das plantas (SANTANA et al., 2008).

O substrato utilizado na preparação das mudas para a transferência do ambiente de cultivo também influencia na etapa de aclimatização, pois pode facilitar ou impedir o crescimento das mudas conforme suas propriedades físico-químicas. O espaço de aeração associado à elevada capacidade de retenção de água são fatores fundamentais durante a aclimatização (CALVETE, 1998). Embora o substrato possa ser formado por um único material, dificilmente será encontrado um que suprirá todas as características necessárias, e por essa razão, os substratos em geral representam a mistura de dois ou mais materiais para otimizar as condições de uso (KÄMPF, 2000).

O material utilizado como substrato deve ser inerte, poroso, com boa drenagem e capaz de manter a aeração e a umidade, permitindo o desenvolvimento do sistema radicular (HARTMANN et al., 2002). O uso de substratos alternativos para a rizogênese, visando um sistema radicular mais apropriado para a adaptação da planta em casa de vegetação, já foi testado em alguns trabalhos e pode ser útil na micropropagação (CURTI, 2014; SCHUCH; DAMIANI, 2009). O uso de componentes como vermiculita ou perlita embebidas com meio líquido podem ser alternativas mais baratas e podem fornecer resultados satisfatórios para as espécies arbóreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

4 CAPÍTULO I

Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios e estruturas de apoio do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, em Santa Maria, RS.

4.1.1 Rizogênese *in vitro* com diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x3, em que foi testado o efeito de diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM (25%; 50%; 75% ou 100%) e três períodos de cultivo (15, 30 ou 45 dias), totalizando 12 tratamentos, sobre a rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*. Cada tratamento foi constituído por 10 repetições, cada uma composta por um frasco com capacidade de 150mL contendo 30mL de meio de nutritivo e três explantes, totalizando 120 unidades experimentais e 360 unidades amostrais.

O meio nutritivo foi acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol para o tratamento com 100% da concentração dos sais do meio nutritivo WPM, 75mg L⁻¹ de mio-inositol para o tratamento com 75% dos sais do meio nutritivo WPM, 50mg L⁻¹ de mio-inositol para o tratamento com 50% dos sais do meio nutritivo WPM e 25mg L⁻¹ de mio-inositol para o tratamento com 25% dos sais do meio nutritivo WPM. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de 7g L⁻¹ de ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15min a 121°C e 1atm de pressão.

Os explantes utilizados foram segmentos nodais de *Luehea divaricata* com aproximadamente 10mm de comprimento. Esses explantes foram provenientes do cultivo *in vitro* de plântulas em meio nutritivo MS sem reguladores de crescimento, durante 60 dias após a germinação *in vitro* (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010). Após a inoculação dos explantes, sob câmara de fluxo laminar, os frascos foram vedados com papel alumínio e

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

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

4.1.2 Rizogênese *in vitro* com tratamento “pulse” de Ácido Indolbutírico (AIB)

O meio nutritivo utilizado neste experimento foi o WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2), uma vez que foi esta concentração a que apresentou os melhores resultados no experimento anterior. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 5x2, em que os tratamentos consistiram da adição de diferentes concentrações de AIB (0; 5; 10; 15 ou $20\mu\text{M}$) ao meio nutritivo, e os diferentes períodos de cultivo (15 ou 30 dias), totalizando 10 tratamentos com 10 repetições. Os explantes permaneceram no meio nutritivo na presença do regulador de crescimento pelo período de 15 dias, e, após, decorrido esse período, as culturas foram transferidas para meio nutritivo fresco de idêntica composição ao anterior, porém na ausência de AIB.

Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade de 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes, totalizando 100 unidades experimentais e 300 unidades amostrais. Utilizaram-se como explantes segmentos nodais de *Luehea divaricata* com aproximadamente 8mm de comprimento, provenientes do desenvolvimento de plântulas obtidas via germinação *in vitro*, com cultivo em meio nutritivo MS durante um período de 60 dias (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010).

O meio nutritivo foi acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, e o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15min a 121°C e 1atm de pressão. Após a inoculação dos explantes, em ambos os períodos (inicialmente na presença de AIB e após, na ausência deste regulador de crescimento), os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20µmol m⁻²s⁻² fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Aos 15 e 30 dias, avaliaram-se a sobrevivência (explantes com coloração verde), estabelecimento (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), contaminação por micro-organismos (presença de micélios fúngicos ou colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), explantes com formação de raiz primária e com formação de raiz secundária, todas expressas em porcentagem. Na última avaliação, avaliaram-se, ainda, o comprimento da raiz primária (cm) e a altura das plantas (cm), medida desde a base do colo até a ponta do ápice caulinar.

4.1.3 Efeito de diferentes concentrações de Ácido Naftalenoacético (ANA) na rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*

O meio nutritivo utilizado neste experimento também foi o WPM reduzido à metade da concentração de seus sais (WPM/2), o qual foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x3, em que o fator A correspondeu às diferentes concentrações de ANA (0; 5; 10; 15 ou 20µM), e o fator B aos períodos de cultivo avaliados (15, 30 ou 45 dias), totalizando 15 tratamentos e sete repetições. Cada repetição foi composta por um frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio nutritivo e três explantes, totalizando 105 unidades experimentais e 315 unidades amostrais. Os explantes utilizados foram segmentos nodais de *Luehea divaricata* com aproximadamente 8mm de comprimento, provenientes do cultivo *in vitro* de plântulas em meio nutritivo MS sem reguladores de crescimento, durante 60 dias após a germinação *in vitro* (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010).

O meio nutritivo foi acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 50mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, e o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, os

frascos foram autoclavados por 15min a 121°C e 1atm. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20μmol m⁻²s⁻² fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

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

4.1.4 Rizogênese *in vitro* com diferentes meios de cultivo

Para este experimento foi também utilizado o meio nutritivo WPM reduzido à metade da concentração dos seus sais (WPM/2), avaliando-se a combinação de vermiculita de granulometria fina (15 ou 30cm³) com diferentes volumes de meio nutritivo (10; 20; ou 30mL), o que será denominado, doravante, meio de cultivo (Tabela 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6x3, sendo o fator A constituído pela composição do meio de cultivo (Tabela 1), e o fator B, os diferentes períodos de cultivo avaliados (15, 30 ou 45 dias), totalizando 18 tratamentos. Foram utilizadas seis repetições, cada uma composta por um frasco, com volume de 150mL preenchidos com meio de cultivo contendo três explantes, totalizando 108 unidades experimentais e 324 unidades amostrais. Os explantes utilizados foram segmentos nodais de *Luehea divaricata* com aproximadamente 8mm de comprimento, provenientes do cultivo *in vitro* de plântulas em meio nutritivo MS sem reguladores de crescimento, durante 60 dias após a germinação *in vitro* (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010).

Tabela 1 – Composição dos diferentes meios de cultivo (combinações de volumes de vermiculita e meio nutritivo WPM/2) avaliados no experimento de rizogênese *in vitro* de segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

Meio de Cultivo	Composição
1	15cm ³ de vermiculita + 10mL de meio nutritivo
2	30cm ³ de vermiculita + 10mL de meio nutritivo
3	15cm ³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo
4	30cm ³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo
5	15cm ³ de vermiculita + 30mL de meio nutritivo
6	30cm ³ de vermiculita + 30mL de meio nutritivo

Fonte: A autora (2016).

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

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

4.1.5 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,

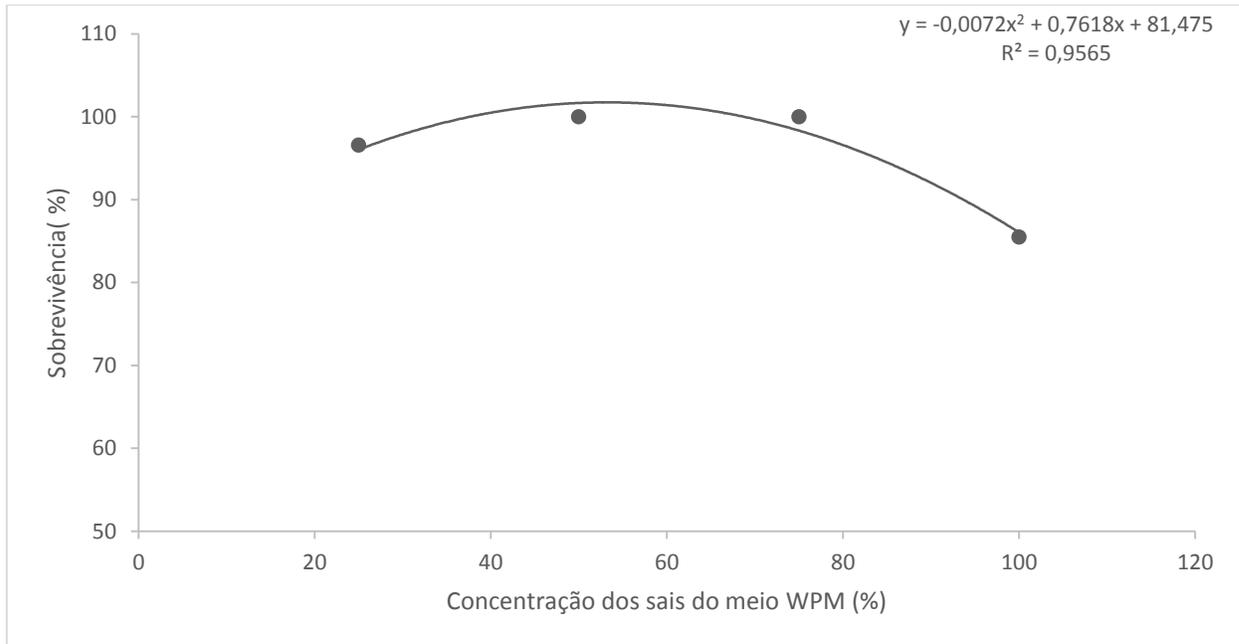
sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial 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). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Rizogênese *in vitro* com diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM

Para as variáveis sobrevivência ($p=0,0153$; $IV=2,67$) e estabelecimento ($p=0,0000$; $IV=2,92$), houve efeito significativo das concentrações de sais do meio nutritivo WPM, mas não houve efeito significativo do período de cultivo ($p=0,3176$ e $p=0,8645$ respectivamente), e, tampouco, da interação entre os dois fatores ($p=0,6617$ e $p=0,7803$ respectivamente). Uma equação de segundo grau foi ajustada para ambas as variáveis (Figura 2 e Figura 3).

Figura 2 - Sobrevivência média (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função das diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM - (25%, 50%, 75% ou 100%), independentemente do período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



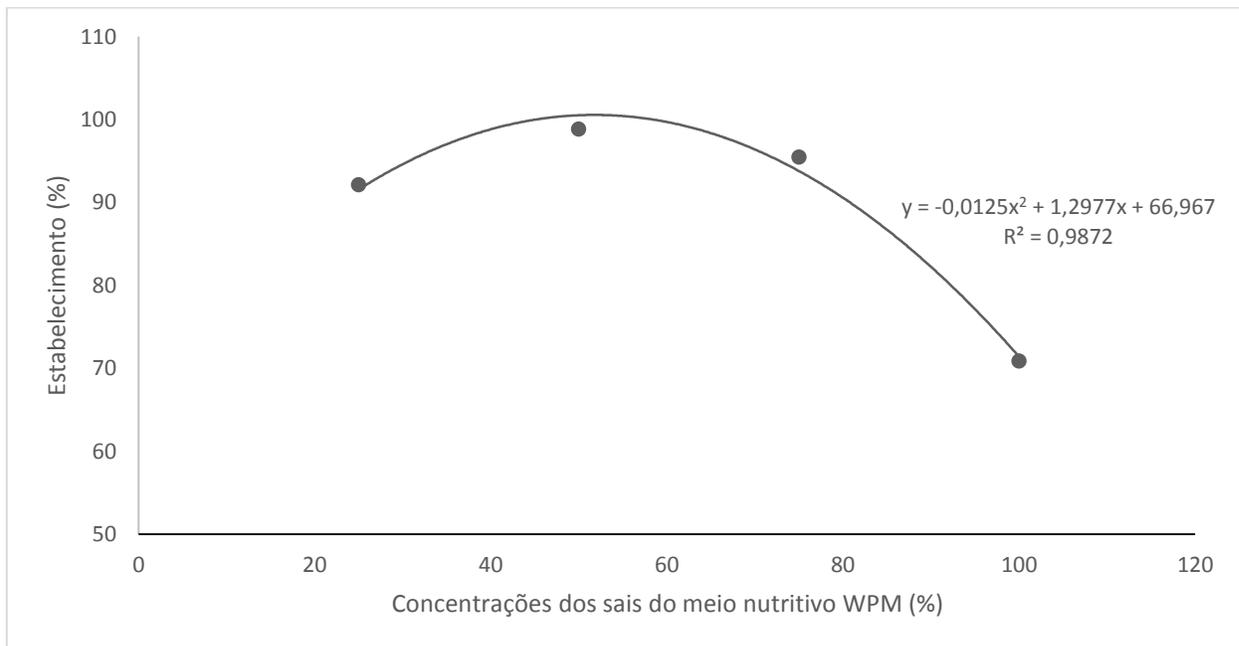
Fonte: A autora (2016).

A sobrevivência observada foi de 100% nos tratamentos com 50% e 75% da concentração de sais do meio nutritivo WPM, reduzindo-se para 85% na presença de 100% dos sais (Figura 2), sendo a máxima eficiência técnica (MET) estimada a 52,90% da concentração de sais do meio nutritivo WPM. O estabelecimento foi igualmente superior nos tratamentos com 50% e 75% da concentração de sais, com médias de 98% e 95% respectivamente, seguida do tratamento com 25% da concentração de sais, que apresentou 92% de estabelecimento *in vitro* das brotações (Figura 3), sendo a MET estimada a 51,90% da concentração de sais do meio nutritivo WPM.

Os valores satisfatórios de sobrevivência e estabelecimento nas baixas concentrações de sais do meio nutritivo WPM podem ser atribuídos às reduzidas concentrações totais de íons do meio nutritivo, que apresenta 1/4 das concentrações de íons de nitrato, amônia e potássio do meio nutritivo MS (NICIOLI, 2006). Estes íons são

as principais fontes de absorção de N pelas plantas, e a aplicação de proporções desbalanceadas pode provocar alteração no crescimento e desenvolvimento da espécie (LANE; BASSIRIRAD, 2002). Frente a isso, as concentrações reduzidas dos sais do meio nutritivo WPM provavelmente provocaram um balanceamento adequado da absorção de N pelas plantas, garantindo altas taxas de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* das brotações de *Luehea divaricata* nas condições testadas.

