

MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES DE *Acacia mearnsii* DE WILD. SOB DIFERENTES MEIOS DE CULTURA¹

Ruter Disarz² e Maísa Pimentel Martins Corder³

RESUMO – A propagação de indivíduos superiores de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) visando ao estabelecimento de florestas mais produtivas, homogêneas, resistentes a pragas e doenças é uma necessidade nos dias atuais. Este estudo objetivou determinar o melhor meio de cultura, a concentração dos seus principais sais e a utilização de carvão ativado para multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *A. mearnsii*. Plântulas germinadas *in vitro* forneceram explantes que foram inoculados em diferentes meios de cultura B₅, MS, SP e WPM. Foram testadas diversas concentrações do meio MS: ¼, ½, ¾ e 1/1 (concentração original), 5/4, 3/2, 7/4 e 2/1, com e sem carvão ativado. Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados com cinco, sete e quatro repetições, respectivamente, com quatro explantes por parcela. As avaliações foram feitas em intervalos de 30 dias, através da contagem do número de folhas e gemas e da presença de calos e clorose. Entre os meios utilizados em sua composição original, o MS promoveu a maior multiplicação de gemas (3,7 gemas/explante) aos 30 dias. Entre as concentrações de macronutrientes do meio MS, a diluição para 3/4 da concentração original com a adição de carvão ativado apresentou as melhores respostas para a multiplicação de gemas axilares de acácia-negra (7,7 gemas/explante) aos 60 dias.

Palavras-chave: Acácia-negra, carvão ativado e multiplicação.

MULTIPLICATION OF AXILLARY SHOOTS IN *Acacia mearnsii* DE WILD. UNDER DIFFERENT CULTURE MEDIUM

ABSTRACT – The propagation of some superior black wattle individuals (*Acacia mearnsii* De Wild.) aiming the establishment of more productive, homogeneous forests, resistant to plagues and diseases, is in great need in our days. The objective of the present report is to find the best culture medium and analyze the use of activated charcoal in the *in vitro* multiplication of axillary buds of *A. mearnsii*. Explants of *in vitro* germinated plants were inoculated in different culture media: B₅, MS, SP and WPM. Several concentrations of MS medium were tested: 1/4; 1/2; 3/4; 1/1 (original concentration); 5/4; 3/2; 7/4 and 2/1, with and without activated charcoal. It was used a randomized experimental design, with five, seven and four replicates, with four explants per replicate. The evaluations were performed after 30 days, through the counting of the numbers of leafs and axillary shoots and the presence of callus and chlorosis. Among the media used in the original composition, the MS promoted the best multiplication of axillary shoots (3,7 buds/explants) on the thirtieth day of culture. Among the MS medium macro-nutrient concentrations, the dilution to 3/4 of the original concentration with the addition of activated carbon promoted the best responses for the multiplication of black wattle axillary shoots (7,7 buds/explant) after 60 days of culture.

Keywords: Black wattle, activated charcoal and *in vitro* micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Acacia mearnsii (De Wild.), popularmente conhecida como acácia-negra pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, é uma árvore de porte médio, copa arredondada e casca castanho-escura

dividida em pequenas placas (MARCHIORI, 1997). É uma espécie fixadora de nitrogênio, que é empregada em regiões subtropicais para proteção e recuperação de solos degradados, produtora de carvão e celulose; utilizada principalmente para a extração de tanino

¹ Recebido em 02.09.2007 e aceito para publicação em 29.05.2009.

² Programa de Pós-Graduação em Geomática da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). E-mail: <ruterdisarz@hotmail.com>

³ Departamento de Ciências Florestais da UFSM. E-mail: <lbfmaisa@smail.ufsm.br>.



(QUOIRIN et al., 2001; OLD et al., 2002). Sua casca é considerada a principal fonte de tanino do mundo, contendo entre 36 e 41% de taninos aproveitáveis (JONES et al., 1990), sendo utilizados em diversos setores industriais, de curtumes até a indústria farmacêutica (MONTEIRO et al., 2005). Foi introduzida no Brasil por sementes trazidas da África do Sul (TONIETTO e STEIN, 1997).

