



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DIVERSIDADE GENÉTICA, MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO*
DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.) E AMBURANA (*Amburana cearensis*
[Allemão] A. C. Smith)

HERICK FERNANDO DE JESUS SILVA

2019

HERICK FERNANDO DE JESUS SILVA

DIVERSIDADE GENÉTICA, MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO*
DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.) E AMBURANA (*Amburana cearensis*
[Allemão] A. C. Smith)

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Agronomia - Doutorado, área
de concentração em Produção Vegetal, para
obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

Coorientadoras

Dra. Simone Abreu Asmar

Dra. Ana Valéria Vieira de Souza

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFU, MG,
Brasil.

S586d
2019

Silva, Herick Fernando de Jesus, 1988
Diversidade genética, multiplicação e conservação *in vitro* de
juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.) e amburana (*Amburana cearensis*
[Allemano] A. C. Smith) [recurso eletrônico] / Herick Fernando de Jesus
Silva. - 2019.

Orientador: José Magno Queiroz Luz.
Coorientadora: Simone Abreu Asmar.
Coorientadora: Ana Valéria Vieira de
Souza.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Agronomia.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1240>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Agronomia. 2. Plantas - Melhoramento genético. 3. Caatinga. 4.
Genética vegetal. I. Luz, José Magno Queiroz, 1967, (Orient.). II.
Asmar, Simone Abreu, 1982, (Coorient.). III. Souza, Ana Valéria Vieira
de, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

HERICK FERNANDO DE JESUS SILVA

DIVERSIDADE GENÉTICA, MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO*
DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.) E AMBURANA (*Amburana cearensis*
[Allemão] A. C. Smith)

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Agronomia - Doutorado, área
de concentração em Produção Vegetal, para
obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2019.

Dra. Ana Valéria Vieira de Souza

Embrapa Semiárido

Dra. Muza do Carmo Vieira

IF Goiano

Dra. Roberta Camargos de Oliveira

UFU

Hernane Fernandes Pinhal

UFU


Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS-GERAIS – BRASIL

2019

Aos meus pais Neusa e Reinaldo,
aos quais devo maior retribuição de amor e gratidão.

OFEREÇO E DEDICO!

“O conhecimento sem experiência pessoal é fútil. A sabedoria que está dentro de nós não servirá para nada se for estática. Só tomará a forma de simples intelectualismo. Se tal conhecimento é levado ao âmbito da prática, torna-se digno de crédito. Adquirir e anular riquezas não servirá para nada se não for consagrada e usada para o bem-estar do mundo. Da mesma forma, a simples aquisição de conhecimentos dos livros é um exercício fútil. O conhecimento só se torna abençoado quando é transformado em ações que promovem o bem da humanidade.”

Sathya Sai Baba

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, fonte divina de inspiração e guia nessa trajetória repleta de adversidades.

Aos meus pais, Neusa e Reinado, meu alicerce, meus mestres de vida, presentes de Deus. Sem o amor e apoio incondicional prestados a mim não seria possível concluir mais esse desafio em minha vida.

Aos meus irmãos Reinaldo, Celina e Tati, pela compreensão, pela torcida e incentivo em todos os momentos.

À Simone, coorientadora, amiga, conselheira na tese e na vida. Os momentos de incerteza, aflição e desespero só foram superados porque contei com a amizade e competência dessa grande profissional!

Agradeço também a coorientação da pesquisadora Ana Valéria (Embrapa Semiárido), uma das responsáveis pela concretização desse projeto, através do fornecimento de materiais e dos preciosos conselhos nos momentos de tomada de decisão.

Aos amigos e colegas de laboratório, Rayssa, Sabrina, Daniela, Hernane e Fernando. Sou muito grato a troca de conhecimentos e a contribuição fornecida na execução dos experimentos. Deixaram o “fardo” do doutorado mais leve através dos momentos de parceria e descontração proporcionados.

Gratidão ao meu orientador José Magno por ter depositado em mim confiança e ter contribuído para a concretização desse trabalho com o seu valoroso conhecimento.

Ao professor Gabriel Mascarenhas pela prontificação e boa vontade em ter contribuído com as análises genéticas.

Agradeço também o apoio da Universidade Federal de Lavras, em especial a Dra. Cristina Soares, pelas análises moleculares executadas.

Não poderia deixar de lembrar dos meus amigos irmãos, Bruno, Jairo e Paula, por sempre terem acreditado no meu potencial e me impulsionarem nos momentos de desânimo.

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação em Agronomia, pelos palpites, contribuição e troca de experiências. Conhecimentos multidisciplinares que contribuíram no aprimoramento do meu senso crítico profissional.

Aos docentes do programa de Pós-graduação em Agronomia, meu muito obrigado por todo conhecimento repassado.

À Universidade Federal de Uberlândia, instituição que me acolheu de braços abertos e que sempre terei orgulho de dizer que faz parte da minha história.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as demais pessoas que de forma direta e indireta se envolveram para a concretização desse sonho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO 1	10
ARTIGO 1: MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE JUAZEIRO (<i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.)	10
RESUMO	10
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS	12
<i>Experimento 1 - Indução de brotações- balanço de ANA e BAP</i>	13
<i>Experimento 2- Indução de enraizamento- ANA e AIB</i>	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
<i>Experimento 1: Indução de brotações- balanço de ANA e BAP</i>	14
<i>Experimento 2- Indução de enraizamento- ANA e AIB</i>	17
CONCLUSÕES.....	20
REFERÊNCIAS	21
ARTIGO 2: CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE JUAZEIRO (<i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.) POR MEIO DE CRESCIMENTO MÍNIMO	26
RESUMO	26
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
<i>Primeira fase: crescimento mínimo via agentes osmóticos</i>	29

<i>Segunda fase: Retomada do crescimento</i>	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
<i>Primeira fase: crescimento mínimo via agentes osmóticos</i>	30
<i>Segunda fase: Retomada do crescimento</i>	34
CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2	42
MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE AMBURANA (<i>Amburana cearensis</i> [Allemão] A. C. Smith).....	42
RESUMO	42
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS	45
<i>Experimento 1: Multiplicação de explantes</i>	46
<i>Experimento 2: Alongamento de explantes</i>	47
<i>Experimento 3: Enraizamento</i>	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
<i>Experimento 1: Multiplicação de explantes</i>	47
<i>Experimento 2: Alongamento de explantes</i>	55
<i>Experimento 3: Enraizamento</i>	56
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 3	68
DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE ACESSOS DE AMBURANA (<i>Amburana cearensis</i>): MÉTODOS HIERÁRQUICOS E DE OTIMIZAÇÃO.....	68
RESUMO	68
ABSTRACT	69
INTRODUÇÃO.....	69

MATERIAL E MÉTODOS	71
<i>Obtenção do Material Vegetal</i>	71
<i>Extração do DNA</i>	72
<i>Marcador Molecular ISSR</i>	73
<i>Análise Estatística</i>	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1: MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.)

TABELA 1. Resumo da análise de variância das características número de folhas (NF), altura do broto (AB), número de brotos (NB), índice spad (ISP), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob três doses de ácido naftalenoacético (ANA) e cinco doses de belzilaminopurina (BAP). Uberlândia-MG, 2019. 14

TABELA 2. Resumo da análise de variância das características número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), massa fresca (MF), massa seca (MS) e índice SPAD (IS) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes reguladores de crescimento e quatro doses. Uberlândia-MG, 2019. 17

TABELA 3. Comprimento da parte aérea de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas em meios de cultura acrescidos de diferentes doses de ANA (ácido naftalenoacético) ou AIB (ácido indolacético). Uberlândia-MG, 2019 18

ARTIGO 2: CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.) POR MEIO DE CRESCIMENTO MÍNIMO

TABELA 1. Número de brotos (NB), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas vivas (NFV) e taxa de mortalidade final (TM) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) conservadas *in vitro* na presença ou na ausência de duas doses de agentes osmóticos. Uberlândia- MG, 2019. 31

TABELA 2. Índice SPAD (ISD), comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas vivas (NF), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) submetidas à retomada de crescimento *in vitro* após 240 dias de conservação. Uberlândia- MG, 2019. 34

CAPÍTULO 2

ARTIGO: MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE AMBURANA (*Amburana cearensis*)

TABELA 1. Resumo da análise de variância das características comprimento do broto (CB), número de brotos (NB), número de gemas (NG), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro MC (meios de cultura), duas doses de SAC (sacarose) e quatro doses de BAP (benzilaminopurina). Uberlândia- MG, 2019.48

TABELA 2. Comprimento médio do broto (cm) e massa seca (g) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* em diferentes meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019. 49

TABELA 3. Número de brotos e número de gemas de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro concentrações de reguladores de crescimento, duas doses de sacarose e em diferentes meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019.50

TABELA 4. Massa fresca de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro concentrações de reguladores de crescimento, duas doses de sacarose e em diferentes meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019.52

TABELA 5. Massa seca de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro concentrações de reguladores de crescimento e duas doses de sacarose. Uberlândia-MG, 2019.....54

TABELA 6. Comprimento da parta aérea (CPA), número de brotos (NB), Número de gemas (NG), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob ausência ou presença de regulador de crescimento. Uberlândia-MG, 2019..... 55

TABELA 7. Resumo da análise de variância das características número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) de plantas de Amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob três doses de AIB e cinco tempos de exposição. Uberlândia- MG, 2019.....57

TABELA 8. Número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob três doses de AIB e cinco tempos de exposição. Uberlândia- MG, 2019.....58

CAPÍTULO 3

ARTIGO: DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE ACESSOS DE AMBURANA (*Amburana cearensis*): MÉTODOS HIERÁRQUICOS E DE OTIMIZAÇÃO

TABELA 1. Relação dos iniciadores ISSR utilizados na avaliação dos 112 genótipos de *Amburana cearensis*, com as respectivas sequências e temperatura de anelamento (Ta). Uberlândia- MG, 2019. 73

TABELA 2. Teste de médias do conteúdo de DNA de 68 acessos de <i>Amburana cearensis</i> . Uberlândia- MG, 2019.....	76
TABELA 3. Coeficientes de correlação cofenética (ccc) obtidos entre a matriz de distâncias euclidianas médias e a matriz de distâncias co-fenéticas para as diferentes metodologias hierárquicas. Uberlândia- MG, 2019	78
TABELA 4. Divisão de genótipos de <i>Amburana cearensis</i> em diferentes grupos genéticos baseada em seis métodos hierárquicos de agrupamento. Uberlândia- MG, 2019.	79
TABELA 5. Representação do agrupamento de 68 acessos de amburana (<i>Amburana cearensis</i>) pelo método de otimização de Tocher a partir das distâncias euclidianas obtidas com base na análise de caracteres moleculares. Uberlândia- MG, 2019.	82

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1. *Zizyphus joazeiro*: Árvore adulta (A) e detalhe da frutificação (B). Uberlândia- MG, 2019. 3

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1: MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.)