Figura 3 - Estabelecimento médio (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função das diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM - (25%, 50%, 75% ou 100%), independentemente do período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Fonte: A autora (2016).

De maneira semelhante ao observado no presente estudo, em *Peltophorum dubium* (canafístula), a sobrevivência de brotações em função de diferentes meios nutritivos foi de 86,5% em meio nutritivo WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2), e de apenas 53,05% em meio nutritivo WPM com a concentração completa

de sais (CURTI, 2014). Estudos indicam que a pressão osmótica muito alta limita a absorção de água pela planta, sendo que a diluição dos sais do meio nutritivo aumenta a disponibilidade de água e reduz a oxigenação (TAIZ; ZEIGER, 2004), fato que pode ter favorecido o desenvolvimento das plantas nas concentrações mais diluídas do meio nutritivo WPM.

Na contaminação por micro-organismos (IV=2,44), não houve efeito significativo das concentrações de sais do meio nutritivo WPM ($p=0,1192$), período de cultivo ($p=0,4529$), e nem da interação entre eles ($p=0,2289$), sendo observada uma porcentagem média de apenas 1,65%, o que é muito favorável.

Para a raiz primária (IV=4,91), não houve efeito significativo das concentrações de sais do meio nutritivo WPM ($p=0,5184$) nem da interação entre os dois fatores principais ($p=0,8693$), sendo verificado efeito significativo apenas do período de cultivo ($p=0,0000$) (Tabela 2; Figura 4). Igualmente, para a raiz secundária (IV=4,14), houve efeito significativo somente do período de cultivo ($p=0,0000$), não sendo observado o mesmo comportamento em relação às concentrações de sais do meio nutritivo WPM ($p=0,4728$) e nem da interação entre os fatores principais ($p=0,9380$) (Tabela 2).

No que diz respeito ao comprimento de raiz ($p=0,5529$; IV=15,27), avaliado apenas aos 45 dias de cultivo *in vitro*, não houve efeito significativo do único fator testado, as concentrações de sais do meio nutritivo WPM, apresentando média geral de 1,87cm de comprimento. Este valor é considerado muito bom, visto que para *Rubus* sp. (amoreira-preta) e *Rubus ideaus* (framboeseira) cultivados em meio nutritivo WPM na composição original de sais, apresentou comprimento de raízes de 1,47cm após 30 dias de cultivo *in vitro* (LEITZKE et al., 2009). Igualmente, em micro-estacas de *Cabralea canjerana* (canjerana), cultivadas em meio nutritivo MS reduzido à metade da concentração de seus sais (MS/2), e na ausência de reguladores de crescimento, o comprimento médio de raízes foi de 0,76cm após 60 dias de cultivo *in vitro* (ROCHA et al., 2007), valor bem inferior ao encontrado no presente trabalho.

Tabela 2 - Médias de formação de raiz primária (%) e raiz secundária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de avaliação (15, 30 ou 45 dias), independentemente da concentração de sais do meio nutritivo WPM - (25%, 50%, 75% ou 100%). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Período (dias)	Raiz primária (%)	Raiz secundária (%)
15	2,47 c*	0,00 b
30	23,95 b	4,95 b
45	40,52 a	19,0 a
Média	22,31	7,98
IV**	4,91	4,14

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. ** Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).
Fonte: A autora (2016).

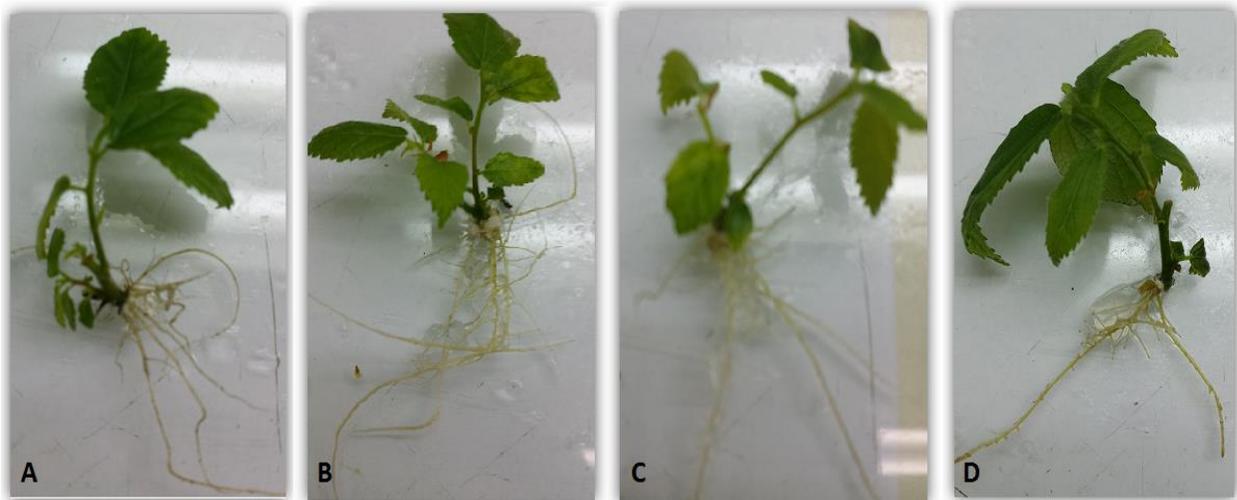
Os resultados expostos na Tabela 2 evidenciam a necessidade da espécie ser cultivada *in vitro* por pelo menos 45 dias, tendo em vista que a média de formação de raízes primárias (40,52%) e secundárias (19%) ter sido superior durante este período quando comparado aos demais. Aos 15 dias de cultivo, a formação de raiz primária foi de apenas 2,47%, e aos 30 dias, de 23,95%, da mesma forma em relação à formação de raiz secundária, que não se desenvolveu aos 15 dias, e que foi de apenas 4,95% aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Para a variável altura das brotações ($p=0,0041$; $IV=3,25$), avaliada apenas aos 45 dias de cultivo *in vitro*, houve efeito significativo do único fator principal testado, as concentrações de sais do meio nutritivo WPM. Os tratamentos com 50% e 75% das concentrações de sais do meio nutritivo foram aqueles com maiores médias (2,31cm e 1,83cm respectivamente) e que não diferiram significativamente entre si. Estas médias de altura são muito satisfatórias, uma vez que para segmentos nodais de *Malus domestica* (macieira) 'seleção 69', inoculados em meio MS e ainda suplementados com regulador de crescimento BAP (2,2 μ M) no meio nutritivo, a altura média das brotações

foi de 1,3cm (SANTA-CATARINA et al., 2001), inferior aos valores encontrados no presente trabalho.

De modo geral, o uso de meios nutritivos menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento *in vitro* de brotações. Diluições para 1/2 e até 1/4 de sais têm possibilitado resultados mais promissores para muitas espécies de plantas, tendo em vista que, em alguns casos, a alta concentração de sais pode inibir o enraizamento *in vitro* (SOUZA; PEREIRA, 2007). Contudo, na micropropagação de *Rubus* sp. (amoreira-preta) e *Rubus ideaus* (framboeseira), em que foram testados os meios nutritivos MS ou WPM, foi observado comportamento contrário ao verificado no presente trabalho, sendo que a utilização do meio nutritivo WPM na composição original de sais apresentou as melhores médias para a porcentagem de formação de raízes (81,5%) e número de raízes (3,39), após 30 dias de cultivo *in vitro* (LEITZKE et al., 2009). Assim, espécies diferentes tendem a se desenvolver de maneira distinta em meios nutritivos iguais, fato que salienta a importância de estudos dirigidos para cada espécie a fim de se obter um protocolo de micropropagação eficiente.

Figura 4 – Representação ilustrativa das brotações enraizadas de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo), cultivadas em meio nutritivo WPM, com concentração de sais conforme o tratamento, após 45 dias de cultivo *in vitro*. A) 25%; B) 50%; C) 75%; e D) 100%. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Estudos indicam que na rizogênese geralmente é efetuada uma redução na composição de sais e vitaminas do meio nutritivo quando comparada às demais fases do cultivo *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A utilização do meio nutritivo WPM reduzido acarreta na redução dos custos, além de representar benefícios para a posterior aclimatização das plantas micropropagadas, já que nesta fase as condições ótimas de cultivo vão sendo alteradas, para que a planta possa sobreviver no ambiente *ex vitro* (PUROHIT et al., 2002).

4.2.2 Rizogênese *in vitro* com tratamento “pulse” de Ácido Indolbutírico (AIB)

Para a variável sobrevivência (IV=6,16), houve efeito significativo apenas do período de cultivo ($p=0,0059$), não sendo observado efeito significativo das diferentes concentrações de AIB ($p=0,3086$) ou da interação entre eles ($p=0,9924$). Em relação ao estabelecimento (IV=7,40), não houve efeito significativo das diferentes concentrações de AIB ($p=0,1641$), nem do período de cultivo ($p=0,6675$), e tampouco da interação entre a auxina e o período de cultivo ($p=0,9957$), observando-se uma média geral de estabelecimento de 54,54%. Esta média é insatisfatória, uma vez que no experimento anterior, testando as diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM, a média de estabelecimento foi de 98% no meio nutritivo WPM/2 aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

De maneira semelhante, para a contaminação por micro-organismos (IV=6,71), também, não houve efeito significativo das diferentes concentrações de AIB ($p=0,1200$), período de cultivo ($p=0,9191$), e nem da interação entre eles ($p=0,9932$). Foi observada média geral de 24,84% de brotações contaminadas por micro-organismos, muito elevada para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, e significativamente superior ao valor encontrado no experimento anterior (1,65%).

A contaminação microbiana, seja ela exógena ou endógena, é considerando um grave problema para o cultivo *in vitro*, uma vez que limita o estabelecimento e o desenvolvimento de muitas espécies. Apesar de a maioria desses micro-organismos não serem patogênicos, o seu crescimento é acelerado no meio de cultivo, desencadeando a competição por nutrientes com os explantes e prejudicando o desenvolvimento destes (XAVIER *et al.*, 2009). Há relatos na literatura de que a contaminação das sementes de

espécies florestais pode estar relacionada, dentre outros fatores, com a forma que as sementes foram coletadas e/ou armazenadas (FANTINEL et al., 2013; FERREIRA, 1989), ou ainda, a desinfestação e manipulação ineficiente do material.

Para a raiz primária (IV=5,37) e a raiz secundária (IV=3,10) houve efeito significativo apenas do período de cultivo ($p=0,0000$; $p=0,0458$ respectivamente), porém não foi constatado efeito significativo das diferentes concentrações de AIB ($p=0,8473$; $p=0,0770$ respectivamente) e da interação entre os dois fatores principais ($p=0,8473$; $p=0,0770$ respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias de sobrevivência (%), formação de raiz primária (%) e raiz secundária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de avaliação (15 ou 30 dias), independentemente do emprego de ácido indolbutírico – AIB (0, 5, 10, 15 ou 20 μM) em tratamento “pulse” por 15 dias, no meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Período (dias)	Sobrevivência (%)	Raiz primária (%)	Raiz secundária (%)
15	80,50 a*	0,00 b	0,00 b
30	57,32 b	25,18 a	5,3 a
Média	68,91	12,59	2,65
IV**	6,16	5,37	3,10

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. ** Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).
Fonte: A autora (2016).

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, a formação da raiz primária foi de 25,18%, valor que ainda não pode ser considerado satisfatório para o enraizamento *in vitro* de espécies lenhosas. A formação de raiz secundária nas brotações, conseqüentemente, também foi baixa aos 30 dias (5,3%), ao contrário do que se esperava com o uso do regulador de crescimento AIB (Tabela 3). No experimento anterior, testando as diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM, a formação de raiz primária aos 30 dias, independentemente da concentração de sais do meio nutritivo, foi de 23,95% (Tabela 2),

sem o acréscimo de regulador de crescimento, evidenciando que o tratamento “pulse” não influenciou expressivamente a formação de raízes em *Luehea divaricata* no presente estudo.

Cabe salientar que os fatores externos, de natureza física e química, também podem influenciar no enraizamento *in vitro*, estimulando-o ou inibindo-o. Além disso, fatores como o genótipo da planta-matriz, as substâncias de reserva como carboidratos, nutrição mineral, condições de crescimento, entre outros aspectos podem, também, interferir no desenvolvimento *in vitro* de plantas (TORRES et al., 1998). Em geral, a composição do meio nutritivo, o tipo e concentrações de auxina são as variáveis que mais influenciam o enraizamento, sendo as respostas dependentes do genótipo. É provável que os níveis endógenos de auxina nos tecidos vegetais dos segmentos nodais inicialmente cultivados no presente trabalho, encontravam-se adequados a ponto de induzir o enraizamento *in vitro* sem a necessidade de suplementação exógena. Muitas vezes, um alto nível de auxinas endógenas pode ser suficiente para promover a indução de raízes adventícias primordiais (SOUZA; PEREIRA, 2007) e com isso os reguladores de crescimento adicionados ao meio nutritivo desempenham uma reação negativa no balanço hormonal da planta, inibindo a formação das raízes, fato que ocorreu no presente trabalho.

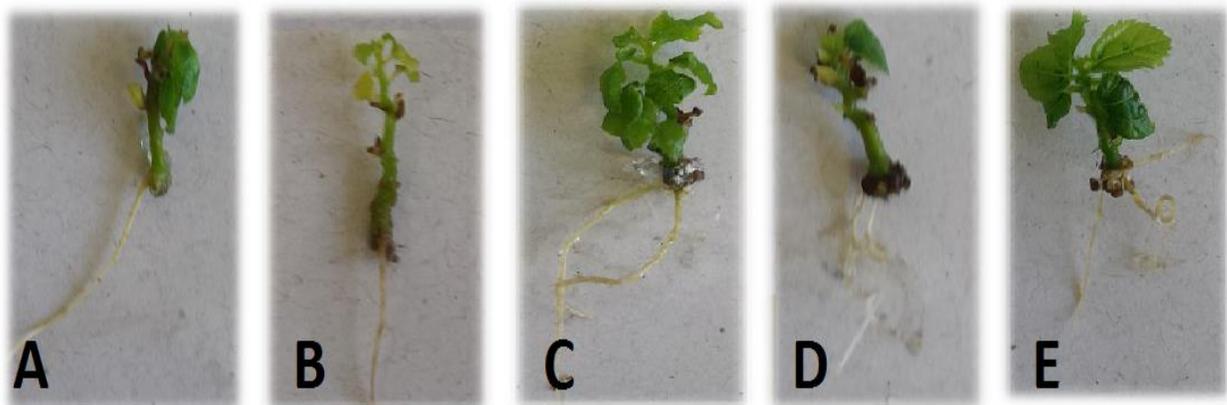
Em relação à altura das brotações ($p=0,2214$; $IV=1,66$), que foi avaliada somente aos 45 dias de cultivo, não houve efeito significativo das diferentes concentrações de AIB, sendo obtida uma média geral de apenas 0,96cm. Para o comprimento de raiz ($p=0,0078$; $IV=7,78$), igualmente avaliado aos 45 dias de cultivo *in vitro*, houve efeito significativo das diferentes concentrações do regulador de crescimento. O maior comprimento de raiz foi observado na concentração 10 μ M de AIB (Figura 5C), com uma média de 1,62cm de comprimento, o qual diferiu estatisticamente das demais médias. O tratamento com 15 μ M de AIB (Figura 5D) apresentou a menor média de comprimento de raiz (0,27cm), não diferindo estatisticamente dos tratamentos na ausência de AIB (Figura 5A), com 5 μ M (Figura 5B) ou 20 μ M (Figura 5E) da auxina.

