

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

*In vitro* rhizogenesis on shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

Karol Buuron da Silva<sup>I</sup>, Lia Rejane Silveira Reiniger<sup>II</sup>, Silvia Machado dos Santos Rabaiolli<sup>III</sup>, Charlene Moro Stefanel<sup>IV</sup>, Leandro Dutra da Silva<sup>V</sup>

### Resumo

*Luehea divaricata*, conhecida popularmente como açoita-cavalo, é uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica muito utilizada para a recuperação de áreas degradadas. Sua madeira pode ser empregada para as mais diversas finalidades, o que contribuiu para a redução de suas populações naturais e ocasionou dificuldades na obtenção de sementes com qualidade genética, fisiológica e sanitária para uso na produção de mudas. Sendo assim, a micropropagação é uma alternativa para a produção de mudas da espécie para uso em projetos ambientais. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo de rizogênese *in vitro* e, para isso, foram avaliadas, inicialmente, diferentes concentrações de sais do meio nutritivo WPM. Em seguida, foram estudados os efeitos do ácido indolbutírico (AIB), adicionado ao meio em tratamento “pulse” por 15 dias, e do ácido naftalenoacético (ANA), na rizogênese, em ambos os casos em cultivo em meio WPM cuja concentração de sais foi reduzida à metade (WPM/2). Por fim, também foi analisado o efeito da combinação de volumes de vermiculita com WPM/2. Os resultados indicaram que o meio WPM/2 apresentou resultados promissores para o estabelecimento (98%) *in vitro* e, no que diz respeito à formação de raízes adventícias primárias, após 45 dias de cultivo *in vitro* observaram-se as maiores médias (40,52%), independentemente da concentração de sais do meio. O tratamento “pulse” após 30 dias de cultivo *in vitro*, independentemente da concentração de AIB, resultou em uma média de 25,18% de formação de raízes adventícias primárias. As combinações de 20 mL + 15 cm<sup>3</sup>, 20 mL + 30 cm<sup>3</sup> e 30 mL + 30 cm<sup>3</sup> de meio nutritivo e de vermiculita, respectivamente, foram as mais favoráveis para a formação de raízes adventícias laterais de segunda ordem, proporcionando médias entre 38 e 49,5% após 45 dias de cultivo *in vitro*. Para otimizar o processo de rizogênese de *Luehea divaricata* é indicado o cultivo *in vitro* por 45 dias em meio nutritivo WPM/2, combinado com vermiculita, prescindindo da adição de auxinas.

**Palavras-chave:** Micropropagação; Período de cultivo *in vitro*; Meio nutritivo WPM; Auxina

### Abstract

*Luehea divaricata* is a native forest species of the Atlantic Rainforest biome widely used for the recovery of degraded areas. Its wood can be used for the most diverse purposes, which has contributed to a reduction in its natural populations and is causing difficulties to find seeds with genetic, physiological and sanitary quality for using in the seedling production. Therefore, micropropagation is an alternative with the potential for producing seedlings to use in environmental projects. The objective of this work was to optimize the *in vitro* rhizogenesis processes, in which different concentrations of salts of the WPM nutritive medium were initially evaluated. Next, Indolbutyric Acid (IBA) was added to the medium as the “pulse” treatment for 15 days, and Naphthaleneacetic Acid (NAA) in both cases to the *in vitro* culture in WPM nutritive medium was reduced to half of its initial concentration (WPM/2) and the rhizogenesis effects were analyzed. Finally, the effect of combining vermiculite volumes with WPM/2 was also analyzed. The results showed that the WPM/2 medium produced the most promising results of the *in vitro* establishment (98%), and the highest average (40.52%) regarding the formation of primary adventitious roots after 45 days of *in vitro* culture was observed regardless the concentration of salts in the medium. The “pulse” treatment

<sup>I</sup> Engenheira Florestal, MSc, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. karolbuuron@hotmail.com (ORCID: 0000-0003-2174-2663)

<sup>II</sup> Engenheira Agrônoma, Dr<sup>a</sup>, Professora do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. liarsr@ufsm.br (ORCID: 0000-0002-3243-671X)

<sup>III</sup> Engenheira Florestal, MSc, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. silviaufsm@gmail.com (ORCID: 0000-0003-1331-8803)

<sup>IV</sup> Engenheira Florestal, MSc, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. chastefanel@gmail.com (ORCID: 0000-0002-3173-8150)

<sup>V</sup> Discente do curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. leandrodutra@gmail.com (ORCID: 0000-0002-6149-2737)



after 30 days of *in vitro* culture, regardless of IBA concentration, resulted in an average of only 25.18% of primary adventitious root formation. The combinations of 20 mL + 15 cm<sup>3</sup>, 20 mL + 30 cm<sup>3</sup> and 30 mL + 30 cm<sup>3</sup> of nutritive medium and vermiculite, respectively, were the most favorable for forming second order lateral adventitious roots, providing averages between 38 and 49.5% after 45 days of *in vitro* culture. Therefore, in order to optimize the rhizogenesis process of *Luehea divaricata*, it is indicated to grow the *in vitro* culture for 45 days in WPM/2 nutritive medium combined with vermiculite without the addition of auxins.