Entre as espécies florestais que compõem o cenário silvicultural no país, ocupado tradicionalmente pelos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, *A. mearnsii* tem assumido, nos últimos anos, relevante expressão comercial ante as relações internas e externas de mercado estabelecidas pelas empresas do setor florestal (PERRANDO e CORDER, 2006). A produção comercial de *A. mearnsii* ocupa uma área de aproximadamente 160 mil hectares, concentrada no sul do Brasil, da qual participam cerca de 10 mil propriedades da agricultura familiar (FOWLER et al., 1999).

O crescente cultivo de acácia-negra, entretanto, ainda é estabelecido a partir de mudas produzidas por sementes, resultando em florestas com alta variabilidade genética entre os indivíduos do povoamento e, conseqüentemente, variabilidade na produtividade da floresta. Com o intuito de aumentar a produtividade das florestas de *A. mearnsii*, a propagação clonal de indivíduos superiores selecionados dentro de um Programa de Melhoramento Genético vem sendo desenvolvida através da cultura de tecidos (BECK et al., 2000; VENGADESAN et al., 2002).

Espécies do gênero *Acacia* apresentam diversos problemas durante a propagação *in vitro*. Contudo, sucessos são relatados, principalmente para *A. several* (NANGIA e SINGH, 1996; BECK e DUNLOP, 2001; BECK, 1999). O crescimento *in vitro* e o desenvolvimento de plantas é determinado por vários fatores, como genótipo, concentração de macronutrientes e micronutrientes no meio de cultura, substâncias orgânicas como reguladores de crescimento, vitaminas e fontes de carbono (PIERIK, 1987). A técnica do cultivo *in vitro* para de o gênero *Acacia* tem sua problemática relatada acerca da definição do meio básico a ser utilizado e o balanço adequado entre auxinas e citocininas, principalmente na etapa de multiplicação de gemas.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer a melhor formulação e concentração dos principais sais que compõem o meio de cultura utilizado para a micropropagação e clonagem em escala comercial de *A. mearnsii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Plântulas de *A. mearnsii* germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes para a instalação dos experimentos. Utilizou-se um lote de sementes procedentes de plantios comerciais próximos da cidade de Butiá, RS. A quebra de dormência das sementes foi realizada pela imersão, durante três minutos, em água quente (80 ± 2 °C), seguida de choque térmico em água fria (0 °C) com Tween 20 a 2% (v/v), repousando por um período de 24 h. A desinfestação superficial das sementes constitui-se na imersão em álcool 70% (v/v) durante 40 seg, seguida de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) durante 12 min e em cloreto de mercúrio a 0,2% (p/v) por 8 min, sob agitação constante. Posteriormente, as sementes foram enxaguadas com água destilada esterilizada e inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio nutritivo MS, semissolidificado com 6 g.L⁻¹ de ágar.

As plântulas desenvolveram-se durante 21 dias em temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após esse período, segmentos nodais medindo aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculados em meio nutritivo com adição de 2 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzylaminopurine). Os meios de cultura após o ajuste do pH para 5,8 foram esterilizados durante 15 min, através de autoclavagem com pressão de 1,5 atm e 125 °C.

As avaliações foram feitas a cada 30 dias de cultivo, quando foram avaliados: presença de calos, presença de clorose e número de gemas, folhas e raízes por explante. Os dados foram transformados em $(X+0,5)^{1/2}$ e submetidos à análise de variância, procedendo-se à comparação entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância, nos diferentes meios de cultura e ajuste de equações de regressão para a concentração de macronutrientes do meio MS.