De acordo com os resultados obtidos, o regulador de crescimento não influenciou significativamente o desenvolvimento e a formação de raízes em *Luehea divaricata*, apenas o comprimento da raiz foi influenciado positivamente pela adição de 10 μ M de

AIB. De maneira similar, a formação *in vitro* de raízes adventícias em *Amburana acreana* (cerejeira) ocorreu em todos os tratamentos, independentemente da presença ou ausência de AIB, entretanto, os maiores comprimentos de raiz principal ocorreram em baixas concentrações do regulador de crescimento (FERMINO JUNIOR, 2012).

Há relatos de que, em um grande número de espécies, concentrações iguais de AIB e ANA promovem maiores porcentagens de enraizamento que o emprego dessas auxinas separadamente (TORRES et al., 1998). A concentração destes reguladores de crescimento pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular, sendo que a formação de raízes normais ocorre principalmente em concentrações mais baixas, pois as altas concentrações tendem a produzir calos (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Figura 5 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo WPM/2 após 30 dias de cultivo *in vitro* em função dos tratamentos “pulse” com ácido indolbutírico – AIB: A) na ausência; B) 5 μ M; C) 10 μ M; D) 15 μ M; e E) 20 μ M. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Fonte: A autora (2016).

O tratamento “pulse” vem sendo muito utilizado entre as espécies lenhosas florestais e frutíferas, os explantes permanecem em meio nutritivo com auxina por um período e, posteriormente, são transferidas para meio sem esse regulador de

crescimento, estimulando, assim, a rizogênese e o crescimento das raízes (FETT NETO et al., 1992). Estudos afirmam que uma menor duração do período de exposição da cultura às substâncias químicas do meio pode levar a um melhor balanço entre raiz e parte aérea, produzindo plantas mais saudáveis (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Na indução de raízes em *Ocotea porosa* (imbuia), avaliada em meio nutritivo WPM/2 ou MS/2, acrescido de AIB (0; 1,25; 2,5; 5 ou 10 μ M) durante sete dias ou com tratamento “pulse” por 10min em soluções de AIB (0; 2,5; 5 ou 10 μ M), seguido de transferência para meio nutritivo sem regulador de crescimento, foi observado que a indução de raízes em meio WPM/2, suplementado com 2,5 μ M de AIB proporcionou 57,5% de enraizamento *in vitro*. Já com a adição de 10 μ M de AIB em meio MS/2 obteve-se 68,7% de enraizamento, enquanto o tratamento “pulse” por 10min em solução de 5 μ M ou 10 μ M de AIB, induziu 61,1% e 62,5% de enraizamento para essa espécie respectivamente (PELEGRINI, 2008).

Já para *Gypsophila paniculata* (cravo-de-amor), planta ornamental muito cultivada, não foi necessário o uso de AIB na fase de enraizamento *in vitro* (BOSA et al., 2003), de maneira semelhante ao observado no presente estudo. Igualmente, em *Tectona grandis* (teca), não houve diferença significativa entre as doses testadas de AIB (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg L⁻¹ (equivalentes a 0,0; 2,46; 4,92; 7,38 e 9,84 μ M respectivamente), provavelmente por esta espécie possuir níveis endógenos de auxina suficientes para iniciar o enraizamento (FERNANDES, 2012). Com isso, a indução *in vitro* de raízes também pode ser obtida sem o uso de auxina exógena, como descrito na micropropagação da espécie arbórea *Salix pseudolasiogyne* (PARK et al., 2008).

Por outro lado, para a formação *in vitro* de raízes adventícias de *Swietenia macrophylla* (mogno), a concentração 0,1mg L⁻¹ (equivalente a 0,49 μ M) de AIB foi mais eficiente do que as concentrações mais altas, 1,3 ou 5mg L⁻¹ (equivalentes a 6,39 ou 24,61 μ M) (LOPES et al., 2001). Em *Eugenia pyriformes* (uvaia), após 40 dias de cultivo *in vitro*, a maior porcentagem de enraizamento (60%) foi verificada no tratamento contendo 1,0mg L⁻¹ (equivalente a 4,92 μ M) de AIB, seguida do tratamento contendo 2,0mg L⁻¹ (equivalente a 9,84 μ M) de AIB (50%). Da mesma forma, os maiores comprimentos de raiz (1,23cm) foram observados nos tratamentos contendo 1,0mg L⁻¹ (equivalente a 4,92 μ M) ou 2,0mg L⁻¹ (equivalente a 9,84 μ M) de AIB (NASCIMENTO et al., 2008). Já em *Hancornia speciosa* (mangabeira), a maior indução de raízes ocorreu

quando foram utilizadas doses de AIB de 3,0 a 4,0mg L⁻¹ (equivalentes a 14,76 a 19,69µM) (SARTOR, 2011). Para *Cordia trichotoma* (louro-pardo), o enraizamento das brotações foi obtido em meio nutritivo WPM com 0,5mg L⁻¹ (equivalente a 2,5 µM) de AIB combinado com 1,5g L⁻¹ de carvão ativado (MANTOVANI et al., 2001). Assim, a concentração ótima de AIB para se obter uma adequada porcentagem de enraizamento varia de acordo com cada espécie ou cultivar utilizada.

As diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,5 ou 1,0µM) e os diferentes períodos de escuro (0, 2, 4 ou 6 dias), bem como a interação entre os fatores, não foram significativas para o enraizamento *in vitro* de *Rubus sp* (amoreira-preta) cv. Ébano em meio MS/2. Provavelmente, a espécie estudada apresentou quantidade de auxina endógena suficiente para estimular o enraizamento, não respondendo, portanto, à adição de auxina exógena (SALISBURY; ROOS, 1991). Igualmente, a ausência de AIB resultou em maior número e comprimento de raiz para *Rubus sp* (amoreira-preta) cv. Ébano (RADMANN et. al, 2003). Segundo Assis e Teixeira (1998), há várias evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada, pois se observa grande variação entre espécies, cultivares e clones, com relação à maior ou menor habilidade natural em formar raízes.

4.2.3 Efeito de diferentes concentrações de Ácido Naftalenoacético (ANA) na rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*

Para a sobrevivência (IV=5,73), houve efeito significativo apenas do período de cultivo (p=0,0067), não sendo verificado efeito significativo das diferentes concentrações de ANA (p=0,0908) e da interação entre eles (p=0,7526). O mesmo comportamento foi observado para o estabelecimento (IV=6,35), em que houve efeito significativo apenas do período de cultivo (p=0,0025), não havendo efeito significativo das diferentes concentrações de ANA (p=0,0643) e da interação entre os fatores principais (p=0,7075) (Tabela 4).

Em relação à contaminação por micro-organismos (IV=7,94), houve efeito significativo das diferentes concentrações de ANA (p=0,0368) (Figura 6), e do período de cultivo (p=0,0131) (Tabela 4), enquanto que para a interação não foi observado efeito

significativo ($p=0,1513$). Em relação às concentrações da auxina, a contaminação observada ajustou-se a uma equação de terceiro grau (Figura 6), enquanto que em relação ao período de cultivo, a maior média foi observada aos 45 dias de cultivo (Tabela 4), a qual, contudo, não diferiu daquela observada aos 15, a qual, por sua vez, não diferiu da contaminação média verificada aos 30 dias.

Para a formação da raiz primária ($IV=4,85$), houve efeito significativo do período de cultivo ($p=0,0001$) (Tabela 4), não havendo efeito significativo das diferentes concentrações da auxina ($p=0,3937$) nem da interação entre eles ($p=0,9532$).

Tabela 4 - Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), contaminação microbiana (%) e formação de raiz primária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de avaliação (15, 30 ou 45), independentemente do emprego de ácido naftalenoacético - ANA (0, 5, 10, 15 ou 20 μ M), no meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Período (dias)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Contaminação (%)	Formação de raiz 1 ^a (%)
15	99,02 a*	70,17 a	17,14 ab	0,0 b
30	81,88 ab	57,80 ab	0,94 a	2,82 b
45	73,31 b	41,65 b	22,85 b	17,0 a
Média	84,74	56,54	13,64	6,61
IV**	5,73	6,35	7,94	4,85

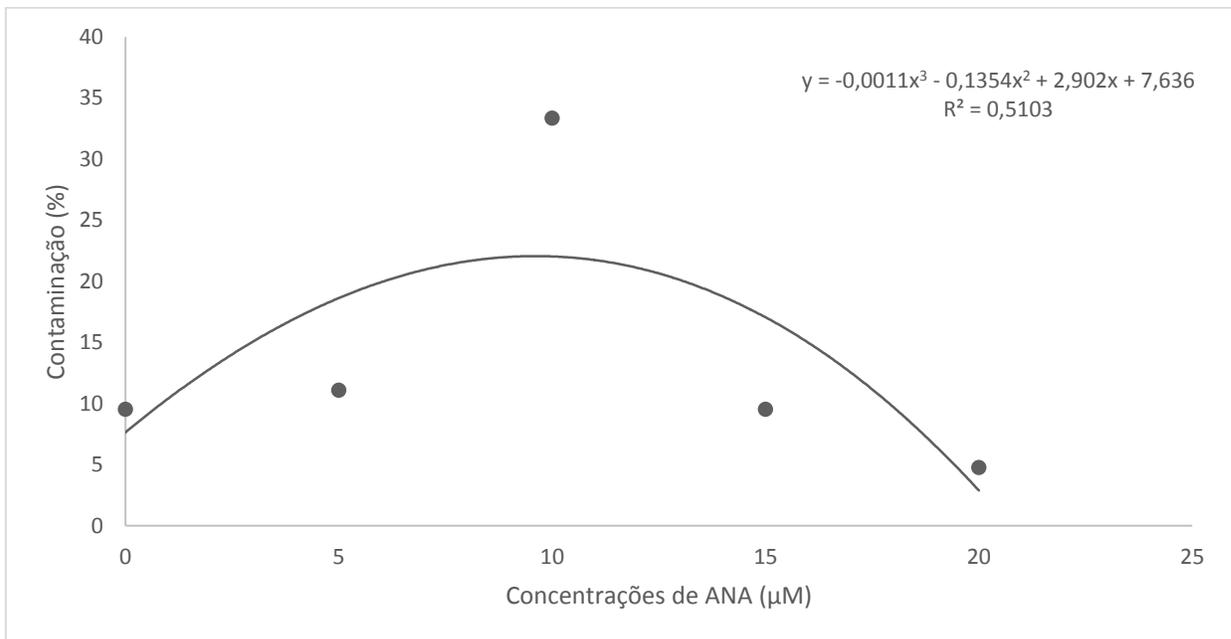
* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. ** Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).
Fonte: A autora (2016).

A sobrevivência foi de 99,02% e o estabelecimento foi de 70,17% aos 15 dias de cultivo, reduzindo-se para 73,31% e 41,65% aos 45 dias respectivamente (Tabela 4). Esse fato pode ser atribuído aos efeitos indesejáveis provocados por ANA na planta, por ser um regulador de crescimento mais tóxico aos tecidos vegetais (WEAVER, 1976) comparativamente a outros. A contaminação microbiana observada aos 45 dias pode ser

considerada alta, pois apresentou média de 22,85%, similar àquela verificada aos 15 dias, as quais não diferiram significativamente entre si (17,14%). Da mesma maneira, esta média não diferiu daquela observada aos 30 dias (0,94%), que foi muito baixa, entretanto, deve-se esclarecer que na avaliação efetuada aos 15 dias foram eliminadas as brotações contaminadas, diminuindo assim a porcentagem de contaminação aos 30 dias.

A formação de raiz primária (Tabela 4), aos 45 dias de cultivo, foi de apenas 17,0%, possivelmente devido à alta formação de calos nos explantes em todos os tratamentos, indicando que a presença do regulador de crescimento não foi satisfatória para a rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*.

Figura 6 – Média de contaminação microbiana (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função das diferentes concentrações de ácido naftalenoacético - ANA (0, 5, 10, 15 ou 20 μ M), no meio nutritivo WPM/2, independentemente do período de cultivo (15; 30 ou 45 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



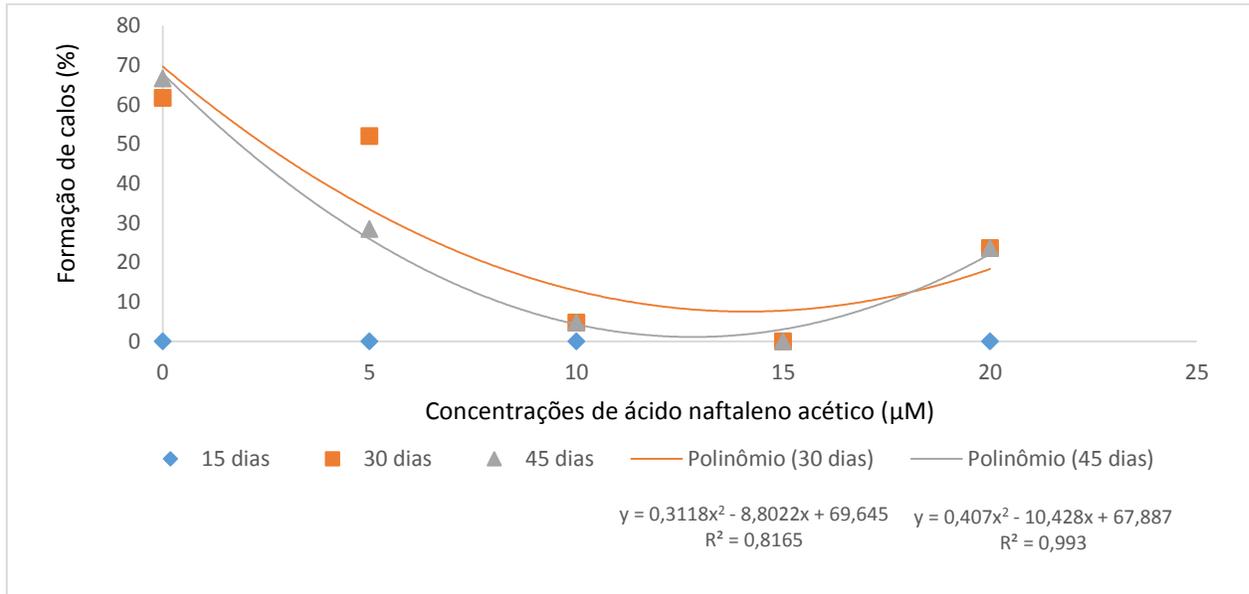
Fonte: A autora (2016).