**Keywords:** Micropropagation; *In vitro* culture period; WPM nutritive medium; Auxin

## Introdução

A cobertura de áreas protegidas na Mata Atlântica avançou expressivamente ao longo dos últimos anos, principalmente devido à forte contribuição dos governos federais e estaduais, e da iniciativa privada em sua ampliação e consolidação. Além desse investimento, as estratégias para a conservação da biodiversidade visam contemplar a promoção da recuperação de áreas degradadas e do uso sustentável da vegetação nativa (DUTRA, 2013).

Uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica muito utilizada para a recuperação de áreas é *Luehea divaricata*, conhecida popularmente como açoita-cavalo. Sua madeira tem sido empregada para as mais diversas finalidades, fato que contribuiu para o extrativismo predatório e a redução de suas populações naturais, acarretando em dificuldades na obtenção de sementes, o que torna a micropropagação uma alternativa com potencialidade para a produção de mudas (LEÓN, 2010; FLÔRES et al., 2011).

A micropropagação possibilita a produção de mudas a partir de qualquer tecido da planta doadora, aumentando em grande escala a produtividade, ocupando menor espaço, além de manter a produção isenta de riscos ambientais e climáticos (FLÔRES, 2007; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). Entretanto, muitas espécies lenhosas, mesmo na presença de auxinas, não desenvolvem o sistema radicular, sendo necessário que os brotos propagados *in vitro* sejam induzidos à rizogênese em um meio de cultura adequado (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Estudos prévios indicaram que esse é o caso de *Luehea divaricata* (FLÔRES, 2007; FLÔRES et al., 2011; LEÓN, 2014). Além disso, há espécies que dispensam o uso de reguladores de crescimento para o enraizamento (SOARES; DAMIANI; SCHUCH, 2006; PASA et al., 2012). Assim, o presente estudo teve como objetivo otimizar a rizogênese *in vitro* em *Luehea divaricata*, visando contribuir para o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação.

## Material e método

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.

Os experimentos, que serão detalhados a seguir, foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, e cada repetição foi composta por um frasco com capacidade de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes do tipo segmentos nodais com aproximadamente 10 mm, coletados de plantas de origem seminal cultivadas em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e sem reguladores de crescimento, após 60 dias da germinação *in vitro*. A desinfestação superficial das sementes para a germinação *in vitro* foi realizada com a imersão das sementes em água quente (60±5°C) durante 10 min; na sequência, ocorreu a imersão em etanol 70% durante 1 min, seguida de um enxague com água estéril; depois imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% durante 10 min, seguida de triplo enxague com água estéril; e por fim imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 2% durante 10 min, seguida de triplo enxague com água estéril (FLÔRES, 2007; LEÓN, 2010). O pH do meio nutritivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 min a 121°C e 1 atm de pressão. Após a inoculação dos explantes, 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.

Foram avaliados o estabelecimento *in vitro* (explantes que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento) e explantes com formação de raízes adventícias primárias (originadas da base do explante) e com formação de raízes adventícias laterais de segunda ordem (originadas a partir das raízes adventícias primárias), todas expressas em porcentagem. Na última avaliação, avaliaram-se, ainda, o comprimento da raiz adventícia primária (cm) e a altura das plantas (cm), medida desde a base até a ponta do ápice caulinar. No experimento do efeito de diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) também foi avaliada a porcentagem de formação de calos na base dos explantes.

### **Efeito de diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM**

Foi empregado arranjo fatorial  $4\times 3$ , sendo testado o efeito de diferentes concentrações dos sais (25%; 50%; 75% ou 100%) do meio nutritivo WPM 'Woody Plant Medium' (LLOYD; MCCOWN, 1980) e três períodos de cultivo (15, 30 ou 45 dias), totalizando 12 tratamentos com 10 repetições. O meio nutritivo foi acrescido de  $30\ \text{g L}^{-1}$  de sacarose,  $7\ \text{g L}^{-1}$  de ágar,  $100\ \text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol quando foi testada a concentração 100% dos sais do meio nutritivo WPM,  $75\ \text{mg L}^{-1}$  a 75% dos sais do meio nutritivo WPM,  $50\ \text{mg L}^{-1}$  a 50% dos sais do meio nutritivo WPM e  $25\ \text{mg L}^{-1}$  a 25% dos sais do meio nutritivo WPM.

### **Efeito de tratamento "pulse" com Ácido Indolbutírico (AIB)**

Empregou-se arranjo fatorial  $5\times 2$ , em que os tratamentos consistiram da combinação de diferentes concentrações de AIB (0; 5; 10; 15 ou  $20\ \mu\text{M}$ ) adicionadas ao meio nutritivo com os dois períodos de cultivo (15 ou 30 dias), totalizando 10 tratamentos com 10 repetições. O meio nutritivo utilizado foi o WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2), acrescido de  $30\ \text{g L}^{-1}$  de sacarose,  $7\ \text{g L}^{-1}$  de ágar e  $50\ \text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol. Os explantes foram cultivados na presença da auxina por um período inicial de 15 dias e após, as culturas foram transferidas para meio nutritivo fresco de idêntica composição à anterior, porém, na ausência de AIB.