FIGURA 1. Massa fresca de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de ácido naftalenoacético (ANA). Uberlândia- MG, 2019.15

FIGURA 2. Altura dos brotos de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de benzilaminopurina (BAP). Uberlândia- MG, 2019.16

FIGURA 3. Comprimento da parte aérea de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de ANA (ácido naftalenoacético). Uberlândia- MG, 2019. 19

FIGURA 4. Número de raízes (A), comprimento da maior raiz (B), massa fresca (C) e massa seca (D) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas em meios de cultura acrescidos com ANA (ácido naftalenoacético) ou AIB (ácido indolacético). Uberlândia- MG, 2019. 20

ARTIGO 2: CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.)
POR MEIO DE CRESCIMENTO MÍNIMO

FIGURA 1. Evolução da taxa de mortalidade de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) conservadas *in vitro* na presença ou na ausência de duas doses de agentes osmóticos. Uberlândia- MG, 2019. 33

CAPÍTULO 2

ARTIGO: MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE AMBURANA (*Ambura cearensis*)

FIGURA 1. Número de gemas de plantas de umburana cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de BAP em diferentes meios de cultivo, acrescidos de 15 g L⁻¹ (A) ou 30 g L⁻¹ (B) de sacarose. Uberlândia- MG, 2019.51

FIGURA 2. Número de brotos de plantas de umburana cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de BAP em diferentes meios de cultivo, acrescidos de 15 g L⁻¹ (A) ou 30 g L⁻¹ (B) de sacarose. Uberlândia- MG, 2019.51

FIGURA 3. Massa fresca de plantas de umburana cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de BAP em diferentes meios de cultivo, acrescidos de 15 g L⁻¹ (A) ou 30 g L⁻¹ (B) de sacarose. Uberlândia- MG, 2019.53

FIGURA 4. Massa seca de plantas de umburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* em função de distintos meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019.55

FIGURA 5. Médias do número de raízes (A) e comprimento de raízes (B) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob diferentes tempos de exposição ao meio de cultura contendo 1 mg L⁻¹ de AIB. Uberlândia- MG, 2019.59

CAPÍTULO 3

ARTIGO: DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE ACESSOS DE AMBURANA (*Amburana cearensis*): MÉTODOS HIERÁRQUICOS E DE OTIMIZAÇÃO

FIGURA 1. Localização das seis regiões de coleta dos acessos de *Ambura cearensis* no estado de Pernambuco. Uberlândia- MG, 2019. 72

FIGURA 2. Dendrogramas representativos da dissimilaridade genética entre 68 acessos de amburana (*Amburana cearensis*) utilizando os métodos de agrupamento: Gower (A), Ligação média (B), UPGMA (C), Ward (D), Vizinho mais distante (E) e WPGMA (F) a partir das distâncias euclidianas obtidas, em diferentes locais no estado de Pernambuco. Uberlândia- MG, 2019. 78

RESUMO

SILVA, HERICK FERNANDO DE JESUS SILVA. **Diversidade genética, multiplicação e conservação *in vitro* de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.) e amburana (*Amburana cearensis* [Allemão] A. C. Smith).** 2019. 94 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

O juazeiro e a amburana são espécies nativas da Caatinga e que possuem múltiplos usos, atribuídos aos valores alimentícios, medicinais, madeireiros e ambientais que essas plantas apresentam. Entretanto, suas áreas naturais encontram-se sob alto processo de antropização, o que coloca essas espécies em condições vulneráveis de extinção. O objetivo desse trabalho foi realizar estudos visando caracterizar a divergência genética de germoplasmas nativos, bem como estabelecer um protocolo de multiplicação e conservação das mesmas. Os trabalhos foram conduzidos na Embrapa Semiárido, Petrolina- PE, e nas Universidades Federais de Uberlândia e Lavras. Para a multiplicação *in vitro* do juazeiro buscou-se induzir brotações dos explantes (mini estacas) utilizando-se doses de ANA (três doses) e BAP (cinco doses) – fatorial 3 x 5 – e para o enraizamento adotou-se duas auxinas, ANA e AIB, em quatro doses cada – fatorial 2 x 4 . No processo de conservação *in vitro* foram testados os reguladores osmóticos, manitol e sorbitol, ambos em duas doses, mais o tratamento testemunha, o que constituiu um fatorial 2 x 4 + 1. Essas plantas foram conservadas por 240 dias até a retomada de crescimento, que durou 60 dias. Para a multiplicação do juazeiro indica-se a dose de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 1,0 mg L⁻¹ para indução de brotações, e como melhor indutor de enraizamento obteve-se AIB. No processo de conservação O sorbitol a 5 mg L⁻¹ mostrou-se mais adequado à conservação *in vitro* de *Z. joazeiro*. Na multiplicação *in vitro* da amburana foram testados quatro meios de cultura – MS, MS/2, WPM e WPM/2 – quatro doses de BAP e duas doses de sacarose, o que constituiu um fatorial 4 x 4 x 2, com seis repetições e em DIC. Na segunda parte, referente ao alongamento estudou-se o efeito das doses 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ das auxinas AIA, ANA e AIB, mais a testemunha, em arranjo fatorial 3 x 2 + 1, com quatro repetições. A terceira fase, relativa ao enraizamento adotou-se o AIB em três doses (0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) e quatro tempos de permanência dos explantes ao efeito desse regulador de crescimento, perfazendo um fatorial 3 x 4 e quatro repetições. Nesse artigo concluiu-se que o meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,6 mg L⁻¹ de BAP promoveu melhores respostas à multiplicação da amburana e para a indução do enraizamento recomenda-se utilizar 2 mg L⁻¹ de AIB. O experimento de diversidade genética baseou-se nos padrões genéticos de 68 acessos de amburana através de análises citométricas e por marcadores moleculares ISSR. Aplicou-se análises multivariadas empregando-se diferentes métodos de agrupamento. O método de otimização empregado (Tocher) foi concordante com todos os modelos hierárquicos utilizados. O acesso BB116 foi o que apresentou padrão genético mais divergente dos demais genótipos e o método de Ligação Média foi o que permitiu a formação de maior quantidade de grupos contendo acessos similares.

Palavras-chave: Germoplasma, Caatinga, cultura de tecidos.

¹Comitê Orientador: José Magno Queiroz Luz- UFU (Orientador) e Simone Abreu Asmar.

ABSTRACT

SILVA, HERICK FERNANDO DE JESUS SILVA. **Genetic diversity, multiplication and *in vitro* conservation of juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.) and amburana (*Amburana cearensis* [Allemão] A. C. Smith).** 2019. 94 p. Thesis (PhD in Agronomy / Phytotechny) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia.

Juazeiro and amburana are native species of the Caatinga and have multiple uses attributed to the food, medicinal, wood and environmental values that these plants have. However, their natural areas are under high anthropization process, which places these species in vulnerable conditions of extinction. The objective of this work was to carry out studies aiming to characterize the genetic divergence of native germplasms, as well as to establish a protocol of multiplication and conservation of the same. The works were conducted at Embrapa Semiárido, Petrolina- PE, and at the Federal Universities of Uberlândia and Lavras. *In vitro* multiplication of the juazeiro was used to induce explants (mini-cuttings) buds using doses of ANA (three doses) and BAP (five doses) - factorial 3 x 5 - and for the rooting two auxins were adopted, ANA and AIB, in four doses each factorial 2 x 4. In the *in vitro* conservation process the osmotic regulators, mannitol and sorbitol were tested, both in two doses, plus the control treatment, which constituted a 2 x 4 + 1 factorial. These seedlings were conserved for 240 days until growth resumption, which lasted 60 days. For the multiplication of the juazeiro the dose of 0,1 mg L⁻¹ of ANA and 1,0 mg L⁻¹ for induction of shoots is indicated, and as best inducer of rooting was obtained AIB. In the preservation process Sorbitol at 5 mg L⁻¹ was more suitable for the *in vitro* conservation of *Z. joazeiro*. In the *in vitro* multiplication of amburana, four culture media - MS, MS/2, WPM and WPM/2 - four doses of BAP and two doses of sucrose were tested, which constituted a 4 x 4 x 2 factorial with six replicates and in DIC. In the second part, the effect of 0,05 and 0,1 mg L⁻¹ doses of auxin AIA, ANA and AIB, plus the control, in a 3 x 2 + 1 factorial arrangement, with four replicates, were studied. The third phase, related to rooting, was the AIB in three doses (0,5, 1,0 and 2,0 mg L⁻¹) and four residence times of the explants to the effect of this growth regulator, making a factorial 3 x 4 and four repetitions. In this paper it was concluded that MS medium with 30 g L⁻¹ of sucrose and 0,6 mg L⁻¹ of BAP promoted better responses to amburana multiplication and for induction of rooting it is recommended to use 2 mg L⁻¹ of AIB. The genetic diversity experiment was based on the genetic patterns of 68 amburana accessions through cytometric analysis and ISSR molecular markers. Multivariate analyzes were applied using different clustering methods. The optimization method employed (Tocher) was consistent with all the hierarchical models used. The BB116 access was the one with the most divergent genetic pattern of the other genotypes and the Medium Binding method allowed the formation of more groups containing similar accessions.

Key words: Germplasm, Caatinga, tissue culture.

¹Advisor Committee: José Magno Queiroz Luz- UFU (Advisor) and Simone Abreu Asmar.

INTRODUÇÃO GERAL

A Caatinga é um bioma exclusivo do Brasil, ocupando cerca de 11% do território nacional e abriga mais de 23 milhões de pessoas. Ocupa uma área de aproximadamente 935 mil km² do território brasileiro (RODAL, SAMPAIO, 2002; MMA, 2009), abrangendo quase por completo os estados do nordeste brasileiro. É composta por uma vegetação xerófila essencialmente heterogênea no que diz a respeito à fitofisionomia e estrutura (BEZERRA, PEREIRA, 2017), com grande diversidade de espécies vegetais de importância comercial, por apresentarem grande potencial medicinal, alimentício, paisagístico e madeireiro.