2.1. Análise de diferentes meios nutritivos no desenvolvimento de explantes de acácia-negra

Foram testados os seguintes meios de cultura: i) MS (MURASHIGE e SKOOG 1962); ii) B₅ (GAMBORG et al., 1968); iii) WPM (LLOYD e McCROWN, 1981); e iv) SP (BARRUETO-CID e DURZAN, 2003). Os meios de cultura tiveram o seu pH ajustado para 5,8. A seguir, os meios de cultura foram esterilizados através de

autoclavagem com pressão de 1,5 atm por um período de 15 min, na temperatura de 125 °C.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, composto por quatro tratamentos constituídos pelos meios de cultura (MS, B₅, WPM e SP), distribuídos em cinco repetições com quatro explantes por parcela. Para atender às pressuposições do modelo matemático, os valores observados foram transformados pelo método da raiz quadrada. A hipótese de diferença entre os diversos meios de cultura foi testada pela estatística F. O valor do F calculado foi considerado significativo em nível de $\alpha \leq 5\%$ quando foi superior ou igual ao valor do F tabelado. A comparação entre as médias observadas nos diferentes meios de cultura foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.2. Influência de diferentes concentrações do meio MS

Foram testadas as seguintes concentrações de macronutrientes no meio de cultura MS: i) aumento dos macronutrientes em 100% em relação à concentração original (proporção de 2/1); ii) aumento de macronutrientes em 75% da concentração original (proporção de 7/4); iii) aumento de macronutrientes em 50% em relação à concentração original (proporção de 3/2); iv) aumento de 25% dos macronutrientes em relação à formulação original (proporção de 5/4); v) concentração original (1/1); vi) redução dos macronutrientes em 25% da concentração original (proporção de 3/4); vii) redução de macronutrientes em 50% em relação à concentração original (proporção de 1/2); e viii) redução em 75% da concentração de macronutrientes em relação à concentração original (proporção de 1/4).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso composto por sete tratamentos (diferentes concentrações de macronutrientes em relação à formulação original do meio MS) e uma testemunha (concentração original do meio MS) distribuídos em sete repetições contendo quatro explantes por parcela. Os valores observados foram transformados pelo método da raiz quadrada. Foi realizado o ajuste de equações de regressão das diversas concentrações de macronutrientes no meio MS.

2.3. Efeito da adição de carvão ativado no meio de cultura

As diferentes concentrações de macronutrientes no meio de cultura MS e o meio de cultura em sua formulação original descritos no item 2.3 foram testados

na ausência e presença de carvão ativado, na concentração de 1 g.L⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso em esquema bifatorial (8 x 2), composto por sete tratamentos (diferentes concentrações de macronutrientes em relação à formulação original do meio MS) e uma testemunha (concentração original do meio MS) testados na ausência e na presença de carvão ativado, distribuídos com quatro repetições contendo quatro explantes por parcela. As avaliações foram conduzidas de acordo com o descrito nos itens anteriores. Os valores observados foram transformados pelo método da raiz quadrada, sendo realizado o ajuste de equações de regressão das diversas concentrações de macronutrientes no meio MS testadas na presença e ausência de carvão ativado.

2.4. Acimação das plantas

Após o período de enraizamento, as plântulas foram retiradas dos frascos e as raízes, lavadas em água corrente para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, as plântulas foram acondicionadas em frascos de cultura (Figura 1MP) contendo substrato orgânico esterilizado Plantmax® e vermiculita (1:1). Os frascos de cultura contendo as plântulas foram mantidos fechados em sala de incubação, sob condições controladas descritas anteriormente por 28 dias. As tampas dos frascos de cultura foram parcialmente abertas aos sete dias e totalmente abertas aos 14 dias. Após o período na sala de incubação, as plântulas foram transferidas para tubetes de 280 cm³ e levadas para a casa de vegetação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito dos diferentes meios de cultura

Os quatro meios de cultura testados (MS, B₅, WPM e SP) promoveram a multiplicação de gemas axilares de *A. mearnsii*. Foi observada diferença significativa entre os meios de cultura analisados, de acordo com a estatística F, a 5% de probabilidade de erro (Tabela 1). Alguns resultados similares foram encontrados em algumas espécies do gênero *Acacia*. Em *Acacia mangium*, foi observada a formação de duas a cinco gemas por explante ao ser utilizado o meio de cultura MS como fonte nutritiva (BHASKAR et al., 1996). Em outros estudos realizados com espécies do gênero *Acacia*, como *A. sclerospema*, *A. sinuata*, *A. mangium*, *A. catechu*, *A. albida*, inclusive *A. mearnsii*,

foram observados melhores índices de multiplicação das gemas axilares com o meio nutritivo MS. Resultados satisfatórios também foram relatados para a multiplicação *in vitro* de espécies de acácias com outros meios de cultura (DRIVER e KUNIYUKI, 1984; DEWAN et al., 1992; MONTEUUIS et al., 1998; BECK e DUNLOP, 2001; VENGADESAN et al., 2002).