### **Efeito de diferentes concentrações de Ácido Naftalenoacético (ANA)**

Empregou-se arranjo fatorial  $5\times 3$ , em que o fator A correspondeu às diferentes concentrações de ANA (0; 5; 10; 15 ou  $20\ \mu\text{M}$ ), e o fator B, aos períodos de cultivo (15, 30 ou 45 dias), totalizando 15 tratamentos e sete repetições. O meio nutritivo utilizado foi o WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2) e acrescido de  $30\ \text{g L}^{-1}$  de sacarose,  $7\ \text{g L}^{-1}$  de ágar e  $50\ \text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol.

### **Efeito de diferentes meios de cultivo**

Utilizou-se arranjo fatorial  $6\times 3$ , sendo o fator A constituído pela composição do meio de cultivo, que consistiu na combinação de vermiculita de granulometria fina ( $15$  ou  $30\ \text{cm}^3$ ) com diferentes volumes (10; 20; ou 30 mL) de meio nutritivo WPM/2 (Tabela 1), e o fator B, pelos diferentes períodos de cultivo (15, 30 ou 45 dias), totalizando 18 tratamentos com seis repetições. O meio nutritivo WPM reduzido à metade da concentração de sais (WPM/2) foi acrescido de  $30\ \text{g L}^{-1}$  de sacarose,  $7\ \text{g L}^{-1}$  de ágar e  $50\ \text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol.

**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 explantes do tipo segmentos nodais de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo).**

Table 1 – Composition of the different culture medium (combinations of vermiculite volumes and WPM/2 nutritive medium) evaluated in the *in vitro* rhizogenesis experiment of nodal segment explants of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.

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

Fonte: Autores (2019)

## 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 médias foram transformadas, sempre que necessário, pela função  $\sqrt{x+0,5}$ , sendo x o valor observado. A seguir, foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey para tratamentos qualitativos e análise de regressão polinomial para os tratamentos quantitativos, a 5% de probabilidade de erro. 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). Empregou-se o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (FERREIRA, 2014).

## Resultados e discussão

### Efeito de diferentes concentrações dos sais do meio nutritivo WPM

Houve efeito significativo das concentrações do WPM sobre o estabelecimento ( $p=0,0000$ ;  $IV=2,92$ ), mas não do período de cultivo ( $p=0,8645$ ), e, tampouco, da interação entre os dois fatores ( $p=0,7803$ ). Uma equação de segundo grau foi ajustada (Figura 1).

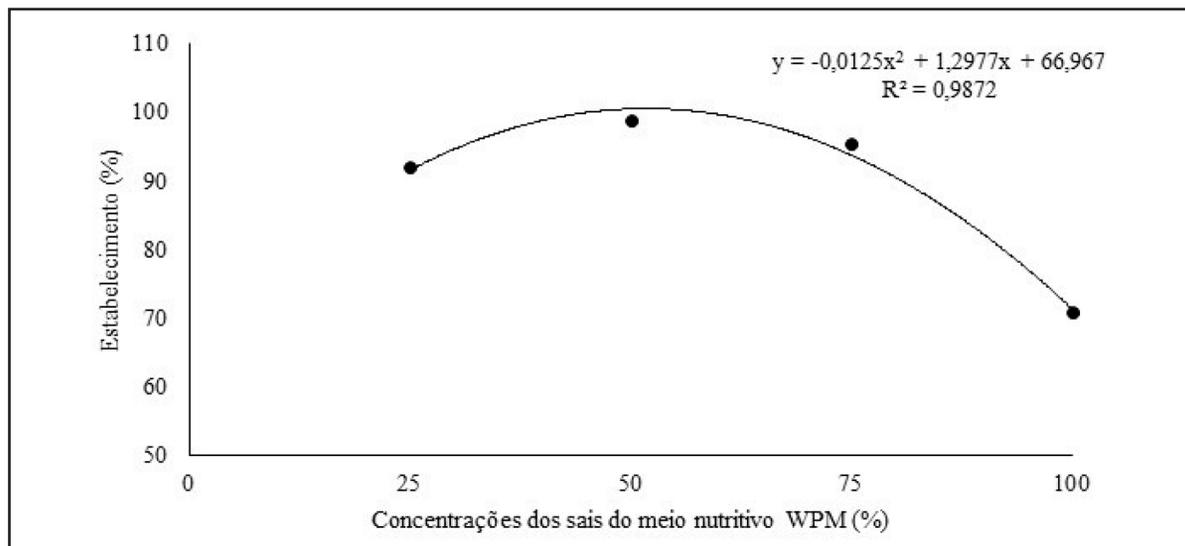
O estabelecimento foi maior a 50% e a 75% (médias de 98% e 95%, respectivamente), sendo a Máxima Eficiência Técnica (MET) estimada na concentração 51,90% (Figura 1). Estes valores satisfatórios nas concentrações reduzidas de sais do meio WPM podem ser atribuídos às menores concentrações totais de íons do meio nutritivo, que apresenta 1/4 das concentrações de íons de nitrato, amônia e potássio em comparação ao meio 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 planta (LANE; BASSIRIRAD, 2002).

Frente a isso, as concentrações reduzidas dos sais do WPM provavelmente provocaram um balanceamento adequado na absorção de N pelas plantas, garantindo altas taxas de estabelecimento *in vitro* das brotações de *Luehea divaricata* nas condições testadas. Esse fato pode ser sustentado por observações de que a pressão osmótica muito alta limita a absorção de água pelos tecidos, ao passo que a diluição dos sais do meio nutritivo aumenta a disponibilidade de água e reduz a oxigenação (TAIZ;

ZEIGER, 2002), fato que pode ter favorecido o desenvolvimento das plantas nas diluições de WPM.