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2017), esse bioma vem sofrendo pressões antrópicas resultantes do desmatamento, que já atingiu cerca de 46% da área total, atualmente possui pouco mais que 1% de áreas protegidas por unidades de proteção integral. Essa combinação entre ausência de proteção e perda de recursos provoca o desaparecimento de espécies edêmicas desse ambiente (MMA, 2002) e por consequência a perda de variabilidade genética intraespecífica de plantas de grande importância socioeconômica e ambiental.

A Caatinga representa fonte de renda fundamental para a população, visto as atividades econômicas das áreas agrossilvipastoril, industrial, farmacêutica, química e ainda a base alimentar da população carente, principalmente em períodos prolongados de seca (BRASIL, 2011). Porém, evidencia-se que esses recursos vêm passando por um processo de esgotamento das reservas existentes. As ações antrópicas representam um dos principais fatores responsáveis por esse processo, nas quais têm gerado grandes impactos nas paisagens por meio do intenso processo de substituição das áreas naturais por diversos tipos de uso do solo e da fragmentação das áreas com cobertura florestal (MATSUSHITA; XU; FUKUSHIMA, 2006). Além do esgotamento de várias espécies vegetais úteis ao homem, estas juntamente com várias espécies da fauna nem chegam a ser classificadas pelos pesquisadores, tornando as riquezas naturais desse bioma ocultas e inexploráveis pela ciência. Nesse contexto as espécies nativas da Caatinga encontram-se sob alto risco de ameaça, sejam aquelas já conhecidas e ainda aquelas que não foram catalogadas e que têm potenciais de aproveitamentos desconhecidos, fato que

levanta a necessidade de medidas que viabilizem o processo de domesticação desses recursos naturais.

Apesar da existência de leis de proteção à fauna, à flora e ao uso do solo e água, o uso desses recursos naturais às vezes é feito erroneamente, na expectativa de maximizarem seus lucros (PEREIRA, PASQUALETO, 2011). O uso indiscriminado desses recursos é recorrente também em função da escassez de indivíduos no ambiente, o que maximiza a pressão exploratória devido à baixa oferta de produtos. Dentre as espécies que vêm sofrendo com essas ações antrópicas estão o juazeiro e a amburana, espécies nativas de relevante importância socioeconômica e ambiental para o bioma Caatinga e para as pessoas que delas vivem.

Pertencente à família Rhamnaceae, o gênero *Zizyphus* Mill. possui cerca de 100 espécies amplamente distribuídas, sendo *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), conhecida por juazeiro ou laranjeira-do-vaqueiro, o representante mais notável do bioma Caatinga (LORENZI, MATOS, 2002). É uma planta encontrada nos estados do Nordeste, bem como no norte de Minas Gerais, principalmente nas caatingas e campos abertos do polígono da seca. É uma árvore popular entre os nordestinos, consegue manter-se verde durante o período de secas, cresce lentamente e vive mais de 100 anos. Seus frutos (Figura 1B) são fortemente utilizados como alimento para o gado na seca, bem como na alimentação humana (LOPPES, 2008), possuem elevado teor de vitamina C, sendo consumidos tanto *in natura*, como processados (doces e geléias). A árvore (Figura 1A), além de promover sombra e servir de alimento a diversos animais, apresenta qualidades ornamentais, podendo ser utilizada com êxito no paisagismo em geral, especialmente na arborização de ruas e jardins (LORENZI, 1992). Utilizado ainda na medicina popular como expectorante, no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas (LORENZI, 2009). Devido à presença de saponina em várias partes das plantas, as aplicações do juazeiro se estendem a fabricação de xampus, na fabricação de sabão e dentifrícios (LORENZI, MATOS, 2008).



Figura 1. *Zizyphus joazeiro*: Árvore adulta (A) e detalhe da frutificação (B). Uberlândia-MG, 2019.

Fonte: SILVA, 2014.

Mesmo diante de sua grande aplicabilidade, a utilização do juazeiro e de seus frutos é dada basicamente ao extrativismo e são poucos os conhecimentos capazes de intensificar o desenvolvimento tecnológico da cultura (BRITO, OSUÑA, 2005), a começar pela barreira propagativa devido à dormência mecânica das sementes, conferida pelo rígido endocarpo. A emergência das plantas ocorre entre 70-100 dias, e a porcentagem final é geralmente muito baixa (LORENZI, 2000), o que acarreta barreira para a propagação e conservação natural da espécie.

Outra espécie da Caatinga de grande importância é a *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith. De acordo com Lorenzi (2002) é uma árvore pertencente à família Fabaceae, cujo caule é ereto, podendo atingir 10 a 12 metros de altura e tem denominação de amburana, amburana-de-cheiro, cerejeira-rajada, cumarú, cumaru-das-caatingas, imburana e imburana-de-cheiro. A espécie é bastante conhecida devido às suas qualidades madeireiras e por isso tem sido explorada nos locais de ocorrência até a exaustão, para uso em movelaria fina, esculturas e marcenaria em geral, (LORENZI, 2002), estando listada como espécie ameaçada de extinção (IBAMA, 2008). A casca do caule possui diversas substâncias farmacológicas, dentre elas Canuto (2002) menciona a cumarina, isocampferídio, fisetina, alfalona e amburosídio A, as quais estão relacionadas às atividades antinociceptiva, antiinflamatória e relaxante muscular. Dessa forma, é amplamente empregada na medicina popular, sendo a casca da árvore e as sementes utilizadas na produção de medicamentos populares destinadas ao tratamento de afecções pulmonares, tosse, asma, bronquite e coqueluche (LORENZI; MATOS, 2002).

A inclusão das espécies ameaçadas de extinção em programas de conservação é imprescindível para a preservação das mesmas. Dessa forma, a utilização de técnicas que viabilizem a produção de mudas, bem como sua conservação são necessárias para a busca da domesticação e proteção de espécies, que em condições *in situ* estão sujeitas a maiores possibilidades de predação e adversidades abióticas resultantes de intempéries climáticas. Partindo dessa necessidade, Pinhal et al. (2011) apontam a cultura de tecidos vegetais como uma das alternativa mais viáveis, pois apresenta diferentes técnicas que permitem a propagação de espécies com dificuldades de germinação, garantindo a produção de mudas em larga escala e inclusão de espécies em bancos de germoplasma, além de promover o intercâmbio destas. Essas diferentes técnicas por vez relacionam-se com a micropropagação e conservação *in vitro*.

Dentre os métodos de reprodução vegetativa, a micropropagação constitui uma alternativa viável em relação aos métodos clássicos de propagação. A micropropagação se refere a uma técnica de cultura de tecidos, que resulta na produção de grande quantidade de indivíduos, geneticamente idênticos por meio de divisões celulares induzidas por hormônios e fitorreguladores (CARVALHO et al., 2006), podendo ser realizada através da proliferação de gemas axilares, organogênese e embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 2000; CARVALHO et al., 2006). Oferece a grande vantagem de replicação de grande número de indivíduos, em curto espaço de tempo, partindo de um número mínimo de explantes.

A conservação *in vitro*, outra técnica da cultura de tecidos, funciona como alternativa complementar aos métodos convencionais para manutenção de bancos de germoplasma. O método de conservação *in vitro* obtido via meio de cultura para crescimento lento envolve a manutenção de plantas em laboratório sob metabolismo reduzido, mediante subculturas periódicas de segmentos apicais e nodais (SOUZA et al., 2009). A utilização dessa técnica permite aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos sem afetar a viabilidade das culturas, proporcionando redução de custos da mão de obra (MOOSIKAPAL, TE-CHATO, 2010). Dentre as principais estratégias para limitar o crescimento das plantas *in vitro* estão a redução da temperatura e da intensidade luminosa, redução nas concentrações de sais do meio de cultura, omissão de elementos nutritivos e a adição de agentes osmóticos, como manitol, sorbitol e sacarose, além de inibidores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) (SOUZA et al., 2009).

A possibilidade de multiplicar e conservar um material *in vitro* é de grande valia, porém para que um programa de conservação e multiplicação seja executado com um embasamento consistente, é necessária a criação de Bancos de Germoplasma do qual possui como atividades a manutenção dos acessos, a caracterização morfológica, geográfica e molecular permitindo subsidiar pesquisas futuras (NEITZKE et al., 2010; HILL et al., 2013). Essas informações contribuem para traçar prioridades de conservação e multiplicações de maior variabilidade de acessos. Além disso, o uso de genótipos previamente caracterizados possibilita otimizar recursos, além de reduzir o período de execução de programas de melhoramento genético (NEITZKE et al., 2010, FERRÃO et al., 2011, FARIA et al., 2012).

Diante das questões apresentadas, o objetivo geral desse trabalho foi contribuir na busca da proteção de espécies nativas da Caatinga por meio do estabelecimento de protocolos de multiplicação e conservação de germoplasma *in vitro*, bem como a caracterização da divergência genética da *Amburana cearensis*.

REFERÊNCIAS

BEZERRA, C. S., PEREIRA, J. G. Diversidade de vegetação arbórea em uma área de Caatinga no município de Monteiro-PB. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 16, n. 1, Cariri, jun, 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Subsídios para a elaboração do plano de ação para a prevenção e controle do desmatamento na Caatinga**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2011. 128 p.

BRITO, K. L; OSUÑA, J. T. A. Influência de Diferentes Substratos na Germinação de Sementes de *Zizyphus joazeiro* Mart., Rhamnaceae. **Sienbus Série Ciências Biológicas**. v. 5, p. 63-67, 2005.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese Somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35p. (Documentos, 152).

FARIA, P. N.; CECON, P. R.; SILVA, A. R.; FINGER, F. L.; SILVA, F. F.; CRUZ, C. D.; SÁVIO, F. L. Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 428-432, 2012.
<https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000300012>

FERRÃO, L. F. V.; CECON, P. R.; FINGER, F. L.; SILVA, F. F.; PUIATTI, M.. Divergência genética entre genótipos de pimenta com base em caracteres morfo-agrônomicos. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 354-358, 2011.
<https://doi.org/10.1590/S0102-05362011000300016>

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. p. 99-170.