O tratamento com a maior concentração de ANA (20 μ M) manifestou a menor porcentagem de contaminação (4,76%). A contaminação *in vitro* é um problema frequentemente relatado na micropropagação de espécies florestais. As pesquisas sobre a relação entre a contaminação e o uso de reguladores de crescimento ainda são escassas, contudo, alguns estudos indicam uma tendência ao aumento na contaminação dos explantes com o aumento na concentração de reguladores de crescimento no meio nutritivo (COSTA et al., 2007; ROSA, 2009), fato que não foi verificado no presente trabalho. A contaminação observada no presente ensaio pode ser atribuída a outros fatores, como a manipulação ineficiente do material vegetal ou, ainda, à possível presença de micro-organismos endógenos, os quais, muitas vezes, podem estar presentes nos tecidos vegetais de maneira latente em determinados períodos e, posteriormente, manifestar-se em decorrência de alterações ou estresses sofridos pelas culturas.

Para a variável raiz secundária (IV=2,27), não houve efeito significativo das diferentes concentrações de ANA ($p=0,1828$), nem do período de cultivo ($p=0,0548$), e, tampouco da interação entre eles ($p=0,1378$). A média geral de formação de raiz secundária foi de apenas 1,25%, fato que pode ser atribuído à contaminação que foi elevada e não permitiu o desenvolvimento da espécie, e também à alta formação de calos na base.

Para a formação de calos (IV=5,96), houve efeito significativo das diferentes concentrações de ANA ($p=0,0000$), do período de cultivo ($p=0,0000$), e da interação entre os fatores principais ($p=0,0025$), em que ajustou-se uma equação de segundo grau para o período de 30 e 45 dias de cultivo, com a MET sendo estimada a 14,11 μ M e 12,81 μ M respectivamente. Aos 15 dias de cultivo *in vitro* não foi evidenciada formação de calos (Figura 7; Figura 8).

Figura 7 - Média de formação de calos (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo (15, 30 ou 45 dias) e as diferentes concentrações de ácido naftalenoacético – ANA (0, 5, 10, 15 ou 20 μM), no meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



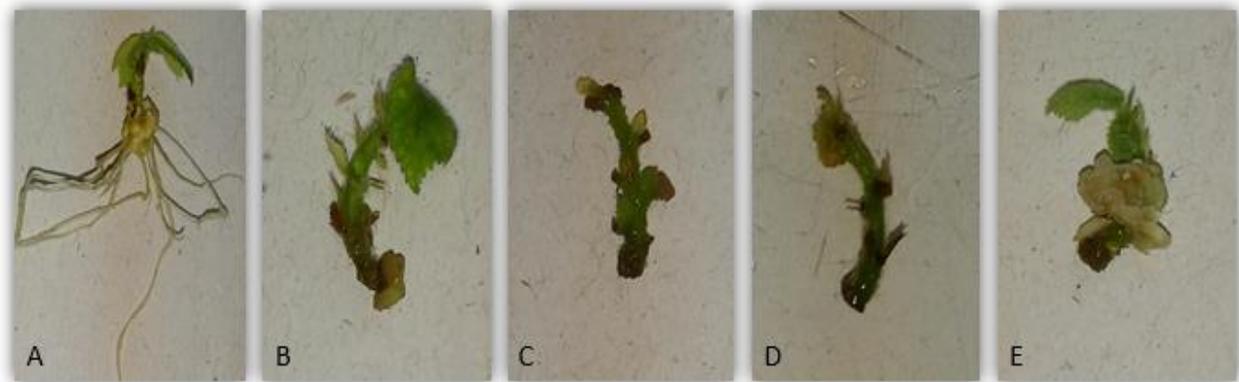
Fonte: A autora (2016).

A formação de calos foi alta aos 30 e 45 dias de cultivo mesmo na ausência do regulador de crescimento (Figura 7). Na ausência do regulador de crescimento houve 61,71% e 66,57% de formação de calos aos 30 e 45 dias, respectivamente, fato que pode estar relacionado à injúria causada no explante, que levou à formação dos calos na base das brotações de *Luehea divaricata*. Com 5 μM de ANA houve 52% de formação de calos (30 dias), que reduziu-se para 28,42% aos 45 dias, devido à alta contaminação do material neste tratamento, sendo então eliminadas as unidades amostrais contaminadas, o que resultou em uma redução na média de contaminação, conforme explicado anteriormente.

Na presença de 20 μM de ANA, a formação de calos foi igualmente superior, em que 23,57% das brotações apresentaram calosidades aos 30 e 45 dias de cultivo, apenas a concentração de 15 μM não apresentou formação de calos em nenhum dos períodos avaliados. Semelhante ao observado no presente trabalho, em brotações obtidas a partir

de segmentos nodais de *Cordia trichotoma* (louro-pardo), a auxina ANA promoveu alta formação de calosidades e, assim, inibiu a multiplicação e o desenvolvimento das brotações, além de dificultar o enraizamento e o desenvolvimento do sistema radicular (MANTOVANI et al., 2001).

Figura 8 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas em meio nutritivo WPM/2 após 45 dias de cultivo *in vitro*, com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético - ANA: A) na ausência; B) 5 μ M; C) 10 μ M; D) 15 μ M; e E) 20 μ M. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Fonte: A autora (2016).

Em relação ao comprimento de raiz ($p=0,3280$; $IV=14,67$), avaliado apenas aos 45 dias, não houve efeito significativo do único fator principal testado, as diferentes concentrações de ANA, apresentando média geral baixa, 0,35cm. Como visto no experimento que avaliou as diferentes concentrações de sais no meio nutritivo WPM, o comprimento de raiz foi de 1,87cm, sem uso do regulador de crescimento, o que reforça o fato da auxina ANA não influenciar positivamente a formação de raízes. Para a variável altura ($p=0,7316$; $IV=8,76$), igualmente avaliada somente aos 45 dias, também não houve efeito significativo das diferentes concentrações da auxina, sendo observada uma média geral de 0,81cm. Este valor também é considerado baixo, visto que em meio WPM/2 (experimento testando as diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM), a

altura das brotações foi de 2,31cm, evidenciando novamente que a auxina testada neste experimento não foi eficaz no desenvolvimento da parte aérea da espécie.

O desenvolvimento das brotações após 45 dias de cultivo *in vitro* foi bem inferior ao esperado (Figura 8), o que pode ser atribuído ao efeito da adição de auxinas, que podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente a formação de calos (TORRES et al., 1998). O crescimento do calo em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina, dependente unicamente da auxina, dependente exclusivamente da citocinina ou dependente de ambas. Assim, determinados tecidos mostram dependência total da presença de reguladores de crescimento no meio nutritivo, enquanto que outros sintetizam naturalmente as quantidades que necessitam (YEOMAN, 1970), o que parece ser o caso em *Luehea divaricata*.

Em espécies com facilidade para enraizar, a formação de calos e a formação de raízes são independentes um do outro, embora ambos envolvam divisões celulares. Sua ocorrência simultânea é devida à sua dependência de condições internas e ambientais similares. Em algumas espécies, a formação de calos é um precursor da formação de raízes, enquanto que, em outras espécies, o excesso de calos pode dificultar o enraizamento (HARTMANN et al., 2002), fato que ocorreu no presente trabalho.

Em microestacas de *Cydonia oblonga* (marmeleiro) cv. MC, aos 35 dias de cultivo *in vitro* na presença de ANA (5 μ M), a porcentagem de enraizamento foi de 39,52%, e houve baixa formação de calos (0,84). O número médio de raízes (2,33) foi satisfatório nessa mesma concentração do regulador de crescimento, e o comprimento médio das raízes foi de 2,83cm (ERIG; SCHUCH, 2004). Grattapaglia e Machado (1998), afirmam que quando a concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, ocorre o comprometimento da rizogênese. O aumento na concentração de auxina exógena, aplicada em estacas, provoca efeito estimulador de raízes até um valor máximo, a partir do qual qualquer acréscimo de auxinas tem efeito inibitório (FACHINELLO et al.; 1995).

Em *Malus domestica* (macieira), a porcentagem de enraizamento utilizando ANA ou AIB no meio nutritivo foi similar, e a melhor concentração foi de 3 μ M, obtendo-se perto de 90% de enraizamento. No entanto, os autores ressaltaram que, embora os dois reguladores de crescimento tenham apresentado respostas semelhantes, ANA provocou efeitos indesejados na qualidade das raízes, principalmente no aumento da formação de

calos e na produção de raízes grossas (CENTELLAS et al., 1999). Com isso, as auxinas podem auxiliar na rizogênese de algumas espécies, contudo, é necessário selecionar a fonte de auxina mais adequada e, também, promover um balanço hormonal adequado nos tecidos, sendo este específico para cada espécie, genótipo e estado fisiológico das plantas (DIAS et al., 2012).

4.2.4 Rizogênese *in vitro* com diferentes meios de cultivo

Para a variável sobrevivência (IV=4,28), não houve efeito significativo do meio de cultivo ($p=0,0150$), havendo, porém, efeito significativo do período de cultivo ($p=0,0028$) e da interação entre os dois fatores principais ($p=0,0078$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias de sobrevivência (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias) e os diferentes meios de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Meio de cultivo	Composição		Período (dias)			Média
	Vermiculita (cm ³)	Meio nutritivo WPM/2 (mL)	15	30	45	
1	15	10	100 A a*	100 A a	100 A a	100
2	30	10	100 A a	83,34 A a	83,34 A a	88,89
3	15	20	100 A a	83,34 ABa	66,67 B ab	83,34
4	30	20	100 A a	100 A a	100 A a	100
5	15	30	100 A a	100 A a	33,34 B b	77,78
6	30	30	100 A a	100 A a	100 Aa	100
					Média	91,67

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

De maneira geral, foram observadas elevadas médias de sobrevivência *in vitro* para as brotações de *Luehea divaricata*, exceto para o meio de cultivo 5 (15cm³ de vermiculita + 30mL de meio nutritivo) (33,34%), o qual, entretanto, não diferiu estatisticamente do meio de cultivo 3 (15cm³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo) (66,67%) aos 45 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 5). A sobrevivência foi também elevada em brotações de *Peltophorum dubium* (canafístula) cultivadas por 60 dias em meio de cultivo composto por 30cm³ de vermiculita e meio nutritivo MS acrescido de 10µM de AIB (CURTI, 2011). Da mesma forma, em porta-enxertos de *Prunus sp.* (pessegueiro) cultivar 'Marianna comum' cultivados em ágar + vermiculita, a sobrevivência foi de 100% após 40 dias (TIBOLA et al., 2004). Os substratos inertes como a vermiculita e a perlita podem ser alternativas mais baratas para o enraizamento de espécies lenhosas (TORRES et al., 1998).

Em relação ao estabelecimento *in vitro* (IV=5,31), houve efeito significativo do meio de cultivo ($p=0,0007$) e do período de cultivo ($p=0,0133$) (Tabela 6), não sendo observado efeito significativo da interação entre os fatores principais ($p=0,6403$). Os meios de cultivo 6 (30cm³ de vermiculita + 30mL de meio nutritivo WPM/2), 4 (30cm³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo WPM/2), 3 (15cm³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo WPM/2) e 1 (15cm³ de vermiculita + 10mL de meio nutritivo WPM/2) não diferiram significativamente entre si em relação ao estabelecimento, e apresentaram as maiores médias para essa variável (100%, 90,67%, 81,44% e 73,72% respectivamente).

Para a formação de raiz primária (IV=6,65), houve efeito significativo apenas do período de cultivo ($p=0,0000$) (Tabela 6), não sendo verificado o mesmo para o meio de cultivo ($p=0,1884$) e, tampouco, para a interação entre os dois fatores ($p=0,2720$). Na Tabela 6 é possível observar que aos 30 e 45 dias, o estabelecimento foi superior a 80%, já para a variável formação de raiz primária, o maior enraizamento foi aos 45 dias de cultivo *in vitro*, sendo observadas 39,61% de brotações enraizadas.

Tabela 6 - Médias de estabelecimento (%) e formação de raiz primária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) em função do período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias), independentemente do meio de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Período (dias)	Estabelecimento (%)	Raiz 1ª (%)
15	66,53 b	0,91 b
30	84,05 a	11,91 b
45	85,06 a	39,61 a
Média	78,55	17,48
IV**	5,31	6,65

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Índice de variação (IV), calculado por CV/\sqrt{N} , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).
Fonte: A autora (2016).

A porcentagem de rizogênese verificada aos 45 dias (39,61%), independente da combinação de meio nutritivo com vermiculita foi semelhante à porcentagem de enraizamento obtida quando foram testadas as diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM, no primeiro experimento, relatado anteriormente. Neste caso, a porcentagem de formação de raiz primária aos 45 dias, independente da concentração de sais do meio nutritivo, foi de 40,52% (Tabela 2), valores considerados elevados frente às dificuldades observadas no enraizamento *in vitro* de espécies lenhosas. Estes resultados confirmam que *Luehea divaricata* desenvolve suas raízes com maior eficiência em meio nutritivo WPM independentemente das concentrações de sais testadas, ou em WPM combinado com vermiculita, sendo dispensável o uso de reguladores de crescimento ao meio nutritivo para essa finalidade, o que reduz os custos de enraizamento *in vitro* da espécie.

Para a variável raiz secundária (IV=5,37), houve efeito significativo do período de cultivo ($p=0,0000$) e da interação entre o período e o meio de cultivo ($p=0,0220$) (Tabela 7). Não houve efeito significativo para o fator principal meio de cultivo ($p=0,0570$).