**Figura 1 – Estabelecimento (%) médio de 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).**

Figure 1 – Establishment (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) depending on the different concentrations of WPM nutritive medium (25%, 50%, 75% or 100%), regardless the *in vitro* culture period (15, 30 or 45 days).



Fonte: Autores (2019)

Sobre as raízes adventícias primárias (IV=4,91) e raízes adventícias laterais de segunda ordem (IV=4,14) não houve efeito significativo das concentrações de sais do WPM ( $p=0,5184$ ;  $p=0,4728$ ) nem da interação entre os dois fatores principais ( $p=0,8693$ ;  $p=0,9380$ ), sendo verificado efeito significativo apenas do período de cultivo ( $p=0,0000$ ;  $p=0,0000$ ) (Tabela 2). Os resultados expostos na Tabela 2 evidenciam a necessidade de estender o cultivo *in vitro* por, pelo menos, 45 dias, tendo em vista a maior média de formação de raízes adventícias primárias (40,52%) e raízes adventícias laterais de segunda ordem (19%).

No que diz respeito ao comprimento das raízes adventícias primárias ( $p=0,5529$ ; IV=15,27), avaliado apenas aos 45 dias de cultivo, não houve efeito significativo das concentrações de sais do WPM, observando-se média geral de 1,87 cm. Este valor pode ser considerado muito bom, visto que em microestacas de *Cabralea canjerana* (canjerana), cultivadas em meio nutritivo MS/2 na ausência de reguladores de crescimento, o comprimento médio de raízes foi de 0,76 cm após 60 dias de cultivo *in vitro* (ROCHA et al., 2007), bem inferior ao observado no presente trabalho.

Sobre a altura das brotações ( $p=0,0041$ ; IV=3,25), também avaliada apenas aos 45 dias, houve efeito significativo das concentrações de sais. Os tratamentos com 50% e 75% das concentrações foram aqueles com maiores médias (2,31 cm e 1,83 cm, respectivamente), as quais não diferiram significativamente entre si. Estas médias de altura são muito satisfatórias, uma vez que para segmentos nodais de *Malus domestica* (macieira) ‘seleção 69’, cultivados por 40 dias em meio MS e ainda suplementados com 6-Benzilaminopurina - BAP (a 2,2  $\mu\text{M}$ ), a altura média das brotações foi de 1,3 cm (SANTA-CATARINA et al., 2001), inferior aos valores obtidos no presente trabalho.

**Tabela 2 – Médias de formação de raízes adventícias primárias (%) e raízes adventícias laterais de segunda ordem (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de cultivo *in vitro* (15, 30 ou 45 dias), independentemente da concentração de sais do meio nutritivo WPM (25%, 50%, 75% ou 100%).**

Table 2 – Average of primary adventitious roots (%) and second order lateral adventitious roots (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) depending on the *in vitro* culture period (15, 30 or 45 days), regardless the concentration of WPM nutritive medium (25%, 50%, 75%, or 100%).

Período (dias)	Raízes adventícias primárias (%)	Raízes adventícias laterais de segunda ordem (%)
15	2,47 c*	0,00 b
30	23,95 b	4,95 b
45	40,52 a	19,00 a
<b>Média</b>	22,31	7,98
<b>IV**</b>	4,91	4,14

Fonte: Autores (2019)

(\*) Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. (\*\*) IV = Índice de variação, calculado por, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

De modo geral, o uso de meios nutritivos menos concentrados tem permitido melhores resultados na rizogênese *in vitro* de brotações. Diluições à metade e até 1/4 de sais têm possibilitado resultados mais promissores para muitas espécies de plantas, tendo em vista que, em alguns casos, uma alta concentração pode inibir a rizogênese *in vitro* (SOUZA; PEREIRA, 2007). 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.

### Efeito de tratamento “pulse” com Ácido Indolbutírico (AIB)

Sobre o 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 os dois fatores ( $p=0,9957$ ), observando-se uma média geral de estabelecimento de 54,54%. Esta média é insatisfatória, uma vez que no experimento anterior, em que se testaram diferentes concentrações de sais do WPM, na ausência de reguladores de crescimento, a média foi de 98% em WPM/2 aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Sobre as raízes adventícias primárias (IV=5,37) e as raízes adventícias laterais de segunda ordem (IV=3,10) houve efeito significativo apenas do período de cultivo ( $p=0,0000$ ;  $p=0,0458$ , respectivamente), porém, não das concentrações de AIB ( $p=0,8473$ ;  $p=0,0770$ , respectivamente) ou da interação entre os dois fatores ( $p=0,8473$ ;  $p=0,0770$ , respectivamente) (Tabela 3).

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, a formação de raízes adventícias primárias foi de 25,18%, valor que ainda não pode ser considerado satisfatório para a rizogênese *in vitro* de espécies lenhosas. A formação de raízes adventícias laterais de segunda ordem nas brotações, conseqüentemente, também foi baixa aos 30 dias (5,3%), ao contrário do que se esperava com o uso do AIB (Tabela 3). No experimento anterior, testando-se as diferentes concentrações de sais do WPM, a formação de raízes adventícias primárias aos 30 dias, independentemente da concentração de sais, foi de 23,95% (Tabela 2), na ausência de auxina, evidenciando que o tratamento “pulse” não influenciou

expressivamente a formação de raízes adventícias em *Luehea divaricata* no presente estudo.