HILL, T. A.; ASHRAFI, H.; REYES-CHIN-WO, S.; YAO, J.; STOFFEL, K.; TRUCO, M. J.; KOZIK, A.; MICHELMORE, R. W.; DEYNZE, A. V. Characterization of *Capsicum annuum* Genetic Diversity and Population Structure Based on Parallel Polymorphism Discovery with a 30K Unigene Pepper Gene Chip. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 1-16, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056200>

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Lista oficial de espécies da Flora brasileira ameaçada de extinção*. Portaria nº. 37-N de 3 de abril de 1992. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 08 ago. 2008.

LOPPES, A. H. Índice terapêutico fitoterápico. Petrópolis: EPUB, 2008. 328p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. v. 1. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. E. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed., v.1. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2009.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3.ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, v. 1. 351p. 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, 512 p. 2002.

MATSUSHITA, B.; XU, M.; FUKUSHIMA, T. Characterizing the changes in landscape structure in the Lake Kasumigaura, Japan using a high-quality GIS dataset. **Landscape and Urban Planning**, v. 78, p.241-250, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2005.08.003>

MMA. 2002. Biodiversidade Brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília.

Ministério do Meio Ambiente. Biomas: Caatinga.

<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga> (acesso em 15 ago. 2017).

MMA- Ministério do Meio Ambiente. Brazilian forests at a glance: reference period: 2005 – 2009. Brasília: MMA, 2009.

MOOSIKAPALA L; TE-CHATO S. Application of in vitro conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**. V. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

NEITZKE, R. S.; BARBIERI, R. L.; RODRIGUES, W. F.; CORRÊA, I. V.; CARVALHO, F. I. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1. p. 47-53, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000100009>

PEREIRA, M. E.; PASQUALETO, A. Desenvolvimento sustentável com ênfase em frutíferas do Cerrado. **Studos**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 333-363, 2011.

PINHAL, H. F. **Estabelecimento *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alaata* Vog.)**. 54 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A vegetação do bioma caatinga**. En: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (org.) **Vegetação e Flora da Caatinga**.9-40. APNE/ CNIP. Recife, 2002.

SILVA, J. B. **Caracterização físico-química do fruto do juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart) e avaliação da sua conservação por fermentação láctica**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

SOUZA, A. S.; DUARTE, F. V.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P.; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, V. S.; MORAIS, L. S. Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedade de mandioca. **EMBRAPA**: Cruz das Almas. 24p. (Circular Técnica 90), 2009.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1: MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE JUAZEIRO

(*Zizyphus joazeiro* Mart.)

RESUMO

O juazeiro é uma planta importante para o semiárido do Nordeste, dada as suas múltiplas aplicações. No entanto a dormência das sementes junto à pressão antrópica coloca a espécie sob situação de risco. O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de multiplicação e enraizamento *in vitro* para o juazeiro. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG e instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). O primeiro experimento buscou induzir brotações dos explantes e foi composto por três doses de ANA e cinco doses de BAP, constituindo um fatorial 3 x 5. No segundo experimento foram testados dois indutores de enraizamento, ANA e AIB, quatro doses cada, perfazendo um fatorial 2 x 4. Após 40 dias das instalações foram avaliados: número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa fresca, massa seca e índice SPAD das plantas. Através dos resultados concluiu-se que as doses de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 1,0 mg L⁻¹ de BAP mostram-se como as mais adequadas no processo de indução de brotações de *Z. joazeiro* e para a indução do enraizamento, o AIB mostrou-se como a auxina mais apropriada nessa fase.

Palavras chave: Micropropagação, cultura de tecidos, Caatinga, espécie nativa.

ABSTRACT

Juazeiro is a important plant for the semi-arid of the Northeast, given its multiple applications. However, seed dormancy along with anthropic pressure puts the species at risk. The objective of this work was to establish an *in vitro* multiplication and rooting protocol for juazeiro. The experiments were conducted at the Biotechnology Laboratory of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia-MG and assembled in a completely randomized design (DIC). The first experiment sought to induce sprouts of the explants and was composed of three doses of ANA and five doses of BAP, constituting a factorial 3 x 5. In the second experiment two rooting inducers, ANA and AIB, were tested, four doses each, factorial 2 x 4. After 40 days of installations were evaluated: leaf number, shoot length, root number, root length, fresh mass, dry mass and SPAD

index of the seedlings. From the results it was concluded that the doses of 0,1 mg L⁻¹ of ANA and 1,0 mg L⁻¹ of BAP are shown to be the most adequate in the process of induction of *Z. joazeiro* shoots, and for the rooting induction, AIB was the most appropriate auxin in this phase.

Key words: Micropropagation, tissue culture, Caatinga, native species.

INTRODUÇÃO

O juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.) é uma planta muito importante para o semiárido da região Nordeste. Seus frutos são comestíveis e ricos em vitamina C, constituindo fonte de alimentação humana e para os animais na época de escassez de chuvas. A madeira é empregada em construções rurais, lenha e carvão. A árvore pode alcançar até 10 m de altura, possui copa grande, proporcionando boa sombra, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo e arborização de ruas e jardins. Suas sementes apresentam dormência devido à alta resistência do endocarpo e a porcentagem final de emergência é geralmente muito baixa (LORENZI, 2002; LORENZI, 2000; MENDES, 1996).

Através da notória importância socioeconômica do juazeiro torna-se necessário desenvolver técnicas que viabilizem o processo de produção de mudas, uma vez que estas informações ainda são incipientes. A micropropagação além de disponibilizar maior quantidade de indivíduos em curto período de tempo, permite o controle das condições ambientais durante a propagação e a preservação de plantas matrizes sem riscos de infecção por microrganismos (BARBOZA, CALDAS, 2001). No entanto, se necessário, deve-se estabelecer um protocolo que melhor se adeque às exigências da espécie, principalmente no que diz respeito ao meio de cultura utilizado, bem como aditivos fundamentais, como os reguladores de vegetais.

As citocininas e as auxinas estão entre as classes de reguladores vegetais mais difundidos na cultura de tecidos. Entre as citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, apresenta melhores resultados. As auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB), na indução de raízes *in vitro* e ácido naftalenoacético (ANA), utilizado na fase de alongamento e também no enraizamento (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1999), processos esses cruciais para fornecer condições fisiológicas aos explantes no processo de aclimatização. De acordo com

Hartmann e Kester (2001) a diferença entre essas duas auxinas está basicamente na parte estrutural da molécula e na estabilidade em meios de cultivo.

Um importante fator no processo de micropropagação de espécies lenhosas é a rizogênese, ou seja, o desenvolvimento de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, possibilitando o transplante para o ambiente *ex vitro* (SOUZA, PEREIRA, 2007). O enraizamento é uma das fases mais difíceis da micropropagação, sendo influenciada pelo meio de cultura, auxinas e suas concentrações (LEITZKE et al. 2009). Para Costa et al. (2008) esta etapa é fundamental, pois a obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme é requisito básico para alcançar elevadas taxas de sobrevivência na fase da aclimatização.

Considerando a inexistência de estudos relacionados à micropropagação do juazeiro, objetivou-se com este trabalho, estabelecer um protocolo de multiplicação e enraizamento de explantes da espécie cultivados *in vitro*, por meio da indução de brotações e raízes adventícias.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, durante o período de janeiro de 2017 a maio de 2018. As sementes beneficiadas utilizadas para o estabelecimento *in vitro*, foram adquiridas do Laboratório de Sementes da Embrapa Semiárido- Pretolína/PE.

A obtenção das plantas para os experimentos foi feita utilizando-se sementes de juazeiro semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato comercial Bioplant[®], no qual foram irrigadas diariamente, em casa de vegetação. A emergência das plantas ocorreu 20 dias após a semeadura e depois de 40 dias de desenvolvimento as plantas já estavam aptas para o fornecimento de explantes.

Para a obtenção dos explantes somente as partes aéreas das plantas foram retiradas com o auxílio de uma tesoura e imediatamente imergidas em solução de polivinilpirrolidona (PVP) a 1%. Em laboratório foram retiradas as folhas e em seguida iniciou-se o processo de assepsia com a lavagem desse material em água corrente por dois minutos. Posteriormente as estacas foram imersas em solução de álcool etílico 70% v/v por dois minutos e na sequência transferidas para solução de hipoclorito de sódio a 2% i.a., acrescida de duas gotas de Tween[®], sob agitação constante por 20 minutos. Em

câmara de fluxo laminar as estacas passaram por um processo de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Para os experimentos foram utilizados explantes de aproximadamente dois centímetros de comprimento, contendo dois segmentos nodais.

Os explantes foram colocados em frascos com capacidade para 200 mL. Cada recipiente recebeu 40 mL de meio MS a 50% da concentração de sais, acrescido de 3% de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado, 6,5 g L⁻¹ de ágar e o pH aferido para 5,7. Os frascos contendo os meios foram vedados com tampas plásticas e em seguida autoclavados a uma temperatura de 121°C durante 20 minutos um dia antes das montagens dos experimentos. Os delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) e os experimentos diferiram quanto aos tipos de reguladores de crescimento adicionados no meio padrão.

Experimento 1 - Indução de brotações- balanço de ANA e BAP: Para este experimento os tratamentos foram constituídos pela combinação de dois reguladores de vegetais: ANA, nas concentrações de 0,0, 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ e BAP nas doses de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹, compondo um fatorial 3 x 5 (três doses de ANA e cinco doses de BAP), com 15 tratamentos, duas repetições e seis explantes por parcela distribuídos em três frascos.

Experimento 2- Indução de enraizamento- ANA e AIB: Para induzir o enraizamento dos explantes utilizou-se duas auxinas, ANA e AIB em quatro concentrações: 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg L⁻¹, constituindo um fatorial 2 x 4 com oito tratamentos, quatro repetições e cinco frascos por parcela.

Após a colocação dos explantes nos frascos, estes foram acondicionados por 40 dias em sala de crescimento mantida em temperatura de 25 °C ± 1°C e com fotoperíodo de 16 horas/dia, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias com intensidade luminosa de 25 μmol m⁻² s⁻¹.

Após esse período realizaram-se as avaliações dos experimentos e foram coletados os dados referentes às características: número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), massa fresca (MF), massa seca (MS) e índice SPAD (IS) das plantas.