O número médio de gemas por explante observada em plântulas de acácia-negra (Tabela 1) desenvolvidas no meio de cultura B₅ foi semelhante ao verificado por Borges et al. (2004). Nesse estudo, os autores utilizaram a mesma concentração de BAP (2 mg.L⁻¹) no meio nutritivo, o que evidenciou a superioridade do meio MS na multiplicação de gemas axilares de *A. mearnsii*. Foi observada a formação de calos em praticamente todos os explantes. Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos dessa variável. Foi observada a incidência de clorose em todos os tratamentos analisados, embora exista evidência de ausência de correlação com os tratamentos empregados, efeito relatado nos estudos realizados por Quoirin et al. (2001) e Perrando (2003). Não foi observada a formação de raízes nos explantes.

As médias superiores observadas no meio de cultura MS neste estudo podem estar associadas ao fato de esse meio nutritivo possuir maior força iônica em relação aos demais tratamentos testados. A concentração total de nitrogênio observada nas formulações dos meios de cultura testados (MS: 60 µM; B₅: 27 µM; WPM: 15 µM; e SP: 30 µM) tem reforçado essa hipótese. O sucesso na utilização dos demais meios de cultura provavelmente encontra-se associado a um período de subcultivo menor (ROCHA et al., 2007).

Tabela 1 – Número médio de gemas axilares e de folhas por explante de *Acacia mearnsii* De Wild., em diferentes meios nutritivos, aos 30 dias de cultivo

Table 1 – Number of *Acacia mearnsii* De Wild. axillary shoots and leaves, after 30 days of culture in different culture media

Meios nutritivos	Número médio de gemas/explante	Número médio de folhas/explante
MS	3,66 ± 0,16a	5,30 ± 0,29a ¹
WPM	3,06 ± 0,17b	4,52 ± 0,38b
B5	2,89 ± 0,29bc	4,54 ± 0,24b
SP	1,28 ± 0,29c	3,26 ± 0,47c

¹Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.2. Efeito da concentração de macronutrientes do meio MS com e sem adição de carvão ativado

A elevação na concentração dos macronutrientes conduziu à senescência e morte dos tecidos conforme a Figura 1 (D-F). Entretanto, a redução de 25% na concentração dos principais sais do meio MS mostrou-se mais eficaz para a formação de gemas e folhas (Figura 2), embora tenham sido evidenciados efeitos prejudiciais ao desenvolvimento de folhas e de gemas com a redução de 50% e 75% na concentração dos sais. A utilização de baixas concentrações de macronutrientes no meio de cultura MS favoreceu o aparecimento de sintomas de deficiência nutricional como raquitismo e necrose foliar. Outros estudos foram bem-sucedidos na multiplicação e enraizamento de plântulas das espécies *Acacia bivenova* e *A. sclerosperma* com a utilização do meio nutritivo MS contendo uma concentração reduzida dos principais sais (AHÈE e DUHOUX, 1994; AHUJA, 1993). Foram observadas multiplicação de gemas superior, uma maior área foliar, uma menor formação de calos, uma maior formação de raízes e ausência de clorose em explantes subcultivados em meio MS com a adição de carvão ativado. Uma hipótese para esse comportamento foi o maior efeito da adsorção de substâncias inibidoras de crescimento, como os polifenóis e o etileno, o que já foi relatado por Pan e Staden (1998).

A análise de regressão da concentração de macronutrientes apresentou resposta quadrática negativa (Figura 2). A redução de 25% dos principais sais do meio MS com ou sem a adição de carvão ativado ao meio de cultura resultou em 7,2 gemas/explante (Figura 2A) e 7,7 folhas/explante (Figura 2C) aos 60 dias.