**Tabela 3 – Médias de formação de raízes adventícias primárias (%) e raízes adventícias laterais de segunda ordem (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de cultivo *in vitro* (15 ou 30 dias), independentemente do emprego de ácido indolbutírico – AIB (0, 5, 10, 15 ou 20  $\mu$ M) em tratamento “pulse” por 15 dias, no meio nutritivo WPM/2.**

Table 3 – Average of primary adventitious roots (%) and second order lateral adventitious roots (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) depending on the *in vitro* culture period (15 or 30 days), regardless the use of indolbutyric acid - IBA (0, 5, 10, 15 or 20  $\mu$ M) in “pulse” treatment for 15 days in WPM/2 nutritive medium.

Período (dias)	Raízes adventícias primárias (%)	Raízes adventícias laterais de segunda ordem (%)
15	0,00 b	0,00 b
30	25,18 a	5,3 a
Média	12,59	2,65
IV**	5,37	3,10

Fonte: Autores (2019)

(\*) Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. (\*\*) IV = Índice de variação, calculado por, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

Cabe salientar que outros fatores externos, de natureza física (condições da sala de crescimento) e química (substâncias de reserva como carboidratos e nutrição mineral), não avaliados no presente trabalho, também podem influenciar a rizogênese *in vitro*, estimulando-a ou inibindo-a. Além disso, o genótipo da planta-matriz, entre outros aspectos podem, igualmente, interferir no desenvolvimento *in vitro* de plantas (TORRES et al., 1998). Em geral, a composição do meio nutritivo, o tipo e concentrações de auxinas são as variáveis que mais influenciam a rizogênese, sendo as respostas dependentes do genótipo, pois se observa grande variação entre espécies, cultivares e clones, com relação à maior ou menor habilidade natural em formar raízes (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Em relação à altura das brotações ( $p=0,2214$ ;  $IV=1,66$ ), que foi avaliada somente aos 30 dias, não houve efeito significativo das diferentes concentrações de AIB, sendo obtida uma média geral de 0,96 cm. Para o comprimento da raiz adventícia primária ( $p=0,0078$ ;  $IV=7,78$ ), igualmente avaliado aos 30 dias, houve efeito significativo das concentrações da auxina, sendo que a maior média (1,62 cm) foi observada a 10 $\mu$ M de AIB, a qual diferiu estatisticamente das demais. A concentração de 15 $\mu$ M de AIB resultou na menor média de comprimento (0,27 cm), que, por sua vez, não diferiu significativamente da ausência, de 5 $\mu$ M ou de 20 $\mu$ M da auxina.

De acordo com os resultados obtidos, a auxina não influenciou o desenvolvimento e a formação de raízes adventícias em *Luehea divaricata*, sendo que apenas o comprimento da raiz foi afetado positivamente pela adição de 10 $\mu$ M de AIB. De maneira similar, a formação *in vitro* de raízes adventícias em *Amburana acreana* (cerejeira) ocorreu independentemente da presença ou ausência de AIB, entretanto, os maiores comprimentos de raiz adventícia primária ocorreram em baixas concentrações do regulador de crescimento (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

Há relatos de que, em um grande número de espécies, concentrações iguais de AIB e ANA promovem maiores porcentagens de rizogênese que o emprego dessas auxinas separadamente

(TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). A concentração desses reguladores de crescimento pode afetar a qualidade das raízes adventícias, 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). Esse fato foi verificado na formação *in vitro* de raízes adventícias de *Swietenia macrophylla* (mogno), em que 0,1 mg L<sup>-1</sup> (equivalente a 0,49 μM) de AIB foi mais eficiente que 1,3 ou 5 mg L<sup>-1</sup> (equivalentes a 6,39 ou 24,61 μM) (LOPES et al., 2001).

De maneira semelhante ao presente trabalho, em *Tectona grandis* (teca), não houve diferença significativa entre as concentrações testadas de AIB (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> (equivalentes a 0,0; 2,46; 4,92; 7,38 e 9,84 μM, respectivamente), provavelmente pelo fato das culturas possuírem níveis endógenos de auxina suficientes para iniciar a rizogênese (FERNANDES, 2012).

### Efeito de diferentes concentrações de Ácido Naftalenoacético (ANA)

Houve efeito significativo apenas do período de cultivo sobre o estabelecimento (p=0,0025; IV=6,35) e formação da raiz adventícia primária (p=0,0001; IV=4,85), e não das concentrações de ANA (p=0,0643; p=0,3937) ou da interação (p=0,7075; p=0,9532) (Tabela 4).

**Tabela 4 – Médias de estabelecimento (%) e formação de raízes adventícias primárias (%) em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) em função do período de cultivo (15, 30 ou 45), independentemente do emprego de ácido naftalenoacético - ANA (0, 5, 10, 15 ou 20 μM), no meio nutritivo WPM/2.**

Table 4 – Average of establishment (%) and primary adventitious roots (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. depending on the *in vitro* culture period (15, 30 or 45), regardless the use of naphthaleneacetic acid - NAA (0, 5, 10, 15 or 20 μM), in the WPM/2 nutritive medium.