O número de folhas e raízes foram obtidos através da contagem visual. Para mensurar o CPA e o CR utilizou-se uma régua milimétrica. A leitura do índice spad foi realizada em folhas completamente expandidas e verdes com o auxílio do medidor de

clorofila portátil *SPAD-502-PLUS*, marca Konica Minolta ®. Já as massas fresca e seca foram obtidas com o uso de uma balança de precisão, sendo que para mensurar a massa seca as amostras permaneceram em estufa com circulação forçada de ar a 70°C até atingirem peso constante.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância através do programa computacional Sistema para Análise de Variância (SISVAR) (FERREIRA, 2000), as médias qualitativas comparadas pelo teste de Tukey e os dados quantitativos submetidos à análise de regressão, ambos ao nível de 5% de probabilidade de erro. Antes disso a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias, com os testes de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,01$) e Levene ($\alpha = 0,01$) foram testadas através do programa computacional SPSS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Indução de brotações- balanço de ANA e BAP

Os resultados obtidos apontaram que não houve interação significativa dos fatores estudados para nenhuma das características avaliadas. Para a massa fresca (MF) somente as doses de ANA influenciaram, já as doses de BAP exerceram efeito sob o comprimento da parte aérea (CPA) e no índice SPAD (ISP). Porém, para essa última característica os dados não se ajustaram a nenhum modelo polinomial (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo da análise de variância das características número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de brotos (NB), índice spad (ISP), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob três doses de ácido naftalenoacético (ANA) e cinco doses de belzilaminopurina (BAP). Uberlândia-MG, 2019.

FV	GL	NF	CPA	NB	ISP	MF	MS
ANA	2	0,08 ^{ns}	0,65 ^{ns}	2,04 ^{ns}	1,67 ^{ns}	5,60 [*]	0,97 ^{ns}
BAP	4	1,84 ^{ns}	2,98 [*]	2,56 ^{ns}	5,56 [*]	2,64 ^{ns}	0,74 ^{ns}
ANAxBAP	8	1,28 ^{ns}	1,09 ^{ns}	0,69 ^{ns}	1,95 ^{ns}	2,01 ^{ns}	0,72 ^{ns}
CV (%)		39,31	11,18	20,52	22,23	20,78	84,55
Média Geral		3,82	2,74	1,24	15,59	0,56	0,19

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Assim como para o número de folhas (NF) e massa seca (MS), o número de brotos (NB) não apresentou diferença entre os tratamentos com e sem os reguladores vegetais avaliados, indicando que não há necessidade de uma fonte exógena dessas substâncias para a formação dessas estruturas vegetativas dentro do intervalo de concentrações testadas. Resultados similares foram reportados também em *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008), *Albixia niopoides* (ROSSI, SARTORETTO, 2013) e em *Cordia trichotoma* (MANTOVANI et al., 2001), onde a presença desses estimulantes não trouxe desenvolvimento adicional aos explantes. Porém, vale ressaltar que a utilização de doses superiores ou mesmo outro tipos de reguladores pode promover incrementos significativos dessas estruturas, tornando interessante estudar essas condições.

As respostas para massa fresca evidenciaram bem o efeito do ANA sobre o acúmulo de biomassa das plantas. Esse resultado foi bem evidente na comparação entre tratamentos acrescidos de 0,10 mg L⁻¹ desse regulador com os tratamentos sem essa auxina (Figura 1). Esse comportamento comprova a importância das auxinas em processos de regeneração, devido à capacidade marcante de indução de divisão celular em tecidos vegetais.

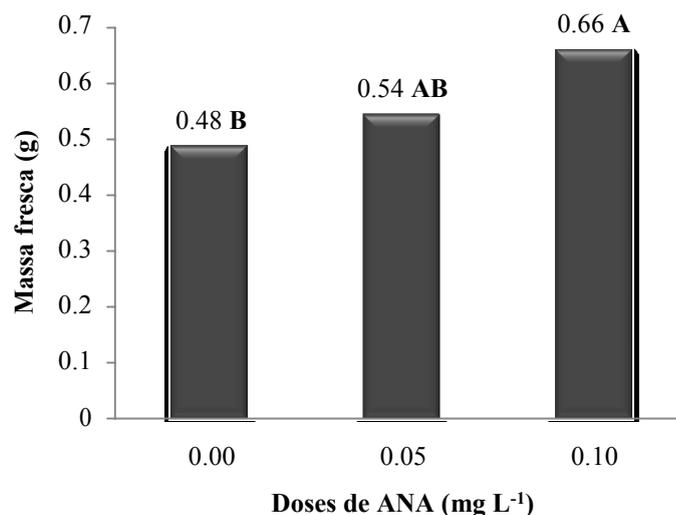


FIGURA 1. Massa fresca de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de ácido naftalenoacético (ANA). Uberlândia- MG, 2019.

W= 0,98¹ F= 2,70¹

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. ¹W, F: estatísticas dos teste de Shapiro Wilk e Levene; valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente.

O comprimento da parte aérea, influenciado somente pelo BAP apresentou comportamento quadrático, ou seja, houve um incremento máximo de 2.95 cm utilizando-se a dose de 1,0 mg L⁻¹. Concentrações superiores de BAP passaram a ser desfavoráveis ao incremento dessa característica (Figura 2). Esses efeitos foram registrados também em trabalhos de cultivo *in vitro* com amburana (*Amburana cearensis*) (CAMPOS et al., 2013), malva (*Malva sylvestris*) (FILTER et al., 2014) e cerejeira (*Amburana acreana*) (FERMINO JUNIOR, SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012). Para Xavier et al. (2003) as citocininas estimulam o desenvolvimento da parte aérea até determinada concentração, variando de acordo com cada espécie, concentrações hormonais acima do necessário passam a induzir respostas negativas. Essa afirmação ainda é reforçada por Grattapaglia e Machado (1998), quando afirmaram que a fitotoxicidade promovida pelo excesso de citocininas ainda acarreta encurtamento de entrenós de plantas propagadas *in vitro*.

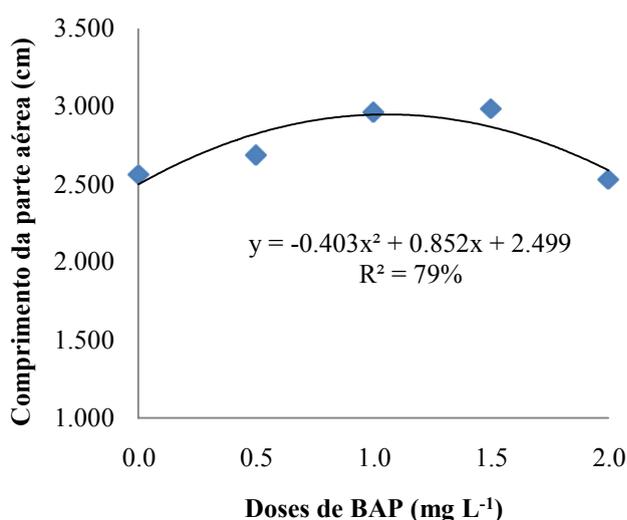


FIGURA 2. Comprimento da parte aérea de plântas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de 6-benzilaminopurina (BAP). Uberlândia- MG, 2019. W= **0,98**¹ F= **1,57**¹

¹W, F: estatísticas dos teste de Shapiro Wilk e Levene; valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente.

Filter et al. (2014) preconizaram que a conjugação de hormônios nem sempre é favorável para as espécies. Esta afirmação foi constatada nesse experimento, onde os efeitos dos mesmos se deram de maneira isolada. Respostas como estas foram reportadas também em *Ocimum basilicum* (REBOUÇAS et al., 2009) e *Matricaria recutita* (TAVANO et al., 2009). Para Pozo et al. (2005), o efeito fisiológico desses reguladores irá depender das concentrações de cada um no meio de cultura, além que cada parte da planta apresenta uma resposta diferente às alterações nas concentrações de auxinas e citocininas. Essa observação ressalta que em micropropagação estudos acerca do tipo de explantes são justificáveis e necessários para melhor compreensão do funcionamento biológico vegetal.

Experimento 2- Indução de enraizamento- ANA e AIB

Os valores encontrados nesse experimento resultaram em efeitos isolados somente dos reguladores vegetais para as características número de folhas, comprimento da maior raiz, massa fresca e massa seca. Já a interação significativa dos fatores estudados foi detectada somente no comprimento da parte aérea. Quanto ao número de folhas e o índice SPAD o tipo de regulador vegetal adotado bem como as doses exerceram nenhum efeito sobre essas características (Tabela 2).

TABELA 2. Resumo da análise de variância das características número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), massa fresca (MF), massa seca (MS) e índice SPAD (IS) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes reguladores de crescimento e quatro doses. Uberlândia-MG, 2019.

FV	GL	NF	CPA	NR	CR	MF	MS	IS
Regulador	1	0,405 ^{ns}	3,43 ^{ns}	12,44*	15,68*	7,82*	6,01*	0,01 ^{ns}
Dose	3	1,251 ^{ns}	4,30*	1,69 ^{ns}	2,38 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,52 ^{ns}	1,01 ^{ns}
Reg. x Dos.	3	0,197 ^{ns}	3,92*	2,88 ^{ns}	1,85 ^{ns}	1,77 ^{ns}	0,95 ^{ns}	1,88 ^{ns}
CV (%)		36,23	7,65	27,77	22,64	28,70	26,46	22,67
Média Geral		26,10	7,98	3,95	2,55	1,72	0,59	17,92

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Os reguladores testados diferiram entre si somente quando utilizada a menor concentração (1,0 mg L⁻¹). Nessa condição o ANA proporcionou menor incremento da parte aérea das plantas (Tabela 3). De Klerk et al. (1997) salientaram que cada tipo de auxina tem velocidade diferente de absorção, o que determina concentrações variáveis destas substâncias no interior das células, para uma mesma concentração no meio de cultura, fato que permite um melhor entendimento da diferença de efeitos desses reguladores sob menores ou maiores doses.

TABELA 3. Comprimento da parte aérea de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas em meios de cultura acrescidos de diferentes doses de ácido naftalenoacético (ANA) ou ácido indolacético (AIB). Uberlândia-MG, 2019.

Dose (mg L ⁻¹)	Comprimento da parte aérea (cm)	
	ANA	AIB
1,0	7,60 b	9,36 a
2,0	8,23 a	7,60 a
3,0	8,03 a	8,46 a
4,0	7,15 a	7,43 a
W ¹	0,94	
F ¹	4,01	
CV (%)	7,75	

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. ¹W, F: estatísticas dos teste de Shapiro Wilk e Levene; valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente.