Tabela 7 – Médias de raiz secundária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias) e os diferentes meios de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Meio de cultivo	Composição		Período (dias)			Média
	Vermiculita (cm ³)	Meio nutritivo WPM/2 (mL)	15	30	45	
1	15	10	0,0 Aa*	0,0 Aa	11,00 Abc	3,67
2	30	10	0,0 Aa	0,0 Aa	5,50 Ac	1,83
3	15	20	0,0 Ba	0,0 Ba	38,83 Aab	12,94
4	30	20	0,0 Ba	0,0 Ba	49,50 Aa	16,50
5	15	30	0,0 Aa	0,0 Aa	5,50 Ac	1,83
6	30	30	0,0 Ba	0,0 Ba	38,83 A ab	12,94
					Média	8,28

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

A formação de raiz secundária ocorreu apenas aos 45 dias, e os meios de cultivo 6 (30cm³ de vermiculita + 30mL de meio nutritivo WPM/2), 4 (30cm³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo WPM/2) e 3 (15cm³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo WPM/2) mostraram-se novamente superiores, com médias de 38,83%, 49,50% e 38,83%, respectivamente (Tabela 7).

Já para a variável contaminação por micro-organismos (IV=7,42), houve efeito significativo do meio de cultivo (p=0,0416), e da interação entre a os dois fatores principais (p=0,0107) (Tabela 8). Não houve efeito significativo do período de cultivo (p=0,4018), apresentando uma média geral baixa, de 9,26%.

Tabela 8 – Médias de contaminação microbiana (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da interação entre o período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias) e os diferentes meios de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

Meio de cultivo	Composição		Período (dias)			Média
	Vermiculita (cm ³)	Meio nutritivo WPM/2 (mL)	15	30	45	
1	15	10	0,0 A a*	0,0 A a	16,67 A a	5,56
2	30	10	16,67 A a	0,0 A a	0,0 A a	5,56
3	15	20	16,67 A a	16,67 A a	0,0 A a	11,11
4	30	20	0,0 A a	0,0 A a	0,0 A a	0,00
5	15	30	0,0 A a	66,67 B b	16,67 A a	27,78
6	30	30	0,0 A a	0,0 A a	16,67 A a	5,56
					Média	9,26

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

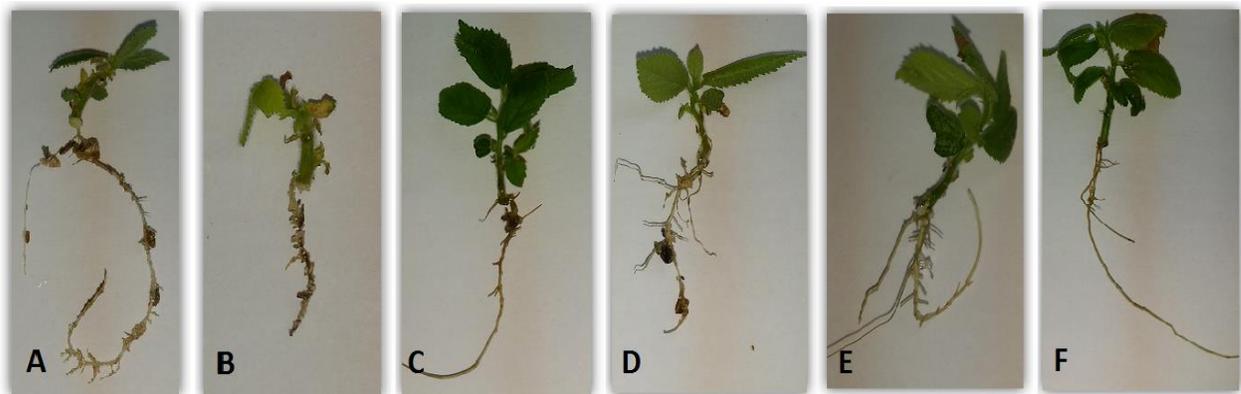
O meio de cultivo 4 (30cm³ de vermiculita + 20mL de meio nutritivo WPM/2) não apresentou contaminação ao final do experimento, e a maior porcentagem média de contaminação ocorreu no meio de cultivo 5 (15cm³ de vermiculita + 30mL de meio nutritivo WPM/2), aos 30 dias com 66,67% (Tabela 8). Cabe salientar que as unidades experimentais contaminadas foram removidas do experimento, uma vez que os segmentos nodais não se desenvolveram após a contaminação, fato que explica, aos 30 dias, a contaminação ser de aproximadamente 70% no tratamento 5, e aos 45 dias, ter reduzido para 16,67%.

Em relação ao comprimento da raiz ($p=0,5705$; $IV=17,28$), avaliado apenas aos 45 dias de cultivo, não houve efeito significativo do meio de cultivo (Figura 9). A média geral observada para essa variável foi de 1,11cm, considerada satisfatória para espécies lenhosas. Em porta-enxertos de *Prunus sp.* (pessegueiro) 'Marianna comum' cultivados em meio nutritivo MS combinado com ágar + vermiculita, o comprimento da raiz foi de

1,06cm, inferior aos meios nutritivos combinados apenas com ágar (1,32cm), ou combinados somente com vermiculita (1,52cm) (TIBOLA et al., 2004).

Para a variável altura das brotações ($p=0,5347$; $IV=10,47$), também avaliada apenas aos 45 dias, não houve efeito significativo do meio de cultivo, apresentando média geral de 1,04cm, considerada satisfatória, visto que as médias de altura nos experimentos anteriores, com reguladores de crescimento, foram mais baixas (0,96cm com AIB e 0,81cm com ANA).

Figura 9 - Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) cultivadas após 45 dias *in vitro* em meio de cultivo composto por meio nutritivo WPM/2 e vermiculita: A - 10mL de meio nutritivo + 15cm³ de vermiculita; B - 10mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita; C - 20mL de meio nutritivo + 15cm³ de vermiculita; D - 20mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita; E - 30mL de meio nutritivo + 15cm³ de vermiculita; e F - 30mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.



Fonte: A autora (2016).

No enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus sp.* (pessegueiro), no meio nutritivo MS composto por vermiculita + ágar, ocorreu a maior porcentagem de brotações enraizadas, 99,78% (TIBOLA et al., 2004). Em brotações de *Peltophorum dubium* (canafístula), os melhores resultados, tanto para a porcentagem de formação *in vitro* de raízes (36,78%) quanto para a qualidade do sistema radicular, foram obtidos com a

utilização da combinação de vermiculita, meio nutritivo MS acrescido de 10 μ M de AIB, e ágar (CURTI, 2011; CURTI; REINIGER, 2014). Na fase de enraizamento *in vitro* a vermiculita, umedecida com solução nutritiva, pode favorecer a formação de raízes pelo maior grau de aeração e porosidade que proporciona. A adição de vermiculita no meio nutritivo promove o aumento no número e comprimento de raízes, na matéria fresca total e radicular, além de maiores porcentagens de enraizamento (TORRES et al., 1998).

O emprego de substratos alternativos para a rizogênese de espécies lenhosas, visando à obtenção de um sistema radicular mais adequado para a adaptação da planta em casa de vegetação, já foi testado em alguns trabalhos (TIBOLA et al., 2004; CURTI; REINIGER, 2014; DAMIANI; SCHUCH, 2009). Nesse sentido, Grattapaglia e Machado (1998) sugeriram que vermiculita ou perlita embebidas com meio líquido podem ser alternativas mais econômicas e dar melhores resultados do que o ágar durante essa fase da micropropagação.

4.2 CONCLUSÕES

- O meio nutritivo WPM, em que a concentração dos sais é reduzida a 50% (WPM/2) apresenta, de maneira geral, resultados mais promissores para o desenvolvimento do sistema radicular de brotações de *Luehea divaricata*, o que resulta, adicionalmente, em uma economia na composição do meio nutritivo WPM.
- É necessário um período de pelo menos 45 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM/2 para que ocorra a rizogênese das brotações de *Luehea divaricata* sem a adição de reguladores de crescimento.
- O tratamento “pulse” com diferentes concentrações da auxina Ácido Indolbutírico (AIB) ou o emprego de diferentes concentrações da auxina Ácido Naftalenoacético (ANA) não são eficientes em promover a rizogênese *in vitro* em *Luehea divaricata*.
- Os meios de cultivo compostos por 20mL de meio nutritivo WPM/2 + 15cm³ de vermiculita (Tratamento 3), 20mL de meio nutritivo WPM/2 + 30cm³ de vermiculita

(Tratamento 4) e 30mL de meio nutritivo WPM/2 + 30cm³ de vermiculita (Tratamento 6) são mais eficientes na rizogênese *in vitro* de brotações de *Luehea divaricata*.

5 CAPÍTULO II

Aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratórios e estruturas de apoio do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, em Santa Maria, RS.

5.1.1 Concentrações de sacarose e diferentes substratos para a aclimatização de *Luehea divaricata*

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso em arranjo unifatorial, testando-se diferentes concentrações de sacarose (0; 10; 20 ou 30g L⁻¹), adicionadas ao meio nutritivo WPM reduzido à metade de sua concentração inicial (WPM/2), totalizando quatro tratamentos. Foram utilizadas nove repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com volume de 150mL preenchidos com 30mL de meio nutritivo, contendo três explantes, totalizando 36 unidades experimentais e 108 unidades amostrais. Os explantes, com aproximadamente 5mm, foram do tipo segmentos nodais, sendo provenientes do cultivo *in vitro* de plântulas em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem reguladores de crescimento, durante 60 dias após a germinação *in vitro* (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010).

O meio nutritivo foi acrescido de 50mg L⁻¹ de mio-inositol, 7g L⁻¹ de ágar, sacarose conforme cada tratamento (0, 10, 20 ou 30g L⁻¹), o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15min a 121°C e 1atm de pressão. Os explantes foram inoculados em câmara de fluxo laminar, e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻² fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliaram-se as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência (explantes com coloração verde), porcentagem de estabelecimento

(explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), porcentagem de contaminação por micro-organismos (presença de micélios fúngicos ou colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), porcentagem de explantes com raízes primárias e secundárias, e número de folhas.

1º Período de aclimatização - *in vitro* (cinco dias em sala de cultivo, com os copos plásticos cobertos)

As brotações utilizadas neste primeiro período de aclimatização *in vitro* são provenientes do experimento anterior (diferentes concentrações de sacarose – 0, 10, 20 ou 30g L⁻¹) e, após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram transferidas para copos plásticos com diferentes substratos: vermiculita, MecPlant® (à base de casca de pinus bio-estabilizada) e H-decker® (à base de turfa, calcário calcítico e casca de pinus compostada), nas proporções 1:1 de cada. Nesta fase do experimento, utilizaram-se copos plásticos com capacidade para 180mL e foram colocados os substratos em que foram transferidas 104 unidades amostrais, sendo os copos cobertos com outros de mesmo tamanho, ambos previamente perfurados (três perfurações), para facilitar o dreno do substrato e permitir trocas gasosas entre o ambiente externo e o microclima criado no interior dos copos.

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 cultivo sob temperatura de 25±3°C, fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de 20µmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Diariamente, foi verificada a umidade no interior dos copos e, quando necessário, foram acrescidos 10mL de água destilada para manter o turgor hídrico das plantas. As plantas permaneceram nessas condições pelo período de cinco dias. Nesta fase do experimento, foram avaliadas a sobrevivência (plantas com coloração verde) (%), estabelecimento (plantas que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento) (%), clorose foliar (amarelecimento das folhas), altura das plantas (cm) e número de folhas.

2º Período de aclimatização - *in vitro* (cinco dias em sala de cultivo, com os copos plásticos descobertos)

Após cinco dias com os copos cobertos, foi retirada a cobertura dos mesmos, permanecendo no ambiente de sala de cultivo por mais cinco dias. Diariamente, foi verificada a umidade no interior dos copos e, quando necessário, foram acrescidos 10mL de água destilada para manter o turgor hídrico das plantas. Nesta fase do experimento, permaneceram 85 unidades amostrais, e foram avaliadas a sobrevivência (plantas com coloração verde) (%), estabelecimento (plantas que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento) (%), clorose foliar (amarelecimento das folhas), altura das plantas (cm), número de folhas e folhas saudáveis (%).

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

Em seguida, as plantas, nas embalagens e substratos respectivos de cada tratamento, foram transferidas para casa de vegetação em condições de temperatura e umidade controladas, onde permaneceram por mais 30 dias. Nesta fase do experimento, permaneceram 60 unidades amostrais, e foram avaliadas a sobrevivência (plantas com coloração verde) (%), estabelecimento (plantas que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento) (%), clorose foliar (amarelecimento das folhas), formação de raiz primária e raiz secundária (%), altura das plantas (cm) e número de folhas. Ainda, foi avaliado o comprimento de raízes (cm), massa fresca (mg) e massa seca total (mg).

5.1.2 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. 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, para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos quantitativos,

foi realizada análise de regressão polinomial 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). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

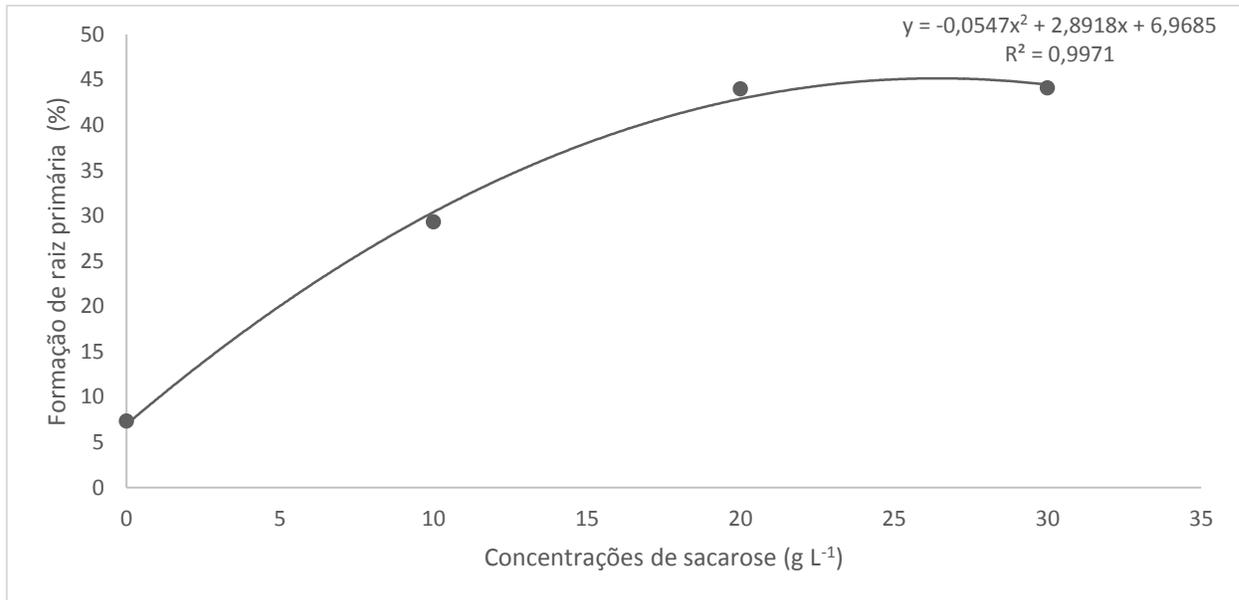
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Concentrações de sacarose e diferentes substratos para a aclimatização de *Luehea divaricata*

Aos 30 dias de cultivo *in vitro* não houve efeito significativo das diferentes concentrações de sacarose para a sobrevivência ($p=0,4055$), sendo observada uma elevada média geral de 97% e um índice de variação (IV) de 2,37. Para a variável estabelecimento ($p=0,1645$; $IV=3,68$), também não houve efeito significativo das diferentes concentrações de sacarose, apresentando média geral de 81,27% de plantas estabelecidas. Da mesma maneira, não houve efeito significativo para a variável contaminação por micro-organismos ($p=0,7463$; $IV=5,84$) do único fator testado, sendo observado que apenas 11,02% das brotações estavam contaminadas por fungos ou bactérias.