Período (dias)	Estabelecimento (%)	Raízes adventícias primárias (%)
15	70,17 a*	0,00 b
30	57,80 ab	2,82 b
45	41,65 b	17,00 a
Média	56,54	6,61
IV**	6,35	4,85

Fonte: Autores (2019)

(\*) Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. (\*\*) IV = Índice de variação, calculado por, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

O estabelecimento reduziu-se dos 15 para os 45 dias de cultivo (Tabela 4), fato que pode ser atribuído aos efeitos indesejáveis provocados pela auxina ANA na planta, por ser um regulador de crescimento mais tóxico aos tecidos vegetais (WEAVER, 1976) comparativamente a outros. A formação de raízes adventícias primárias (Tabela 4) atingiu sua média máxima, de apenas 17,0%, aos 45 dias de cultivo, possivelmente devido à presença de elevada formação de calos nos explantes em todos os tratamentos, indicando que a auxina não teve efeito na rizogênese *in vitro* de *Luehea divaricata*.

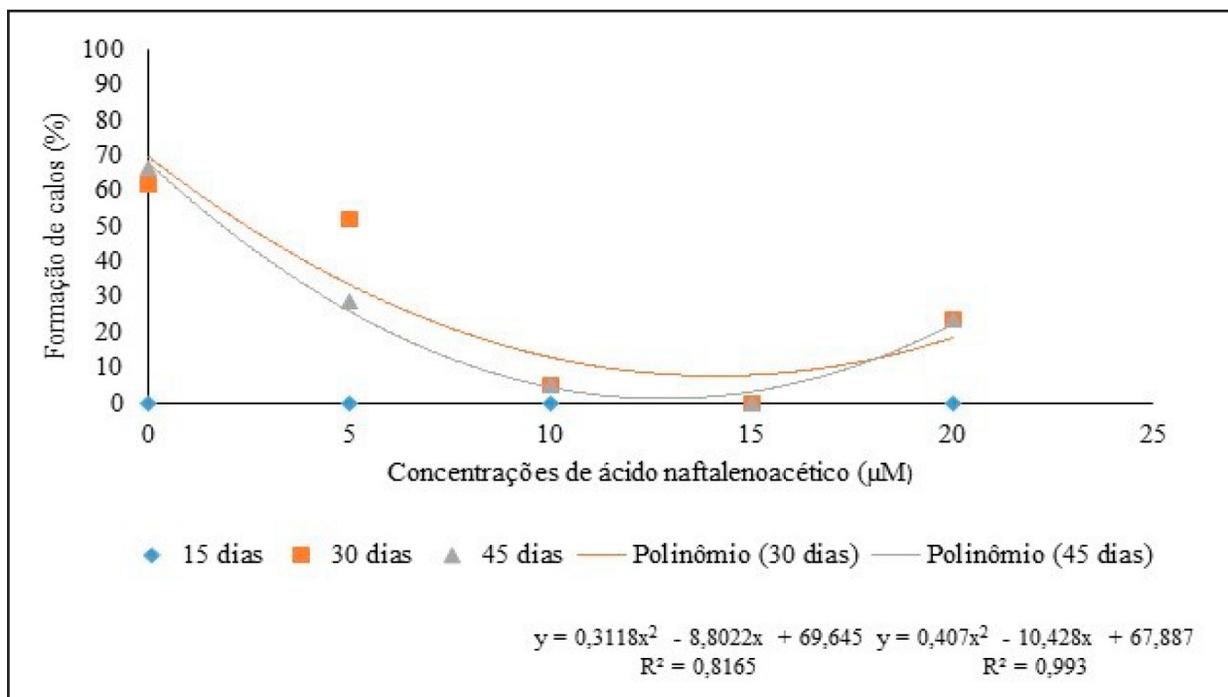
Já sobre as raízes adventícias laterais de segunda ordem (IV=2,27) não houve efeito significativo de nenhum dos fatores principais (concentrações de ANA: p=0,1828; período de cultivo: p=0,0548) nem da interação entre eles (p=0,1378). A média geral foi de apenas 1,25%, fato que, igualmente, pode ser

atribuído à alta formação de calos na base das culturas.

Sobre a formação de calos (IV=5,96) houve efeito significativo das concentrações de ANA ( $p=0,0000$ ), do período de cultivo ( $p=0,0000$ ), e, também, da interação ( $p=0,0025$ ). A formação de calos somente foi observada a partir dos 30 dias de cultivo, quando, mesmo na ausência da auxina, houve elevada calogênese, contudo, decrescente com a adição de ANA ao meio, a 10 e a 15  $\mu\text{M}$  (Figura 2), provavelmente em decorrência do balanço hormonal que se estabeleceu no decorrer do cultivo pela suplementação de auxina. Na Figura 2 pode-se observar o ajuste de uma equação de segundo grau para o período de 30 e de 45 dias de cultivo, com a MET sendo estimada a 14,11 $\mu\text{M}$  e 12,81 $\mu\text{M}$ , respectivamente.

**Figura 2 – 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  $\mu\text{M}$ ), no meio nutritivo WPM/2.**

Figure 2 – Average of callus formation (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) depending on the interaction of *in vitro* culture period (15, 30 or 45 days) and the different concentrations of naphthaleneacetic acid - NAA (0, 5, 10, 15 or 20  $\mu\text{M}$ ), in the WPM/2 nutritive medium.