A obtenção de um modelo polinomial de regressão para explicar o efeito das doses só foi possível quando se utilizou o ANA (Figura 3). Para se observar a ação do AIB sob o enraizamento das plantas nenhum modelo se ajustou às equações disponíveis, por isso não foi representado. Nas condições deste trabalho a obtenção máxima de comprimento da parte aérea foi de 8,22 cm sob ação de 2,29 mg L⁻¹ de ANA. Doses superiores mostraram ser prejudiciais ao desenvolvimento da parte aérea das plantas. Segundo De Klerk et al. (1997), a indução das raízes adventícias ocorre nos primeiros cinco dias após a transferência para o meio de enraizamento, tempo bastante inferior ao desse trabalho. Assim, após este período, a presença de auxinas, no meio, afetaria somente o crescimento das raízes já formadas, para o qual são necessárias concentrações mais baixas (SALISBURY, ROOS, 1991), o que torna possível entender

porque doses acima de 2,29 desse regulador passaram a ser prejudiciais às plantas, comprometendo o desenvolvimento da parte aérea. Em outra explicação, Cid (2014) relatou que as auxinas, em geral, têm a propriedade de induzir síntese de etileno em muitas espécies quando cultivadas *in vitro*, o que acarreta comprometimento da organogênese até a oxidação de tecidos. Essa afirmação condiz com os efeitos notados nas plantas, que apresentaram sintomas típicos nos tratamentos providos com maiores doses de ANA.

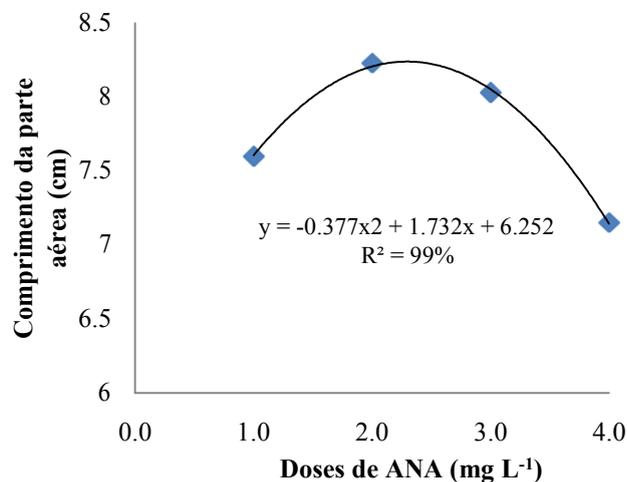


FIGURA 3. Comprimento da parte aérea de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de ácido naftalenoacético (ANA). Uberlândia- MG, 2019.

Independente das doses testadas para ambos os reguladores vegetais, observou-se que o AIB promoveu melhores condições no enraizamento de *Z. joazeiro*, constatado pelo maior número e comprimento de raízes das plantas submetidas a ação dessa auxina. Por vez, esses efeitos repercutiram no ganho das massas fresca e seca, demonstrando a importância de que um sistema radicular bem desenvolvido favorece melhor incremento de outras estruturas vegetativas (Figura 4). Melo et al. (2001) afirmam que a utilização do AIB para o enraizamento de plantas lenhosas *in vitro* é amplamente aplicado devido a sua maior eficiência em diferentes espécies, além de oferecer menor fitotoxicidez. Salisbury e Ross (2006) ainda explicam que em relação às demais auxinas, o AIB é rapidamente metabolizado, especialmente nas fases finais de formação das raízes, fato que confirma com as respostas obtidas para as características

avaliadas nesse trabalho. Resultados positivos nesse âmbito com o uso de AIB foram reportados também em macieira (RADMANN et al., 2002) e marmeleiro (ERIG, SCHUCH, 2004).

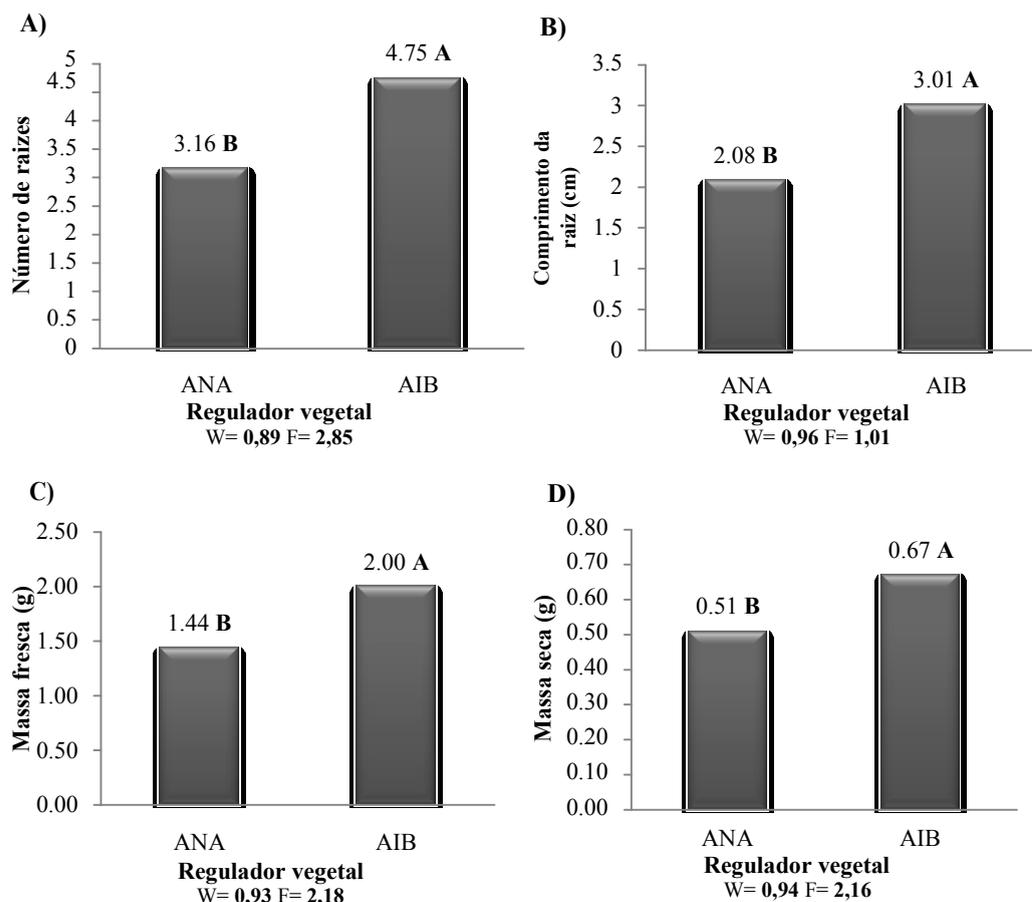


FIGURA 4. Número de raízes (A), comprimento da maior raiz (B), massa fresca (C) e massa seca (D) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) cultivadas em meios de cultura acrescidos com ácido naftalenoacético (ANA) ou ácido indolacético (AIB). Uberlândia- MG, 2019.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. W, F: estatísticas dos testes de Shapiro Wilk e Levene; valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente.

CONCLUSÕES

A dose de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 1,0 mg L⁻¹ de BAP mostraram-se como as mais adequadas no processo de indução de brotações de *Z. joazeiro*.

Para a indução de enraizamento do juazeiro o AIB é a auxina mais apropriada. Entretanto, torna-se necessário testar outras doses no intuito de se definir a concentração que melhor atenda as condições fisiológicas dessa espécie.

REFERÊNCIAS

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PExSC – 52. Revista **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.3, p.417-423, 2001.

<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000300004>

CAMPOS, V. C. A.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, A. V. V. 2013. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 639–644, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000018>

CID, P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: EMBRAPA, 2014. 3. ed. 325 p.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Relação entre tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 031-037, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000100008>

DE KLERK, G. J.; JOLANDA, T. B.; SVETLA, M. Effectiveness of indoleacetic acid, indolbutyric acid and naphthaleneacetic acid, during adventitious root formation *in vitro* in *Malus Jork 9*. **Plant Cell**, Rockville, v.49, 39-44, 1997.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. *In vitro* rooting of quince cv. MC as rootstock for pear and acclimatization of the rooted microcuttings. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.5, p.1443- 1449, 2004.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000500018>

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana cearensis* (Ducke) A. C. Smith-FABACEAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

<https://doi.org/10.5902/198050985074>

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (sistema para análise de variância) para Windows: versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais**. São Carlos: Universidade de São Carlos, 2000. p. 255-258.

FILTER, M.; FREITAS, E. M.; PÉRICO, E. Influência de diferentes concentrações dos fitorreguladores ácido 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na propagação vegetativa de *Malva sylvestris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 47-53, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000100007>

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, v.1 p.183-260. 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, v. 2, p.533-568. 1999.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagación de plantas: principios y prácticas**. 8ª reimpressão. Compañía Editorial Continental. México, D. F. 300 p. 2001.

LEITZKE, N. L.; DAMIANI, R. C.; SCHUCH, W. M. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v. 31, p. 582-587, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000200037>

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 369 p., 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1. 351p. 2000.

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

<https://doi.org/10.5902/198050981658>

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C.. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**. v. 17, n.1, p. 49-59, 2001.

MENDES, B. V. **Juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.)**: símbolo da resistência das planatas das caatingas. Mossoró: Fundação Vingt-Um Rosado/ETFERN-UNED, 1996, 24 p. (Coleção Mossoroense, 168).

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde**, Mossoró, v. 3, n. 2, p. 20-26, 2008.

POZO, J. C. D. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, v. 123, p.173-83, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00420.x>

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira „M-9“. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000300011>

REBOUÇAS, F. S. **Cultivo *in vitro* de Plantas Medicinais: *Ocimum basilium* L. e *Cissus sycoides* L.** 2009. 61p. Dissertação (Mestrado – Área de Fitotecnia) - Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

ROSSE, E.; SARTORETTO, L. M. Propagação *in vitro* de farinha-seca. **Pesquisa Florestal Brasileira**. v. 33, n. 73, p. 45-52, 2013.

<https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.73.361>

SALISBURY, F.; ROSS, C. Fisiología de las plantas - **Desarrollo de las Plantas y Fisiología Ambiental**. Madrid, Thomson Edited Spain Paraninfo, v. 3, 460p, 2006.

SALISBURY, F. B.; ROOS, C. W. **Plant Physiology**. Wadsworth, California: 1991. Cap., p.357-378.