Para a variável formação de raiz primária ($p=0,0017$; $IV=4,17$), houve efeito significativo das diferentes concentrações de sacarose, e ajustou-se uma equação de segundo grau com uma MET estimada em 26,4g (Figura 10). Já para a formação de raiz secundária ($p=0,2004$; $IV=3,55$), não houve efeito significativo do fator principal, sendo obtida média geral de 6,41%.

Figura 10 - Média de formação de raiz primária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de sacarose, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.

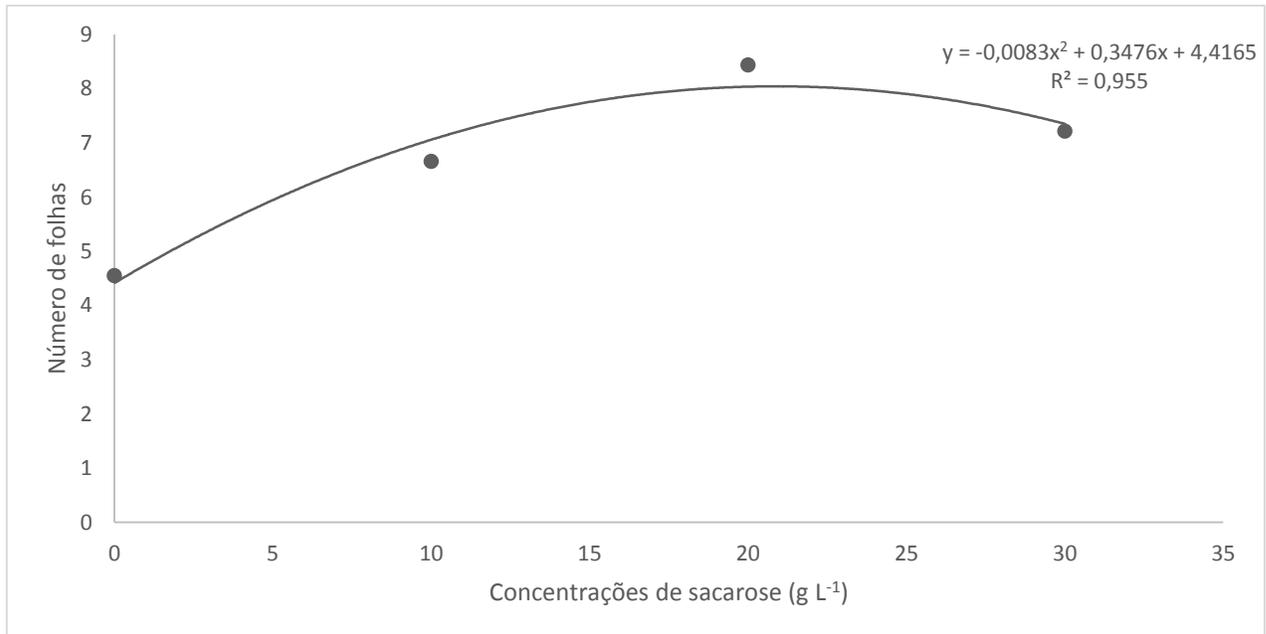


Fonte: A autora (2016).

A formação de raiz primária com 20g L⁻¹ de sacarose foi de 44%, enquanto que para 30g L⁻¹ de sacarose foi de 44,1% (Figura 10), fato que permite reduzir a quantidade de sacarose no meio nutritivo, sem perdas no enraizamento. Além disso, essa redução pode auxiliar na posterior aclimatização das brotações enraizadas durante o cultivo *in vitro*. A redução na concentração de sacarose no meio nutritivo poderá aumentar a capacidade fotossintética da planta, contribuindo para o sucesso na etapa de aclimatização (SOUZA et al., 2006; KOZAI, 1991).

Para a variável número de folhas ($p=0,0297$; $IV=7,03$), houve efeito significativo das diferentes concentrações de sacarose. Ajustou-se uma equação polinomial de segundo grau para essa variável, sendo a MET estimada em 20,93g (Figura 11).

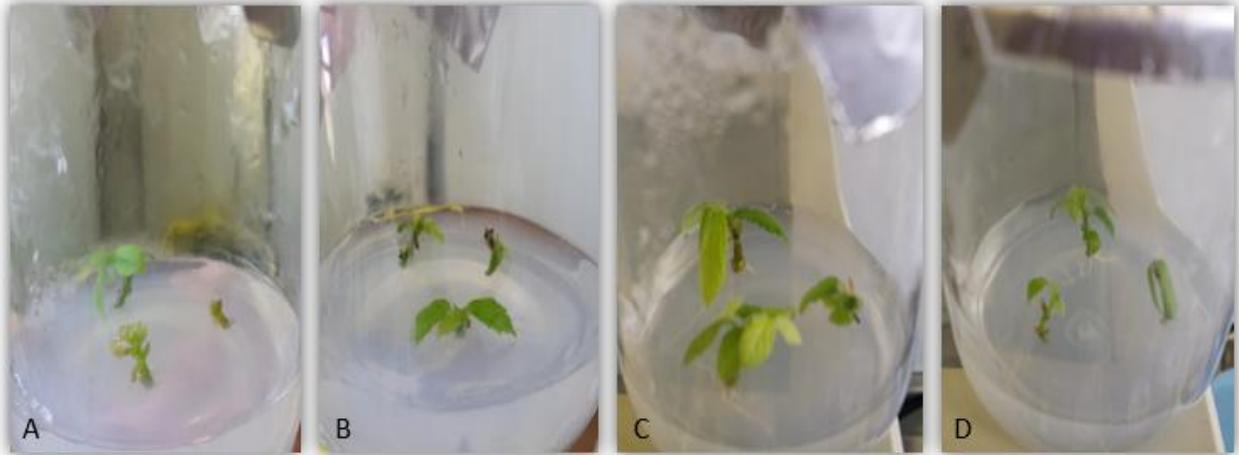
Figura 11 - Média de número de folhas em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função de diferentes concentrações de sacarose, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM/2. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.



Fonte: A autora (2016).

Do mesmo modo, para a variável número de folhas, a concentração de sacarose 20g L⁻¹ foi novamente superior, proporcionando 8,44 folhas por brotação, enquanto que a concentração 30g L⁻¹ evidenciou a formação de 7,22 folhas aos 30 dias de cultivo *in vitro* (Figura 12). A sacarose no meio nutritivo desempenha um papel de grande importância garantindo o crescimento e o desenvolvimento das plantas no ambiente *in vitro*. Esta fonte de energia supre as exigências de carboidratos, proporcionando tanto a sobrevivência inicial do explante como seu posterior estabelecimento, com a formação de novos brotos, raízes ou folhas (ERIG; SCHUCH, 2004).

Figura 12 - Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo WPM/2 e sacarose conforme o tratamento: A) na ausência; B) 10g L⁻¹; C) 20g L⁻¹; e D) 30g L⁻¹. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.



Fonte: A autora (2016).

1º Período de aclimatização - *in vitro* (cinco dias em sala de cultivo, com os copos plásticos cobertos)

Para a variável sobrevivência ($p=0,7099$; $IV=2,75$), não houve efeito significativo dos tratamentos que combinaram as diferentes concentrações de sacarose durante o cultivo *in vitro* e os substratos utilizados posteriormente no primeiro período de aclimatização *in vitro*, apresentando média geral de 96,29% de sobrevivência das brotações. Em relação ao estabelecimento ($p=0,1714$; $IV=5,83$), também não foi verificado efeito significativo dos tratamentos, sendo a média geral observada de 81,48% de plantas estabelecidas (Figura 13). As elevadas médias de sobrevivência e estabelecimento neste primeiro período de aclimatização podem ter sido favorecidas pela alocação das plantas em bandejas com uma lâmina de água em sua base, o que evitou perdas de umidade dos substratos. Além disso, esta etapa contribuiu para amenizar a transferência dos frascos de cultivo, com 100% de umidade, para um cultivo em substrato, com limitada disponibilidade de umidade, mesmo que ainda no ambiente da sala de cultivo.

Não houve efeito significativo dos diferentes tratamentos testados para a variável clorose foliar (0,69 folhas cloróticas) ($p=0,2163$; $IV=15,05$), entretanto foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre a altura das brotações ($p=0,0241$; $IV=5,23$) e o número de folhas ($p=0,0008$; $IV=11,48$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Médias de altura (cm) e número de folhas em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.(açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo *in vitro* (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no primeiro período de aclimatização, após cinco dias em sala de cultivo com os copos plásticos cobertos. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.

Tratamento	Sacarose	Substrato	Altura (cm)	Número de folhas
1	0g L ⁻¹	H-decker®	0,58 b	1,67 b
2	0g L ⁻¹	Vermiculita	0,72 b	1,89 b
3	0g L ⁻¹	MecPlant®	0,63 b	2,11 b
4	10g L ⁻¹	H-decker®	0,94 a	3,11 b
5	10g L ⁻¹	Vermiculita	0,61 b	2,22 b
6	10g L ⁻¹	MecPlant®	0,83 b	3,00 b
7	20g L ⁻¹	H-decker®	0,84 b	4,22 a
8	20g L ⁻¹	Vermiculita	0,70 b	1,89 b
9	20g L ⁻¹	MecPlant®	1,17 a	5,89 a
10	30g L ⁻¹	H-decker®	0,97 a	2,89 b
11	30g L ⁻¹	Vermiculita	0,74 b	3,00 b
12	30g L ⁻¹	MecPlant®	1,21 a	4,56 a

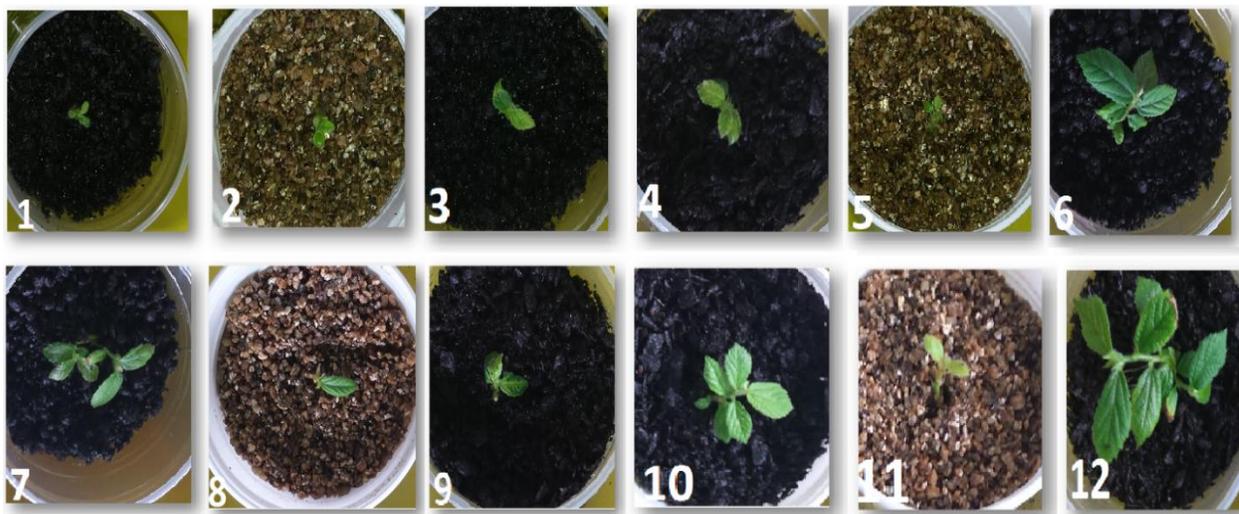
*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

O tratamento 12 apresentou brotações com altura média de 1,21cm neste primeiro período de aclimatização *in vitro*, não diferindo estatisticamente dos tratamentos 10 com 0,97cm de altura, 9 com 1,17cm e 4 com 0,94cm. Além disso, o tratamento 12 também apresentou uma boa média de número de folhas (4,56), não diferindo estatisticamente

dos tratamentos 9 (5,89 folhas) e 7 (4,22 folhas). De maneira geral, os resultados mais promissores foram observados quando as brotações de *Luehea divaricata* foram cultivadas em substrato H-decker® ou MecPlant®, enquanto que, brotações cultivadas em vermiculita não se desenvolveram de maneira satisfatória.

Figura 13 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após cinco dias em sala de cultivo sob condições controladas, cultivadas em substrato, conforme o tratamento, com os copos plásticos cobertos, no primeiro período de aclimatização e tendo sido previamente cultivadas em meio nutritivo WPM/2 na ausência ou presença de sacarose, conforme o tratamento: A) ausência de sacarose: 1) H-decker®; 2) vermiculita; 3) MecPlant; B) 10g L⁻¹: 4) H-decker®; 5) vermiculita; 6) MecPlant®; C) 20g L⁻¹: 7) H-decker®; 8) vermiculita; 9) MecPlant®; D) 30g L⁻¹: 10) H-decker®; 11) vermiculita; e 12) MecPlant®. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.



Fonte: A autora (2016).

Para otimizar o processo de micropropagação, o enraizamento *in vitro*, porém em recipientes contendo substrato, é desejável do ponto de vista econômico, pois além de melhorar a qualidade do sistema radicular, representa uma considerável redução de custos de mão-de-obra e infraestrutura, eliminando a necessidade de repicagem para um novo meio nutritivo. Em termos de qualidade, a formação de raízes diretamente no

substrato tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias, sem a formação dos calos que, muitas vezes, dificultam a conexão vascular entre caule e raiz (TORRES et al., 1998).