Fonte: Autores (2019)

Em relação ao comprimento das raízes adventícias primárias ( $p=0,3280$ ; IV=14,67), avaliado aos 45 dias, não houve efeito significativo das concentrações de ANA, observando-se uma média geral baixa (0,35 cm), o que indica que a auxina não influencia positivamente essa variável. Isso pode ser reforçado pelo resultado do experimento anteriormente descrito, que avaliou diferentes concentrações de sais do WPM, na ausência de reguladores de crescimento, e cuja média de comprimento de raiz adventícia primária foi superior (1,87 cm).

Sobre a altura ( $p=0,7316$ ; IV=8,76), igualmente avaliada somente aos 45 dias, também não houve efeito significativo da auxina, sendo observada uma média geral de 0,81 cm. Este valor também é baixo, haja vista que, no experimento anterior, que testou as concentrações

de saís do WPM, foi atingida a média de 2,31 cm, o que evidenciou que a auxina testada, no presente experimento, também não promoveu incrementos no desenvolvimento da parte aérea.

O desenvolvimento observado das brotações após 45 dias de cultivo *in vitro* foi bem inferior ao esperado, o que pode ser atribuído ao efeito da adição da auxina, que pode inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente a formação de calos (TORRES; CALDAS; BUSO, 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 a rizogênese (HARTMANN et al., 2010), fato que ocorreu no presente experimento.

Em microestacas de *Cydonia oblonga* (marmeleiro), aos 35 dias de cultivo *in vitro* na presença de ANA (a 5 $\mu$ M), a rizogênese foi de 39,52%, e houve baixa formação de calos (0,84%), com comprimento médio das raízes de 2,83 cm (ERIG; SCHUCH, 2004). Grattapaglia e Machado (1998) afirmaram 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). Assim, de maneira geral, 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).

## Efeito de diferentes meios de cultivo

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 5), e não da interação ( $p=0,6403$ ). Os meios de cultivo compostos por 30 cm<sup>3</sup> + 30 mL, 30 cm<sup>3</sup> + 20 mL, 15 cm<sup>3</sup> + 20 mL e 15 cm<sup>3</sup> + 10 mL de vermiculita e meio nutritivo WPM/2, respectivamente, não diferiram significativamente entre si em relação ao estabelecimento, e apresentaram as maiores médias (100%, 90,67%, 81,44% e 73,72%, respectivamente). Na Tabela 5 é possível observar que, aos 30 e 45 dias, o estabelecimento foi superior a 80%.

Já sobre a formação de raízes adventícias primárias (IV=6,65) houve efeito significativo apenas do período de cultivo ( $p=0,0000$ ), porém, não do meio de cultivo ( $p=0,1884$ ) e, tampouco, da interação ( $p=0,2720$ ). A maior rizogênese foi observada aos 45 dias de cultivo *in vitro*, com 39,61% de brotações enraizadas (Tabela 5).

A rizogênese verificada aos 45 dias (39,61%), independentemente da combinação de vermiculita com meio nutritivo, foi semelhante à média obtida quando foram testadas as diferentes concentrações de saís do WPM, no primeiro experimento, relatado anteriormente. Neste caso, a formação de raízes adventícias primárias aos 45 dias, independente da concentração de saís do meio, foi de 40,52% (Tabela 2), valores considerados elevados frente às dificuldades frequentemente observadas na rizogênese *in vitro* de espécies lenhosas. É importante ressaltar que os explantes utilizados nestes ensaios foram coletados de plantas de origem seminal com 60 dias de cultivo

*in vitro*, e isso garantiu a juvenilidade dos tecidos, fato que pode ter uma influência positiva na formação das raízes adventícias. Para a maioria das espécies lenhosas, a aptidão para a rizogênese dos propágulos está associada ao grau de maturação, sendo observado que na fase juvenil as plantas apresentam maior potencial de enraizamento que na adulta (FERREIRA et al., 2010; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Propágulos jovens são mais responsivos à formação de raízes adventícias, pois a auxina é formada, naturalmente, nas partes da planta com crescimento ativo. Sendo assim, essas auxinas ficam concentradas na base dos explantes e, deste modo, juntamente com outras substâncias nutritivas, são responsáveis pelo enraizamento, não necessitando de auxina exógena para a formação do sistema radicular (HARTMANN et al., 2010; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013; FAGANELLO et al., 2015), o que pode ter contribuído para a formação das raízes em *Luehea divaricata*.

**Tabela 5 – Médias de estabelecimento (%) e formação de raízes adventícias primárias (%) 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.**

Table 5 – Average of establishment (%) and formation of primary adventitious roots (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) depending on the *in vitro* culture period (15, 30 or 45 days), regardless of the culture medium.

Período (dias)	Estabelecimento (%)	Raízes adventícias primárias (%)
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

Fonte: Autores (2019)

(\*) Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. (\*\*) IV = Índice de variação, calculado por, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N).