Com a presença de carvão ativado no meio de cultura, os índices de clorose e de presença de calos foram significativamente menores; e sintomas como o raquitismo e a necrose foliar não ocorreram. Efeitos similares foram também observados por Quoirin et al. (2001). A presença de carvão ativado proporcionou a formação de raízes nos demais explantes (Figura 1C). Quando a concentração de macronutrientes foi dobrada, a incidência de calos foi menor, no entanto aos 60 dias os explantes estavam em avançado processo de senescência com a perda de praticamente todas as folhas formadas (Figura 1DE).

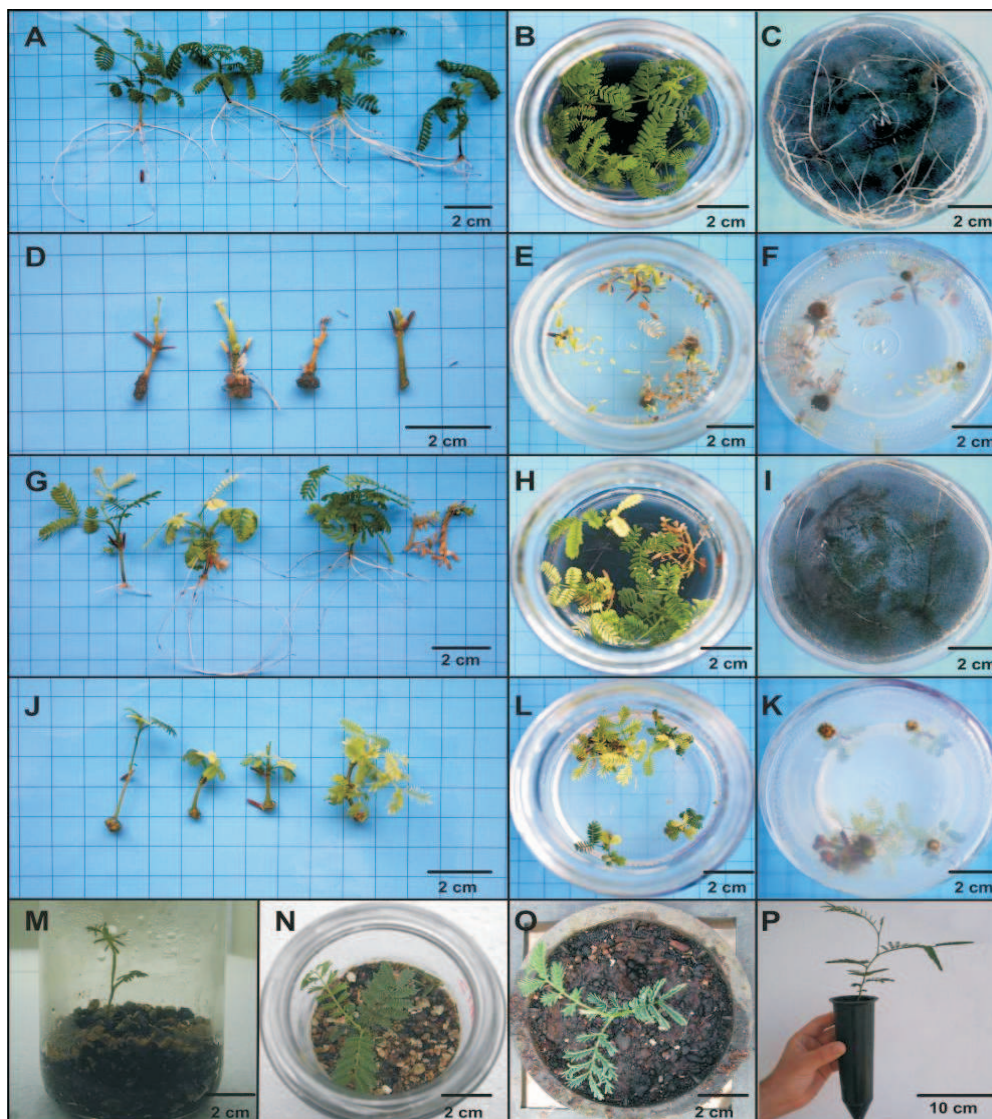


Figura 1 – Regeneração *in vitro* de gemas axilares de *A. mearnsii* a partir de segmentos de hipocótilos cultivados em meio MS, aos 60 dias. (A), (B) e (C): desenvolvimento dos explantes sob a redução de 25% da concentração de macronutrientes do meio MS com adição de carvão ativado (1 mg.L^{-1}); (D), (E) e (F): desenvolvimento dos explantes sob o aumento de 100% na concentração de macronutrientes do meio MS sem a adição de carvão ativado; (G), (H) e (I): desenvolvimento dos explantes sob o aumento de 100% na concentração de macronutrientes do meio MS com a adição de carvão ativado (1 mg.L^{-1}); (J), (K) e (L): desenvolvimento dos explantes sob a concentração original de macronutrientes do meio MS sem a adição de carvão ativado; e (M), (N), (O) e (P): aclimação das plantas em sala de incubação e casa de vegetação, respectivamente.

Figure 1 – *In vitro* axillary shoots of *A. mearnsii* from segmented hypocotyls after 60 days of cultivation in MS medium. (A), (B) and (C) Development of the explants submitted to the reduction of 25% of all macronutrients of the MS medium with the addition of activated charcoal (1 mg.L^{-1}); (D), (E) and (F) Development of the explants in MS medium with the double concentration of macronutrients, without addition of activated charcoal; (G), (H) and (I) Development of the explants in MS medium with the double concentration of macronutrients, with addition of activated charcoal (1 mg.L^{-1}); (J), (K) and (L) Development of the explants in the original MS medium without addition of activated charcoal, and (M), (N), (O) e (P) Acclimatization of plants in the incubation room and in the green house, respectively.