Microestacas de *Cydonia oblonga* (marmeleiro) cv. MC enraizadas *in vitro*, e aclimatizadas 10 dias em bandeja tampada mantida na sala de crescimento, apresentaram 100% de sobrevivência neste primeiro estágio de aclimatização em substrato com mistura de solo + substrato comercial Plantmax®. Após 10 dias em bandeja tampada mantida em telado, a sobrevivência diminuiu para 74,42%, e ao final, após mais 10 dias em bandeja destampada mantida em telado (totalizando 30 dias de aclimatização), a sobrevivência reduziu-se para 65,12% (ERIG; SCHUCH, 2004). De acordo com Scherwinski-Pereira e Fortes (2004), um dos fatores mais importantes no desenvolvimento e enraizamento das brotações é o tipo de substrato, pois devem apresentar boa retenção de água e ar. Deste modo, quanto mais distintos os tipos de substrato, apresentando composições e características diferentes, as respostas promovidas nas brotações serão diferentes.

A etapa de aclimatização é considerada bastante crítica, uma vez que 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 suscetíveis ao estresse hídrico. Por esse motivo, a aclimatização é realizada de forma gradual e cuidadosa, sendo que o sucesso desta fase depende da qualidade das brotações obtidas na fase de enraizamento, da resposta da espécie e, também, da estrutura de aclimatização que incluiu a temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (OLIVEIRA, et al., 2013; ROCHA, et al., 2008; XAVIER, et al., 2009).

2º Período de aclimatização - *in vitro* (cinco dias em sala de cultivo, com os copos plásticos descobertos)

Para as variáveis sobrevivência ($p=0,0314$; $IV=6,28$), estabelecimento ($p=0,0118$; $IV=7,01$), clorose foliar ($p=0,0313$; $IV=14,45$), altura ($p=0,0020$; $IV=7,22$) e número de folhas ($p=0,0004$; $IV=13,57$) houve efeito significativo dos tratamentos que combinaram

diferentes concentrações de sacarose durante o cultivo *in vitro* e os substratos utilizados posteriormente (Tabela 10; Tabela 11).

Tabela 10 – Médias de sobrevivência (%) e estabelecimento (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo *in vitro* (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no segundo período de aclimatização, após cinco dias em sala de cultivo com os copos plásticos descobertos. Santa Maria, RS, 2015.

Tratamento	Sacarose	Substrato	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)
1	0g L ⁻¹	H-decker®	56 b	44 b
2	0g L ⁻¹	Vermiculita	56 b	44 b
3	0g L ⁻¹	MecPlant®	44 b	33 b
4	10g L ⁻¹	H-decker®	56 b	55 b
5	10g L ⁻¹	Vermiculita	78 a	67 b
6	10g L ⁻¹	MecPlant®	89 a	89 a
7	20g L ⁻¹	H-decker®	89 a	89 a
8	20g L ⁻¹	Vermiculita	89 a	55 b
9	20g L ⁻¹	MecPlant®	100 a	89 a
10	30g L ⁻¹	H-decker®	100 a	89 a
11	30g L ⁻¹	Vermiculita	78 a	78 a
12	30g L ⁻¹	MecPlant®	100 a	89 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

Neste segundo período de aclimatização, os tratamentos 5 a 12 (Tabela 10), ou seja, todos aqueles em que a sacarose estava presente no cultivo *in vitro*, independentemente do substrato utilizado nos copos, proporcionaram elevadas médias de sobrevivência. Para a espécie *Tectona grandis* (teca), a sobrevivência nos substratos vermiculita e Plantmax® foi de 100%, sem a presença de regulador de crescimento após

30 dias de cultivo em sala de crescimento (FERMINO JÚNIOR, 2011), valor que também foi encontrado para a sobrevivência de *Luehea divaricata* nesta etapa de aclimatização.

As melhores médias de estabelecimento foram avaliadas nos tratamentos com 10, 20 ou 30g L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo e nos substratos H-decker® e MecPlant® (Tratamentos 6, 7, 9, 10, e 12) com 89% de estabelecimento, e no tratamento 11 (30g L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo e cultivo em substrato vermiculita), com 78% de plantas estabelecidas (Tabela 10).

Durante o segundo período de aclimatização *in vitro* foi observado, de modo geral, que as melhores médias, tanto de sobrevivência quanto de estabelecimento, foram obtidas pelas brotações que haviam sido cultivadas *in vitro* na presença de sacarose. Este resultado indica a importância desse componente para o desenvolvimento *in vitro* e, posteriormente, na aclimatização dos tecidos vegetais cultivados nestas condições (Figura 14).

Tabela 11 - Médias de altura (cm), folhas com clorose, número de folhas e folhas saudáveis (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo *in vitro* (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no segundo período de aclimatização, após cinco dias em sala de cultivo com os copos plásticos descobertos. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.

Tratamento	Sacarose	Substrato	Altura (cm)	Folhas com clorose	Número de folhas	Folhas saudáveis (%)
1	0g L ⁻¹	H-decker®	0,44 b*	0,89 a	1,44 b	38,19
2	0g L ⁻¹	Vermiculita	0,46 b	0,44 a	1,56 b	71,79
3	0g L ⁻¹	MecPlant®	0,36 c	0,67 a	1,33 b	49,62
4	10g L ⁻¹	H-decker®	0,78 a	1,00 a	3,22 b	68,94
5	10g L ⁻¹	Vermiculita	0,58 b	0,78 a	2,22 b	64,86
6	10g L ⁻¹	MecPlant®	0,78 a	1,78 b	3,33 b	46,55
7	20g L ⁻¹	H-decker®	0,88 a	1,33 a	3,11 b	57,23
8	20g L ⁻¹	Vermiculita	0,67 b	0,89 a	1,67 b	46,71
9	20g L ⁻¹	MecPlant®	1,28 a	2,89 b	6,00 a	51,83
10	30g L ⁻¹	H-decker®	0,91 a	1,22 a	3,67 b	66,76
11	30g L ⁻¹	Vermiculita	0,50 b	1,44 a	2,56 b	43,75
12	30g L ⁻¹	MecPlant®	1,23 a	0,67 a	5,11 a	86,89

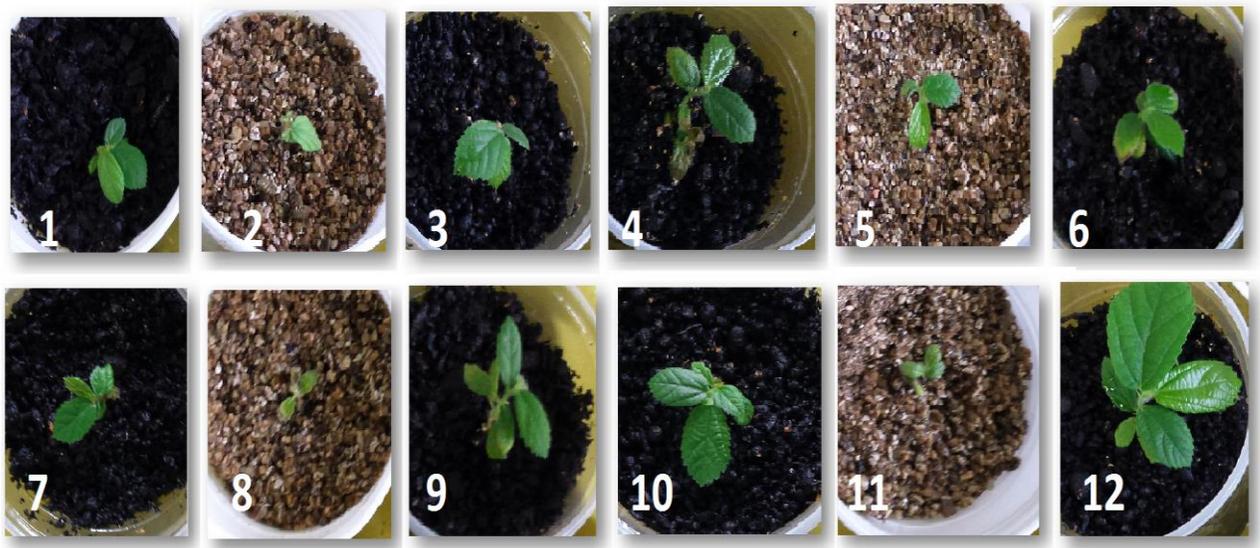
*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

Em relação à clorose foliar, os tratamentos 9 e 6 (10 ou 20g L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo e cultivo em substrato MecPlant®) apresentaram as maiores médias de folhas cloróticas (2,89 e 1,78 respectivamente), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. As maiores médias de altura de brotações foram avaliadas nos tratamentos com 10, 20 ou 30 g L⁻¹ e nos substratos MecPlant® e H-decker® (Tratamentos 4, 6, 7, 9, 10 e 12). Houve um incremento em altura do primeiro período para o segundo de 8,6% no tratamento 9, o que é considerado muito favorável, uma vez que o intervalo entre os

dois períodos é bem curto. Para a variável número de folhas, os tratamentos 9 e 12 (20 ou 30g L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo e cultivo em substrato MecPlant®) apresentaram as maiores médias, com 6,0 e 5,11 folhas por brotação, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 11). Considerando o conjunto das variáveis avaliadas, o tratamento 12 pode ser considerado o mais satisfatório.

Figura 14 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após cinco dias em sala de cultivo sob condições controladas, cultivadas em substrato, conforme o tratamento, com os copos plásticos descobertos, no segundo período de aclimatização e tendo sido previamente cultivadas em meio nutritivo WPM/2 na ausência ou presença de sacarose, conforme o tratamento: A) ausência: 1) H-decker®; 2) vermiculita; 3) MecPlant; B) 10g L⁻¹: 4) H-decker®; 5) vermiculita; 6) MecPlant®; C) 20g L⁻¹: 7) H-decker®; 8) vermiculita; 9) MecPlant®; D) 30g L⁻¹: 10) H-decker®; 11) vermiculita; e 12) MecPlant®. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.



Fonte: A autora (2016).

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

Houve efeito significativo dos tratamentos que combinaram diferentes concentrações de sacarose durante o cultivo *in vitro* e os substratos utilizados

posteriormente para a variável sobrevivência ($p=0,0045$; $IV=8,04$) e estabelecimento ($p=0,0222$; $IV=8,59$). Já para a variável clorose foliar ($p=0,1426$; $IV=15,36$), não houve efeito significativo dos tratamentos, apresentando média geral de 1,0 folha clorótica por brotação. Em relação à presença de raiz primária ($p=0,0159$; $IV=8,54$), houve efeito significativo dos tratamentos, assim como houve efeito significativo, também, para a variável raiz secundária ($p=0,0002$; $IV=8,25$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Médias de sobrevivência (%), estabelecimento (%), formação de raiz primária (%) e secundária (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo *in vitro* (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no terceiro período de aclimatização, após 30 dias em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.

Tratamento	Sacarose	Substrato	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Raiz 1 ^a (%)	Raiz 2 ^a (%)
1	0 g L ⁻¹	H-decker®	11,12 b*	11,12 b	11,12 b	11,12 b
2	0 g L ⁻¹	Vermiculita	33,34 b	33,34 b	33,34 b	22,23 b
3	0 g L ⁻¹	MecPlant®	22,23 b	22,23 b	22,23 b	22,23 b
4	10 g L ⁻¹	H-decker®	55,56 a	55,56 a	55,56 a	55,56 a
5	10 g L ⁻¹	Vermiculita	66,67 a	55,56 a	44,45 b	0,00 b
6	10 g L ⁻¹	MecPlant®	55,56 a	33,34 b	33,34 b	33,34 b
7	20 g L ⁻¹	H-decker®	66,67 a	55,56 a	66,67 a	55,56 a
8	20 g L ⁻¹	Vermiculita	33,34 b	33,34 b	33,34 b	11,12 b
9	20 g L ⁻¹	MecPlant®	88,89 a	88,89 a	88,89 a	77,78 a
10	30 g L ⁻¹	H-decker®	77,78 a	66,67 a	66,67 a	55,56 a
11	30 g L ⁻¹	Vermiculita	55,56 a	33,34 b	33,34 b	11,12 b
12	30 g L ⁻¹	MecPlant®	88,89 a	77,78 a	77,78 a	77,78 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

Após 30 dias na casa de vegetação, a sobrevivência foi satisfatória nos tratamentos com 10, 20 ou 30g L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo, e nos três substratos testados: vermiculita, MecPlant® e H-decker® (Tratamentos 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 e 12). Igualmente, o estabelecimento também foi adequado na maior parte dos tratamentos, com as concentrações de 10, 20 ou 30g L⁻¹ no meio nutritivo e com os substratos vermiculita, MecPlant® e H-decker® (Tratamentos 4, 5, 7, 9, 10 e 12).

Plantas de *Amburana acreana* (cerejeira) cultivadas *in vitro* em meio nutritivo WPM/2, que foram transferidas para câmaras plásticas e aclimatizadas em casa de vegetação por 30 dias em substrato vermiculita, obtiveram sobrevivência de apenas 54% (FERMINO JÚNIOR et al., 2012), ao contrário do presente trabalho. Já na aclimatização de *Vitex negundo*, a sobrevivência observada foi de 95% das plantas em casa de vegetação (AHMAD; ANIS, 2007).

Uma pequena redução no número de plantas sobreviventes no decorrer da aclimatização pode acontecer, devido à transferência da sala de crescimento para a casa de vegetação. Este fato se deve geralmente à mudança das condições ambientais que as plantas estavam submetidas na sala de cultivo, principalmente a temperatura, que é rigorosamente controlada. Na casa de vegetação, a alta temperatura associada à alta umidade relativa do ar no interior da bandeja, favorece a proliferação de fungos e bactérias podendo causar a morte de algumas plantas. A alta umidade relativa que se faz necessária para a sobrevivência das plantas e a alta temperatura, são extremamente favoráveis ao rápido desenvolvimento de todo tipo de micro-organismo. Aliada a essa condição, a fragilidade dos tecidos, pouco lignificados e desprovidos de camada cuticular, deixa a planta suscetível à invasão de micro-organismos saprofíticos e ao ataque de patógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para a formação de raiz primária e raiz secundária (Tabela 12), cinco tratamentos foram superiores (Figura 15): 4, 7, 9, 10 e 12. Os tratamentos que apresentaram as maiores porcentagens de enraizamento continham o substrato MecPlant® ou H-decker®, constatando que estes proporcionaram melhores resultados quando comparados à vermiculita, que de maneira isolada não se mostrou eficiente para a rizogênese de *Luehea divaricata*.