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

TAVANO, E. C. Conteúdos de compostos fenólicos e flavonóides em plantas de camomila (*Matricaria recutita* L. Asteraceae) cultivadas *in vivo* e *in vitro*. **Naturalia**, v.32, p.67-77, 2009.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Árvore**, v.27, p.351-356, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0100-67622003000300011>

ARTIGO 2: CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE JUAZEIRO (*Zizyphus joazeiro* Mart.) POR MEIO DE CRESCIMENTO MÍNIMO

RESUMO

O *Zizyphus joazeiro*, espécie arbórea, nativa da Caatinga, apresenta múltiplos usos e está sujeita à extinção, visto que o ambiente natural que está inserida vem sofrendo significativas pressões antrópicas. O objetivo desse trabalho foi determinar um protocolo de conservação *in vitro* para *Z. joazeiro* via crescimento mínimo. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG. Mini estacas foram colocadas em meio MS contendo manitol ou sorbitol em doses de 5 ou 10 mg L⁻¹, perfazendo um fatorial 2 x 2 + 1 (testemunha). Para a retomada de crescimento utilizou-se meio MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e ANA. Foram avaliadas a taxa de mortalidade, número de brotos, número de folhas senescentes, número de folhas vivas, comprimento da parte aérea, índice SPAD, massa seca e fresca. Ao final de 240 dias de conservação os agentes osmóticos promoveram retardo do desenvolvimento das plantas em comparação a testemunha, sendo que a taxa de mortalidade crítica foi próxima a 70%. Depois de 60 dias em meio de crescimento houve uma sobrevivência de 100% dos explantes reinoculados. O sorbitol a 5 mg L⁻¹ mostrou-se mais adequado à conservação *in vitro* de *Z. joazeiro*.

Palavras chave: Manitol, sorbitol, Caatinga, agentes osmóticos.

ABSTRACT

The *Zizyphus joazeiro*, , an arboreal species, native to the Caatinga, presents multiple uses and is subject to extinction, since the natural environment that is inserted has undergone significant anthropic pressures. The objective of this work was to determine an *in vitro* conservation protocol for *Z. joazeiro* via minimal growth. The research was developed at the Biotechnology Laboratory of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia-MG. Mini cuttings were inoculated in MS medium containing mannitol or sorbitol in doses of 5 or 10 mg L⁻¹, making a factorial 2 x 2 + 1 (control). For the resumption of growth MS medium plus 1,0 mg L⁻¹ of BAP and ANA was used. Mortality rate, number of shoots, number of senescent leaves, number of live leaves, shoot length, SPAD index, dry and fresh mass were evaluated. At the end of 240 days of conservation, the osmotic agents promoted a delay in the development of the plants in comparison to the control, and the critical mortality rate was close to 70%. After 60 days in growth medium there was a survival of 100% of the reinoculated explants. Sorbitol at 5 mg L⁻¹ was more suitable for the *in vitro* conservation of *Z. joazeiro*.

Key words: Mannitol, sorbitol, Caatinga, osmotic agents.

INTRODUÇÃO

A composição vegetal da Caatinga é representada por cerca de 5000 espécies, com expressivo número de espécies endêmicas (em torno de 380) (SIQUEIRA FILHO, 2012). Entretanto, apesar do reconhecimento científico das suas potencialidades e importância para a biodiversidade, ainda permanecem sem a atenção devida por parte de programas eficientes que visem a sua conservação e valorização como recurso natural junto à população. O *Zizyphus joazeiro*, espécie arbórea popularmente conhecida como juazeiro, juá, juá-babão, é uma das espécies nessa condição e até hoje pouco estudada (MONIZ, 2002).

Em função da crescente ocupação de áreas de vegetação nativa e da sensível erosão genética observada para várias espécies de plantas que apresentam potencial de utilização alimentícia ou medicinal, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de conservação de germoplasma dessas espécies, de forma que elas estejam disponíveis para utilização futura (SÁ et al., 2001).

A conservação do juazeiro tem sido restringida ao avanço desordenado de atividades antrópicas, o que vem a tornar técnicas de conservação *in situ* sujeitas a pressões do ambiente. Dessa maneira, técnicas *in vitro*, como a cultura de tecidos, representam alternativas interessantes e viáveis na contribuição da manutenção da diversidade genética da espécie.

O crescimento mínimo pode ser aplicado na cultura de tecidos a fim de restringir do crescimento *in vitro* do vegetal, o que torna essa técnica vantajosa por aumentar o período entre os subcultivos, reduzir os custos com a manutenção do banco ativo de germoplasma e, principalmente, minimizar os riscos de alteração genética e contaminação (ENGELMANN, 1991; VILLALOBOS et al., 1991; LEMOS et al., 2002). Os agentes osmóticos como o manitol e o sorbitol agem sobre o crescimento reduzindo o potencial hídrico do meio de cultura e conseqüentemente inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante (CALDAS et al., 1998; ENGELMANN, 1991; LÉDO et al., 2007), o que torna esses carboidratos opções empregadas de modo significativo em trabalhos envolvendo crescimento mínimo de plantas.

A retomada de crescimento é um processo essencial em trabalhos de conservação de plantas, nesse âmbito os reguladores vegetais desempenham papel fundamental nessa fase. As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular, já as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical, sendo que o balanço entre esses dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos (PASQUAL, 2001), o que os tornam amplamente utilizados na micropropagação, especialmente em processos de retomada de crescimento.

Em função do exposto, o objetivo dessa pesquisa estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* para o *Zizyphus joazeiro* por meio dos agentes osmóticos manitol e sorbitol.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia pertencente ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia no ano de 2017, entre os meses de fevereiro a outubro de 2018.

Para a obtenção dos explantes foram utilizadas sementes de juazeiro adquiridas do Banco de Sementes da Embrapa Semiárido, situado em Petrolina-PE. Em casa de vegetação esses propágulos foram semeados em bandejas de poliestireno contendo substrato comercial Bioplant[®], nas quais foram irrigadas diariamente. A emergência das plantas iniciou-se 20 dias após a semeadura e depois de 40 dias de desenvolvimento as plantas já estavam aptas para o fornecimento de explantes. Com o auxílio de uma tesoura, as partes aéreas das plantas foram retiradas e levadas para laboratório imersas em solução de polivinilpirrolidona (PVP) a 1%. Em seguida retiraram-se as folhas aderidas as estacas e estas foram colocadas em solução de álcool etílico 70% v/v por dois minutos e na sequência transferidas para solução de hipoclorito de sódio a 2% i.a., acrescida de duas gotas de Tween[®], sob agitação constante por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar esse material passou por uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, para retirada do excesso de agente desinfestante. Para os experimentos utilizaram-se explantes de aproximadamente quatro centímetros de comprimento, contendo cada quatro segmentos nodais.

Foram utilizados frascos com capacidade de 200 mL, sendo que cada um recebeu 40 mL de meio MS a 50% das concentrações de sais, acrescido de 1,5 % de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado, 6,5 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,7. Os frascos contendo os meios foram vedados com tampas plásticas e em seguida autoclavados a uma temperatura de 121°C durante 20 minutos um dia antes da inoculação.

Em cada recipiente foram colocados dois explantes e posteriormente acondicionados em sala de crescimento mantida em temperatura de 25 °C ± 1°C e com fotoperíodo de 16 horas/dia, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias que proporcionavam uma intensidade luminosa 25 μmol m⁻² s⁻¹.

Primeira fase: crescimento mínimo via agentes osmóticos

O intuito dessa etapa foi conservar os explantes *in vitro* retardando o metabolismo celular. Para isso, os tratamentos consistiram de dois agentes osmóticos (manitol e sorbitol) em duas concentrações (5 e 10 g L⁻¹), mais a testemunha (ausência de agente osmótico). Dessa forma, o trabalho foi constituído de um fatorial 2 x 2 + 1, com cinco repetições e oito frascos (dois explantes em cada) por parcela, em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

O tempo para a avaliação final dessa fase não foi pré estabelecido. A retomada do crescimento ocorreu assim que se iniciou aumento significativo da taxa de mortalidade dos explantes. Para isso, a cada 40 dias dados de mortalidade foram coletados a fim de monitorar até quando esse material poderia ser conservado.

Antes de se retomar o crescimento foram feitas avaliações não destrutivas das seguintes características: número de folhas vivas e senescentes, número de brotos e taxa de mortalidade final.

Segunda fase: Retomada do crescimento

Nessa etapa as plantas do experimento anterior foram transferidas para meio de cultura acrescido de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético), ambos a 1 mg L^{-1} . As identificações dos tratamentos e a estrutura do delineamento experimental foi a mesma da fase anterior, entretanto, adotou-se quatro frascos por parcela com uma planta em cada.

Após 60 dias da instalação desse experimento as seguintes características foram avaliadas: número de folhas e de raízes, comprimento da parte aérea e da raiz principal, índice SPAD, massas seca e fresca e a porcentagem de mortalidade. O índice SPAD foi mensurado através do medidor de clorofila portátil *SPAD-502-PLUS*, marca Konica Minolta®.

Para a realização das análises estatísticas os dados foram submetidos à análise de variância através do programa computacional ASSISTAT (SILVA, AZEVEDO, 2016) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Dunnett ao nível de 5% de probabilidade de erro. Antes disso, a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram testadas com os testes de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,01$) e Levene ($\alpha = 0,01$), por meio do programa computacional SPSS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeira fase: crescimento mínimo via agentes osmóticos

O presente estudo demonstrou os efeitos retardantes esperados dos agentes osmóticos. Todas as características, majoritariamente apresentaram desenvolvimento inferior em comparação a testemunha, visto que as maiores médias das características relacionadas à senescência (taxa de mortalidade e número de folhas senescentes) foram registradas nos tratamentos acrescidos de manitol (MAN) ou sorbitol (SOR). Já a comparação somente entre os tratamentos com esses carboidratos, só diferiram para as características número de folhas senescentes e taxa de mortalidade (Tabela 1).

TABELA 1. Número de brotos (NB), número de folhas senescentes (NFS), número de folhas vivas (NFV) e taxa de mortalidade final (TM) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) conservadas *in vitro* na presença ou na ausência de duas doses de agentes osmóticos. Uberlândia- MG, 2019.