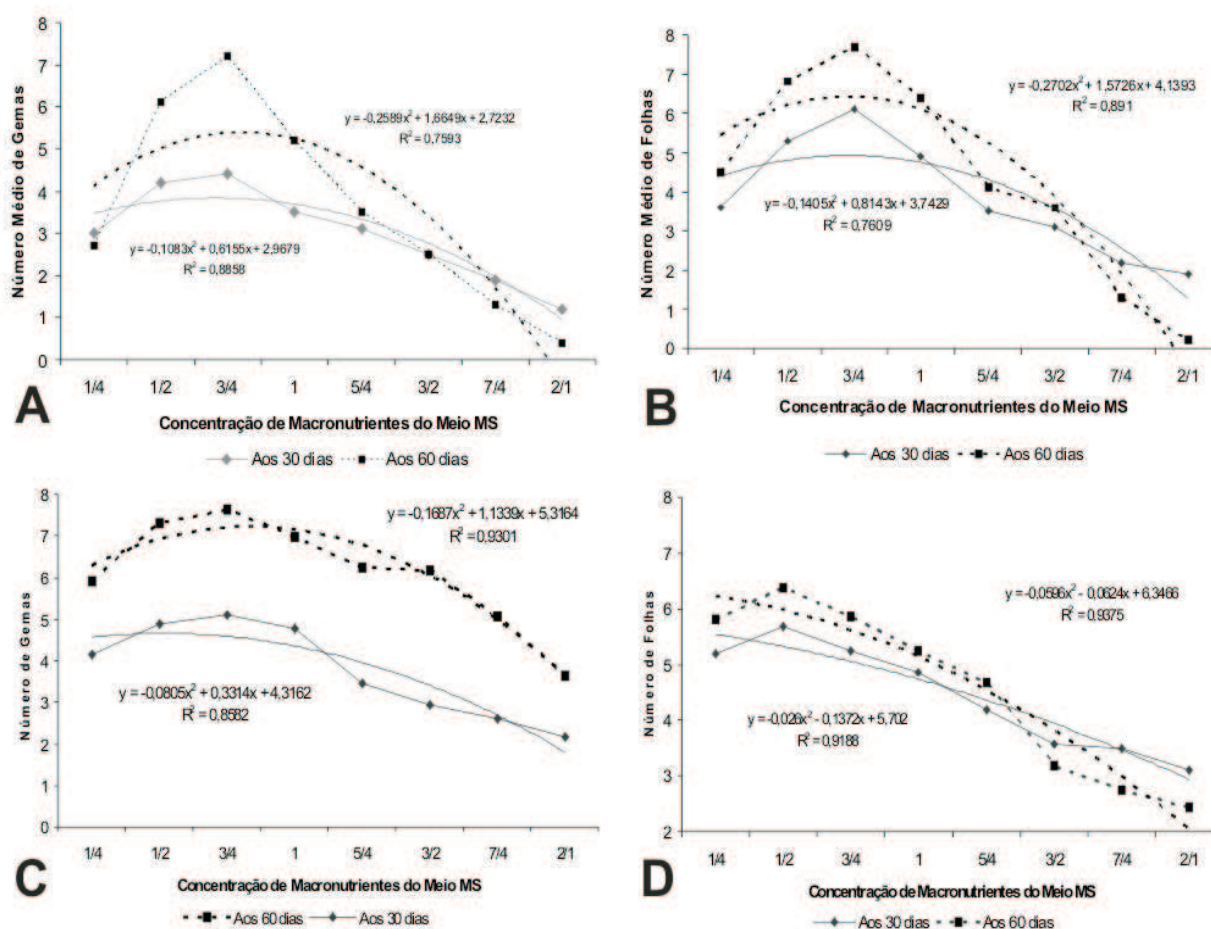


Figura 2 – Estimativas do número médio de gemas axilares e folhas por explante de *Acacia mearnsii* De Wild., em função das concentrações de macronutrientes do meio MS: A) número médio de gemas em meio sem carvão ativado; B) número médio de folhas em meio sem carvão ativado; C) número médio de gemas em meio com carvão ativado; e D) número médio de folhas em meio com carvão ativado.

Figure 2 – *Estimates of the mean number of Acacia mearnsii* De Wild. axillary shoots and leaves per explant, according to the concentration of MS medium macronutrients: A) Mean number of axillary shoots in medium without activated charcoal; B) Mean number of leaves in medium without activated charcoal; C) Mean number of axillary shoots in medium with activated charcoal; D) Mean number of leaves in medium with activated charcoal.

Mesmo com a ausência de auxinas, a adição de carvão ativado ao meio de cultura impede a incidência de luz na base do explante, estimulando o enraizamento dos explantes (PAN e van STADEN, 1998). Neste estudo, foi observado o enraizamento de 92% dos explantes cultivados em meio MS com 3/4 da concentração de macronutrientes com a adição do carvão ativado.

Resultados similares foram obtidos por Huang et al. (1994), que utilizaram a composição original do meio MS e encontraram 2,4 gemas/explante, enquanto Quoirin et al. (2001) com a redução para 3/4 da