O enraizamento *ex vitro* de *Tectona grandis* (teca) após 30 dias, na ausência da auxina AIB, ocorreu tanto no substrato vermiculita (85%) quanto no Plantmax® (95%), demonstrando elevados percentuais de enraizamento e ausência de formação de calos na base das brotações. Igualmente, a aclimatização dessa mesma espécie, em ambos os substratos, foi máxima (FERMINO JÚNIOR et al., 2011).

Para as variáveis número de folhas ($p=0,0004$; $IV=17,83$), altura das brotações ($p=0,0004$; $IV=11,71$), comprimento de raiz ($p=0,0020$; $IV= 24,03$), massa fresca ($p=0,0011$; $IV=31,59$) e massa seca ($p=0,0074$; $IV=29,41$) houve efeito significativo dos tratamentos que combinaram diferentes concentrações de sacarose durante o cultivo *in vitro* e os substratos utilizados posteriormente (Tabela 13).

Os tratamentos 4, 7, 9, 10 e 12 apresentaram os melhores resultados para as variáveis número de folhas, altura das brotações e comprimento da raiz, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, e também relataram um incremento em altura do segundo período para o terceiro de 56,67%, 27,27%, 28,28%, 34,54% e 38,5% respectivamente, evidenciando novamente a superioridade destes tratamentos no presente estudo (Tabela 13; Figura 15). Em relação a massa fresca, os tratamentos com 10, 20 ou 30g L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo e que permaneceram em substratos MecPlant® ou H-decker® apresentaram resultados mais promissores (Tratamentos 4, 9, 10 e 12). Igualmente, para a variável massa seca, os tratamentos com 10, 20 ou 30g L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo e que permaneceram em substratos MecPlant® e H-decker® relataram médias satisfatórias (Tratamentos 4, 6, 7, 9, 10 e 12).

Tabela 13– Médias de número de folhas, altura (cm), comprimento de raiz (cm), massa fresca (mg) e massa seca (mg) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função da concentração de sacarose utilizada durante o cultivo *in vitro* (30 dias) em meio nutritivo WPM/2 e o substrato empregado posteriormente no terceiro período de aclimatização, após 30 dias em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.

Tratamento	Sacarose	Substrato	Nº folhas	Altura (cm)	Comp. Raiz (cm)	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)
1	0 g L ⁻¹	H-decker®	0,67 b*	0,13 b	1,27 b	13,11 b	2,89 b
2	0 g L ⁻¹	Vermiculita	1,78 b	0,42 b	0,96 b	22,78 b	3,33 b
3	0 g L ⁻¹	MecPlant®	1,45 b	0,44 b	2,11 b	50,56 b	8,11 b
4	10 g L ⁻¹	H-decker®	4,78 a	1,80 a	9,02 a	278,67 a	42,45 a
5	10 g L ⁻¹	Vermiculita	2,67 b	0,78 b	0,82 b	29,56 b	4,00 b
6	10 g L ⁻¹	MecPlant®	3,0 b	0,91 b	4,28 b	99,44 b	24,00 a
7	20 g L ⁻¹	H-decker®	3,89 a	1,21 a	6,81 a	150,44 b	29,22 a
8	20 g L ⁻¹	Vermiculita	1,45 b	0,44 b	1,65 b	36,67 b	3,78 b
9	20 g L ⁻¹	MecPlant®	6,89 a	1,81 a	10,56 a	264,23 a	38,67 a
10	30 g L ⁻¹	H-decker®	4,78 a	1,39 a	8,54 a	299,44 a	48,89 a
11	30 g L ⁻¹	Vermiculita	2,23 b	0,72 b	2,89 b	39,00 b	5,78 b
12	30 g L ⁻¹	MecPlant®	6,78 a	2,00 a	9,34 a	294,56 a	44,45 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: A autora (2016).

Figura 15 – Representação ilustrativa das brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) após 30 dias em casa de vegetação, no terceiro período de aclimatização, tendo sido previamente cultivadas *in vitro* em meio nutritivo WPM/2 contendo sacarose, em concentração conforme o tratamento, e posteriormente em substrato, conforme o tratamento: 4) 10g L⁻¹ - H-decker®; 7) 20g L⁻¹ - H-decker®; 9) 20g L⁻¹ - MecPlant®; 10) 30g L⁻¹ - H-decker®; e 12) 30g L⁻¹ - MecPlant®. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.



Fonte: A autora (2016).

Outros relatos bem-sucedidos relacionados à aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas são verificados com *Cydonia oblonga* (marmeleiro) (ERIG, et al., 2004), *Genipa americana* (jenipapeiro) (ROCHA et al., 2008), *Eucalyptus saligna* (eucalipto) (SILVA et al., 2011), *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) (RIBAS et al., 2005), entre outras espécies.

5.3 CONCLUSÕES

A concentração 20g L⁻¹ de sacarose é a mais eficiente para a formação *in vitro* de raízes primárias e de folhas em brotações de *Luehea divaricata*.

Para a fase de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de *Luehea divaricata* podem ser utilizados os substratos MecPlant® ou H-decker®, independentemente das concentrações de sacarose (10, 20 ou 30g L⁻¹) testadas durante o cultivo *in vitro*.

6 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho trouxe importantes contribuições para a micropropagação de *Luehea divaricata*, visto que as etapas de enraizamento *in vitro* e aclimatização de espécies florestais nativas são consideradas limitantes para estabelecer protocolos de cultivo *in vitro*. A utilização do meio nutritivo WPM reduzido à metade da sua concentração de sais (WPM/2) favorece a formação de raízes em brotações de *Luehea divaricata*. No entanto, o uso de reguladores de crescimento como Ácido Indolbutírico (AIB) e Ácido Naftalenoacético (ANA), são dispensáveis na rizogênese da espécie, fato que, aliado ao uso do meio WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2), permite reduzir os custos da produção de mudas.

O uso de substratos alternativos no cultivo *in vitro*, como a vermiculita, favorece o enraizamento da espécie, principalmente quando combinada com diferentes volumes do meio nutritivo WPM/2. As combinações de 20mL de meio nutritivo + 15cm³ de vermiculita, 20mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita e 30mL de meio nutritivo + 30cm³ de vermiculita foram as mais eficientes na rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*.

No que se refere à aclimatização, a presença de sacarose influencia apenas a etapa de enraizamento da espécie, na subsequente aclimatização, as diferentes concentrações de sacarose não interferiram. Em relação aos substratos utilizados na aclimatização, MecPlant® ou H-decker® se mostraram mais promissores. Esta etapa pode ser bem sucedida se realizada de forma gradual, como no presente trabalho, que compreende desde a fase de enraizamento das brotações, aclimatização em sala de cultivo, e posterior transplante para casa de vegetação.

Por fim, estudos adicionais devem ser realizados a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, como a aclimatização *in vitro* e *ex vitro* das brotações enraizadas em vermiculita combinada com meio nutritivo, o uso de outras fontes de açúcar no meio nutritivo, a aclimatização gradativa testando diferentes aberturas nos frascos, visando otimizar ainda mais as etapas de enraizamento *in vitro* e aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de *Luehea divaricata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N.; ANIS, M. Rapid clonal multiplication of a woody tree, *Vitex negundo* L. through axillary shoots proliferation. **Agroforestry Systematics**, v. 71, p.195-200. 2007.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa CNPH, 1998. v.1, p.261-296.
- BARRUETO CID, L.P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p.55 - 81.
- BOSA, N. CALVETE, E. O. NIENOW, A. A. SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsófila. **Hortic. Bras.**, v. 21, n. 2, 2003.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Acesso em: 26/04/2015.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN,P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990.
- CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Colombo, PR: EMBRAPAFLORESTAS, 1.039p, 2003.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.34, n.2, p.181-186, 1999.
- COSTA, A. S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n.1, p.68-72, 2007.
- CURTI, A. **Contribuições para a micropropagação de *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.
- CURTI, A. **Rizogênese *in vitro* e *ex vitro* em *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**. 136 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.
- CURTI, A. REINIGER, L. R. S. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Cienc. Rural**, 44, n.2, p.314-320, 2014.

- DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Cienc. Rural**, v.39, n.2, p.563-566, 2009.
- DECSETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 101 p. 2000.
- DIAS, P. C. et al. **Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil.** Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, v. 32, n. 72, p.453-462, 2012.
- DUTRA, C. M. **Lições aprendidas na conservação e recuperação da Mata Atlântica: Planos Municipais de Conservação e Recuperação da Mata Atlântica.** Brasília: MMA, 2013.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Cienc. Rural**, v.34, n.5, p.1443-1449, 2004.
- FACHINELLO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** 2.ed. Pelotas : UFPel, 179p., 1995.
- FANTINEL, V. S.; OLIVEIRA, L. M. de; MUNIZ, M. F.B.; ROCHA, E. C. da. Detecção de fungos e transmissão de *Alternaria alternata* via sementes de ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos. **Rev. de Cienc. Ambientais**, Canoas, v. 7, n. 2, 2013.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; RAPOSO, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. **Floresta**, v. 41, n. 1, p.79-86, 2011.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Cienc. Florestal**, v. 22, n. 1, p.1-9, 2012.
- FERNANDES, D. A. **Efeito de diferentes concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* e no enraizamento *ex vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.).** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Engenharia Florestal, Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, 66p., 2012.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Cienc. e Agrotec.**, (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.

- FETT-NETO, A.G.; TEIXEIRA, S.; SILVA, E.A.M.; SANTANNA, R. Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenes in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, v.140, p.720-728, 1992.
- FLÔRES, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). 2007. 73p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.
- FLÔRES, A.V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Cienc. Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, v.2, p.117-31, 1988.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 1 - the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 574 p., 1993.
- GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, organogênese, calogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). 2010. 158f. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. G. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 2, p. 533-568. 1999.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.
- JACKSON, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Special issue, p. 96-109, 2003.
- KÄMPF, A.N. Produção comercial de mudas ornamentais. Guaíba: **Agropecuária**, 2000. 254p.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, T.H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 484p, 1991

LANE, D. R.; BASSIRIRAD, H. Differential responses of tallgrass prairie species to nitrogen loading and varying ratios of NO_3^- to NH_4^+ . **Functional Plant Biology**, Victoria, v.29, p.1227- 1235, 2002.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1959-1966, 2009.

LELES P.S.S.; CARNEIRO J.G.A.; BARROSO D.G.; MORGADO I.F. Qualidade de mudas de *Eucalyptus spp.* produzidas em blocos prensados e tubetes. **Rev. Árvore**, V.24: P.13-20. 2000.

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

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

LOPES, S. C. et al. **Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia Macrophylla* King).** Cerne, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

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

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

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louropardo(*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Cienc. Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings, Portland: **Dioscorides Press**, 1988. v.2, p.289-302.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP E AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. Rev. Acad., **Cienc. Agrar. Ambient.**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008

NEGASH, A. et al. *In vitro* regeneration and micropropagation of enset from Southwestern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.62, p.153-8, 2000.

NICIOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] – Fabaceae**. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras. 89 p. Lavras – Minas Gerais. 2006.

NICOLOSO, F.T. et al. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Cienc. e Agrotec.**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

NOGUEIRA, R. C. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Cienc. e Agrotec.**, v. 28, n. 5, p. 1053- 1059, 2004.

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

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

PARK, S. Y. et al. Micropropagation of *Salix pseudolasiogyne* from nodal explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 93, p. 341-346, 2008.

PELEGRINI, L.L. **Micropropagação de *Ocotea porosa* (Ness ex Martius) Liberato Barroso (Imbuia)**. 2008, 106f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

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

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

RADMANN, E. B. , GONÇALVES, E. D. , FORTES, G. R. L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento “*in vitro*” de amoreira-preta (*Rubus* sp.), CV. ÉBANO. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 1, p. 124-126, Abril 2003.

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. **Rev. Árvore**, v. 29, n. 4, p. 517-524. 2005.

- ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Rev. Bras. de Frutic.**, Jaboticabal, SP, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.
- ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. MICROPROPAGAÇÃO DE *Cabralea canjerana*. **Rev. Árvore**, v..31, n.1, p.43-50, 2007.
- ROSA, F. C. **Superação de dormência de sementes e cultivo *in vitro* de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. 2009. 52f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.
- SALISBURY, F. B.; ROOS, C.W. **Plant Physiology**. California: Wadsworth,. 1991. cap.17, p.357-378.
- SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. C; DENARDI, F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto de macieira ‘Seleção 69’ tolerante à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*). **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.757-762, 2001.
- SANTANA, J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Cienc. Agrotec.**, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.
- SANTANA, J. R. F. **Controle da Morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae**. 237f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2003.
- SARTOR, F. R. **Desenvolvimento e avaliação de técnicas de micropropagação e criopreservação para o armazenamento da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2011.
- SARTORETTO, M.L. et al. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Cienc. Rural**, v.38, n.3, p.861-871, 2008.
- SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba, RS: **Agropecuária**, 2001. 463 p.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Produção de mudas pré-básicas de batatas por estaquia a partir de plantas micropropagadas. **Hortic. Bras.**, v.22, n.2: p.186-192, 2004.
- SCHUCH, M. DAMIANI, C. R. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, 2009.
- SILVA, A. T. da; M. Pasqual; J. S. Ishida& L. E. C. Antunes. 1995. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.30, n.1: p.48-53.

SOARES, G.C.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M.W. **Efeito do tempo de exposição do AIB no meio de cultura no enraizamento *in vitro* de mirtilo.** In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 8., 2006, Pelotas. Anais... 2006.

SOUZA, A.V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) MART.** 2003. 127p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2003.

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

SOUZA JÚNIOR, E. E.; BARBOSA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro. **Pesq. Agropec. Tropical**, v.31, n.2: p.147-151, 2001.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p.423-460.

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

TIBOLA, C. S.; RADMANN, E. B.; RODRIGUES, A. C.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C. Diferentes meios de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta enxertos de *Prunus* sp. **Rev. Bras. Agrocienc.**, v.10, n. 2, p.191-195, 2004.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Ed. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.261-296.

VIDAL, L. H. I.; SOUZA, J. R. P.; FONSECA, E. P.; BORDIN, I. Qualidade de mudas de guaco produzidas por estaquia em casca de arroz carbonizada com vermicomposto. **Hortic. bras.**, v. 24, n. 1, p.26-30, 2006.

YEOMAN, M. M; Early development in callus culture. **International Review of Cytology**, v.29, p.383-409, 1970.

WEAVER, R.J. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura.** Mexico, DF: Trillas, 1976. 622p.

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