Sobre as raízes adventícias laterais de segunda ordem (IV=5,37) houve efeito significativo do período de cultivo ( $p=0,0000$ ) e da interação entre o período e o meio de cultivo ( $p=0,0220$ ), mas não do meio de cultivo ( $p=0,0570$ ). A formação de raiz adventícia lateral de segunda ordem ocorreu apenas após 45 dias, e os meios de cultivo constituídos por  $30\text{ cm}^3 + 30\text{ mL}$ ,  $30\text{ cm}^3 + 20\text{ mL}$  e  $15\text{ cm}^3 + 20\text{ mL}$  de vermiculita e meio WPM/2 mostraram-se novamente superiores, assim como foi verificado em relação ao estabelecimento, com médias de 38,83%, 49,50% e 38,83%, respectivamente (Tabela 6).

Em relação ao comprimento das raízes adventícias primárias ( $p=0,5705$ ; IV=17,28), avaliado apenas aos 45 dias, não houve efeito significativo do meio de cultivo, obtendo-se uma média geral de 1,11 cm, considerada satisfatória para espécies lenhosas. Em porta-enxertos de *Prunus* sp. cultivados em meio MS combinado com ágar + vermiculita, o comprimento da raiz foi de 1,06 cm, inferior aos meios nutritivos acrescidos apenas de ágar (1,32 cm) ou combinados com vermiculita (1,52 cm) (TIBOLA et al., 2004).

Sobre a altura das brotações ( $p=0,5347$ ; IV=10,47), também avaliada apenas aos 45 dias, não houve efeito significativo do meio de cultivo. Observou-se uma média geral (1,04 cm) um pouco mais alta inclusive que àquelas obtidas nos experimentos anteriores, e nos quais foram empregados reguladores de crescimento (0,96 cm com AIB e 0,81 cm com ANA). Isso ratifica a ideia de que as

auxinas empregadas isoladamente também não exercem influência no desenvolvimento da parte aérea de brotações de *Luehea divaricata*, nas condições em que foram realizados os experimentos.

Na rizogênese *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., o meio de cultivo composto por vermiculita + ágar em meio MS promoveu a maior média de brotações enraizadas (99,78%) (TIBOLA et al., 2004). Em brotações de *Peltophorum dubium*, os melhores resultados para a formação *in vitro* de raízes (36,78%) foram obtidos com a utilização da combinação de vermiculita, meio MS acrescido de 10µM de AIB, e ágar (CURTI, 2011; CURTI; REINIGER, 2014). Na fase de rizogênese *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 rizogênese (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

**Tabela 6 – Médias de raízes adventícias laterais de segunda ordem (%) 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.**

Table 6 – Average of second order lateral adventitious roots (%) in shoots of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (açoita-cavalo) depending on the interaction of *in vitro* culture period (15, 30 or 45 days) and the different culture medium.

Composição		Período (dias)			
Vermiculita (cm <sup>3</sup> )	Meio nutritivo WPM/2 (mL)	15	30	45	Média
15	10	0,0 Aa*	0,0 Aa	11,00 Abc	3,67
30	10	0,0 Aa	0,0 Aa	5,50 Ac	1,83
15	20	0,0 Ba	0,0 Ba	38,83 Aab	12,94
30	20	0,0 Ba	0,0 Ba	49,50 Aa	16,50
15	30	0,0 Aa	0,0 Aa	5,50 Ac	1,83
30	30	0,0 Ba	0,0 Ba	38,83 Aab	12,94

Fonte: Autores (2019)

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

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 da etapa de rizogênese *in vitro* nessa espécie. Além disso, deve-se considerar que o emprego de substratos inertes, como a vermiculita e a perlita, podem ser alternativas que também irão reduzir os custos da etapa de rizogênese *in vitro* de espécies lenhosas (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

## Conclusões

Para otimizar o processo de rizogênese de *Luehea divaricata* é indicado o cultivo *in vitro* por 45 dias em meio nutritivo WPM/2, combinado com vermiculita, prescindindo da adição de auxinas.

## Referências

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.
- CURTI, A. **Contribuições para a micropropagação de *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- CURTI, A.; REINIGER, L. R. S. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 314-320, 2014.
- 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. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1443-1449, 2004.
- FACHINELLO, J. C. *et al.* **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179 p.
- FAGANELLO, L. R. *et al.* Efeito dos ácidos indolbutírico e naftalenoacético no enraizamento de estacas semilenhosas de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 4, p. 863-871, 2015.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Ciência Florestal**, Santa Maria, 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.)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2012.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FERREIRA, M. E. *et al.* Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (vell.) pax com o uso de Ácido Indol Butírico e Ácido Naftaleno Acético. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010.
- FLÔRES, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- FLÔRES, A. V. *et al.* Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.
- 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. *et al.* **Plant Propagation: principles and practices**. 8<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall, 2010. 915 p.
- LANE, D. R.; BASSIRIRAD, H. Differential responses of tallgrass prairie species to nitrogen loading and varying ratios of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, p. 1227-1235, 2002.
- LEÓN, E. A. B. **Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese *in vitro* em explantes**

**de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)** 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

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

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

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

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

NICIOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - Fabaceae.** 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

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

PASA, M. S. *et al.* Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, 2012.

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

ROCHA, S. C. *et al.* Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SANTA-CATARINA, C. *et al.* Micropropagação do porta-enxerto de macieira 'Seleção 69' tolerante à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 757-762, 2001.

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 [...]** Pelotas: [s. n.], 2006.

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

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

TIBOLA, C. S. *et al.* Diferentes meios de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, 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.** Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 261-296.

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

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: princípios e técnicas.** 2. ed. Viçosa, MG: Ed UFV, 2013. 279 p.

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