concentração original de macronutrientes do meio MS encontraram três gemas/explante.

Mounteuuis et al. (1998), trabalhando com diferentes concentrações de macronutrientes, salientaram a relação da composição dos principais sais constituintes do meio nutricional com a morfogênese *in vitro*. Al Wassel (2000) relatou que o meio MS (concentração original de sais) promoveu a maior multiplicação de *A. seyal*, porém apresentou formação de raízes anormais quando comparado com o tratamento utilizando MS com metade da concentração original de sais.

Os explantes mantidos em meio MS com a redução de 25% na concentração dos macronutrientes foram mantidos em multiplicação até o 11º subcultivo. Após, foram enraizados sem a adição de auxinas e aclimatados com 98% de sobrevivência das plantas (Figura 2P).

4. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu a micropropagação *in vitro* de *A. mearnsii*. No entanto, a etapa de multiplicação precisa ser otimizada.

Entre os meios de cultura testados (B₅, MS, SP e WPM), o MS promoveu a maior formação de gemas e folhas em explantes de *A. mearnsii*. A redução de 25% na concentração dos macronutrientes do meio MS combinado com a adição de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado promoveu as maiores taxas de multiplicação e possibilitou o enraizamento e aclimação da espécie.

5. AGRADECIMENTOS

À Empresa Agroseta S.A., pelo apoio financeiro e fornecimento de sementes.

6. REFERÊNCIAS

AHÈÈ, J.; DUHOUX, E. Root culturing of *Faidherbia* = *Acacia albida* as a source of explants for shoot regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, n.2, p.219-225, 1994.

AHUJA, R. M. **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, Forestry sciences, 1993. v.41.

AI-WASSEL, A. Micropropagation of *Acacia seyal* Del. *in vitro*. **Journal of Arid Environments**, v.46, n.4, p.425-431, 2000.

BARRUETO-CID, L. P.; DURZAN, D. J. **Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares, sob condições *in vitro***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 35p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 49).

BECK, S. L. **Micropropagation of *Acacia mearnsii* De Wild.** 1999. 126f. Tese - University of Natal, Pietermaritzburg, 1999.

BECK, S. L.; DUNLOP, R. Micropropagation of the *Acacia* species – a review. **In vitro Cellular Development Biological Plant**, v.37, n.55, p.531-538, 2001.

BECK, S. L.; DUNLOP, R.; van STADEN, J. Rejuvenation and micropropagation of *Acacia mearnsii* De Wild. Using coppice material. **Plant Growth Regulation**, v.26, n.1, p.149-153, 1998.

BECK, S. L.; DUNLOP, R.; van STADEN, J. Meristem culture of *Acacia mearnsii*. **Plant Growth Regulation**, v.32, n.1, p.49-58, 2000.

BHASKAR, P.; VERMA, B.; KANT, U. Micropropagation of *Acacia mangium* De Wild. Through nodal bud culture. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.34, n.6, p.590-591, 1996.

BORGES, N. J.; SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, v.28, n.4, p.493-498, 2004.

DEWAN, A.; NANDA, K.; GUPTA, S. C. *In vitro* micropropagation of *Acacia nilotica* Subsp. India Brenan via cotyledoary nodes. **Plant Cell Reporter**, v.12, p.18-21, 1992.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of paradox walnut root stocks. **HorticScience**, v.19, p.507-509, 1984.

FOWLER, J. A. P. et al. **Germinação e vigor de sementes de *Acacia mearnsii* De Wild. coletadas em diferentes povoamentos do Estado do Rio Grande do Sul**. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1999. 4p. (Comunicado Técnico, 39).

OLD, K. M. et al. **FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 20. *Acacia* spp.** Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, 2002.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, n.1, p.151-158, 1968.



- HUANG, F. H.; AI-KHAYRI, J. M.; EDWARD, E. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.30, n.1, p.70-74, 1994.
- JONES, T. C.; BATCHELOR, C. A.; HARRIS, P. J. C. *In vitro* culture and propagation of *Acacia* species (*A. bivenova*, *A. holosericea*, *A. salicina*, *A. saligna* and *A. sclerosperma*), **International Tree Crops Journal**, v.6, n.1, p.183-192, 1990.
- LLOYD, G.; McCROWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings-International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1981.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997. 200p.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.
- MOUNTEUUIS, W.; BON, M. C. Influence of auxin and darkness on in vitro rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, n.3, p.173-177, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NANGIA, S.; SINGH, R. Micropropagation of *Acacia tortilis* hayne (Umbrella thorn) through cotyledonary node culture. **Indian Journal of Plant Physiology**, v.1, n.2, p. 77-79, 1996.
- PAN, M. J.; van STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v.26, n.3, p.155-163, 1998.
- PERRANDO, E. R. **Propagação vegetativa de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.)**. 2003. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.
- PERRANDO, E. R.; CORDER, M. P. M. Rebrotas de cepas de *Acacia mearnsii* em diferentes idades, épocas do ano e alturas de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.4, p.555-562, 2006.
- PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. 344p.
- QUOIRIN, M. et al. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, n.3, p.199-205, 2001.
- ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v.31, n.1, p.43-50, 2007.
- TONIETTO, L.; STEIN, P. P. Silvicultura da acácia-negra (*Acacia mearnsii* DE Wild.) no Brasil. **Florestal Estatístico**, v.4, n.12, p.11-16, 1997.
- VENGADESAN, G. et al. In vitro propagation of *Acacia* species – A review. **Plant Science**. v.163, n.4, p.663-671, 2002.