Agente osmótico (g L ⁻¹)	NB		NFS		NFV		TM (%)	
	5	10	5	10	5	10	5	10
MAN	1,36*	0,66*	2,36	3,36*	2,60*	2,10*	33,12 aA *	71,54 bB *
SOR	0,80*	0,93*	1,29	2,43	3,42*	1,58*	23,38 aA *	44,06 aB *
Média	1,08	0,79	1,82 A	2,89 B	3,01	1,84	28,25	57,80
TESTEMUNHA	2,37		1,52		16,81		14,46	
DMS	0,95		1,83		4,57		2,92	
W ¹	0,96		0,98		0,95		0,61	
F ¹	3,77		3,00		5,01		8,86	
CV%	46,0		50,03		51,0		4,68	

* Diferente pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância; DMS: Diferença média significativa para o teste de Dunnett; Médias seguidas por letras distintas minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. ¹W, F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene; valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente.

Com relação às características número de brotos e número de folhas vivas, estas não tiveram influências dos osmorreguladores e nem das doses utilizadas. Tratamentos acrescidos de manitol ou sorbitol diferiram apenas da testemunha. De acordo com Larcher (2000) é importante ressaltar que alterações nas fases de crescimento, como a produção de brotos e emissão de folhas, são estratégias utilizadas pelos vegetais como mecanismos para o escape à seca. Essa informação permite inferir que, devido o juazeiro ser uma espécie nativa da Caatinga é uma planta adaptada a condições de estresse abiótico. Dessa forma, situações de estresse hídrico *in vitro* provocadas por esses carboidratos podem ter simulado um comportamento natural adotado pela espécie em condições de adversidades naturais.

O número médio de folhas senescentes não foi alterado pelo tipo de agente osmótico utilizado. Entretanto, o fator dose exerceu maior influência sob essa característica, apontando que o manitol ou o sorbitol em concentrações mais elevadas promoveram maior retardo desse órgão.

O juazeiro mostrou-se sensível a ação dos agentes osmóticos. Para ambos, a maior dose (10 g L⁻¹) utilizada estimulou taxas de mortalidade mais elevadas. Na

comparação entre os agentes osmóticos, o manitol foi o que surtiu maior efeito estressante nas plantas, visto as maiores taxas de mortalidade, quando comparado com o sorbitol, nas duas doses testadas. Esse decréscimo mais acentuado da sobrevivência das plantas em resposta a presença do manitol foi reportado também em *Solanum tuberosum* (FORTES, FERREIRA, 2001), *Syngonanthus mucugensis* (LIMA-BRITO et al., 2011) e em culturas de *Cedrus atlântica* e *Cedrus libian* (RENAU-MORATA et al., 2006). Entretanto, respostas relacionadas à concentração dos agentes osmóticos são dependentes de algumas variáveis, em especial da espécie em estudo. Em jenipapeiro, por exemplo, Lédo et al. (2013) relataram que doses entre 0 e 20 mg L⁻¹ de manitol adicionadas ao meio MS não mostraram-se eficientes na conservação *in vitro* dessa espécie, pois não promoveram um retardo no crescimento dos explantes.

Os carboidratos manitol e sorbitol têm sido utilizados com a finalidade de alterar a disponibilidade de trocas gasosas, proteger as membranas celulares das baixas temperaturas e reduzir a hiperhidricidade, evitando a vitrificação (ENGELMAN, 1991). Embora o uso dessas substâncias seja vantajoso, a depender da finalidade, alguns autores ressaltam que o manitol e o sorbitol são agentes osmóticos que não são metabolizados pelas células vegetais. Suas ações estão relacionadas com a modificação do potencial osmótico do meio, removendo o excesso de água intracelular por gradiente osmótico e assim desacelerando o crescimento celular e que dependendo da concentração ou da espécie foco, essas substâncias podem surtir efeito nocivo ao vegetal (SHIBLI et al. 2006; FORTES, PEREIRA, 2001). Essas informações vão de encontro com as respostas obtidas neste trabalho, onde a maior dose de ambos os agentes osmóticos promoveu maiores porcentagem de mortalidade e número de folhas senescentes. Esses possíveis efeitos tóxicos foram relatados também em trabalhos conduzidos com coqueiro (LÉDO et al., 2007), mangabeira (PIRES et al., 2017; SÁ et al., 2011; SANTOS et al., 2011), batata (FORTE, PEREIRA, 2001) e amoreira-preta (SILVA et al., 2016), o que ressalta a importância do ajuste de um protocolo de conservação para cada espécie.

Explantes quando cultivados *in vitro* por longo período são propícios a produzirem etileno, hormônio capaz de influenciar negativamente a morfogênese de plantas cultivadas nessas condições. Dentre os efeitos desse gás estão a oxidação fenólica e a queda foliar, afetando negativamente uma das maiores vias de regeneração de plantas, a organogênese (HATAKANA et al., 1995; KUMAR et al., 1998). A ação

dessa auxina somada à presença dos agentes osmóticos torna possível elucidar porque a testemunha apresentou melhores respostas de desenvolvimento sob os demais tratamentos em todas as características avaliadas.

É importante frisar que os efeitos retardantes observados nesse trabalho, são desejáveis, já que o intuito foi de promover a conservação *in vitro*. No entanto, esse retardo só é justificável quando o metabolismo do vegetal é reduzido, mas sem perda de viabilidade, conferido à porcentagem de sobrevivência dos explantes e a capacidade de responder a retomada de crescimento.

A evolução da taxa de mortalidade permitiu a tolerância máxima de conservação de 240 dias (Figura 1), visto que nesse tempo a perda dos explantes já estava próxima a 80% no tratamento mais agressivo. Algumas plantas que ainda permaneciam vivas começaram apresentar sintomas de desidratação e clorose nas folhas, indício da dificuldade de absorção de nutrientes. A partir desse ponto deu-se início a fase de retomada de crescimento.

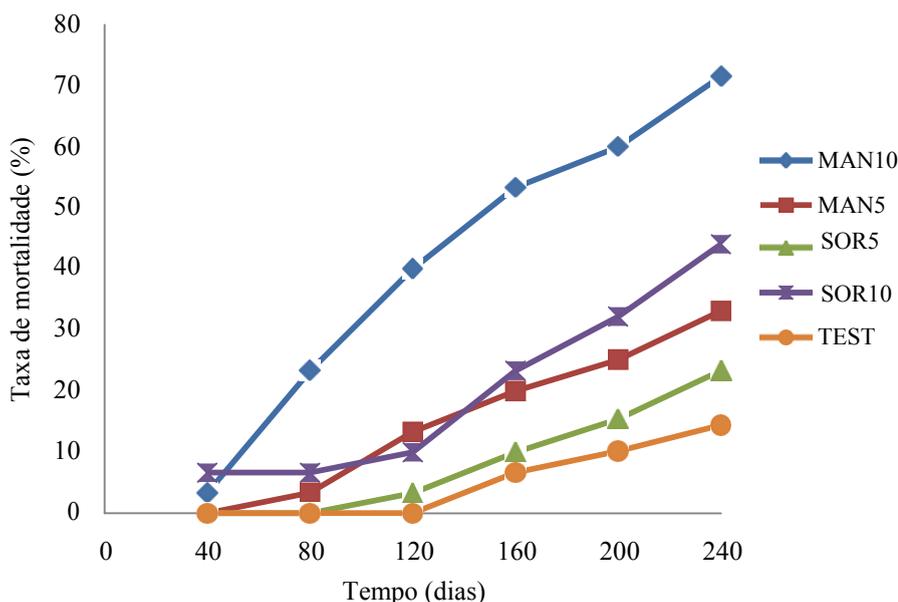


FIGURA 1. Evolução da taxa de mortalidade de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) conservadas *in vitro* na presença ou na ausência de duas doses de agentes osmóticos. Uberlândia-MG, 2019.

MAN5- Manitol a 5 g L⁻¹; MAN10- Manitol a 10 g L⁻¹; SOR5- Sorbitol a 5 g L⁻¹; SOR10- Sorbitol a 10 g L⁻¹; TEST-Testemunha.

Segunda fase: Retomada do crescimento

Diferenças significativas entre os tratamentos acrescidos de agentes osmóticos foram apresentadas para o índice SPAD e para massa fresca. Além do tipo de agente osmótico, essas características sofreram influência também das doses utilizadas dessas substâncias. Já a testemunha diferiu dos demais tratamentos para todas as variáveis analisadas (Tabela 2).

TABELA 2. Índice SPAD (ISD), comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas vivas (NFV), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) submetidas à retomada de crescimento *in vitro* após 240 dias de conservação. Uberlândia- MG, 2019.

Agente osmótico (g L ⁻¹)	ISD		CPA		NFV		MF		MS	
	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
MAN	13,97aA*	14,63aA*	4,90*	4,00*	10,40*	8,30*	0,65bA*	1,33aA	0,49	0,19*
SOR	13,82aA*	9,50bB*	3,99*	4,40*	5,00*	2,40*	2,38aA	0,68aB*	0,18*	0,18*
Média Geral	15,30		5,21		10,40		1,59		0,36	
Testemunha	24,61		8,80		25,91		2,91		0,78	
W	0,96		0,91		0,95		0,96		0,93	
F	1,20		3,12		10,21		14,92		7,28	
CV%	14,16		25,31		37,79		33,87		27,11	

* Diferente da testemunha pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância; DMS: Diferença média significativa para o teste de Dunnett; Médias seguidas por letras distintas minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Verificou-se que o índice SPAD foi maior nas plantas da testemunha e menor no tratamento acrescido de sorbitol 10 mg L⁻¹. As plantas da testemunha não foram submetidas a nenhuma condição de estresse, por isso desde a fase de conservação estas já apresentavam melhor capacidade de absorção de nutriente, visto que todas as estruturas vegetativas se encontravam bem formadas. O teor do índice SPAD relaciona-se com as condições nutricionais dos vegetais, plantas mais nutridas apresentam elementos essenciais em faixas adequadas para a formação da molécula de clorofila, em especial o nitrogênio. Diversos autores afirmam que a cor verde tem correlação positiva

com o teor de clorofila e com a concentração de N na folha, pois esse macronutriente faz parte de enzimas que estão associadas aos cloroplastos (SINGH et al., 2010; REINBOTHE et al., 2010). A relação nutricional com o índice SPAD foi verificada em várias espécies, como em barueiro (SILVA et al. 2016), *Aspasia variegata* (NETO et al. 2013), pecan (HARDIN et al., 2012), citros (SOUZA et al., 2011) e tomateiro (GUIMARÃES et al., 1999). Partindo desse princípio, plantas sob processo de conservação *in vitro* têm menores condições de absorção de nutrientes, comprometendo a formação de componentes importantes para o aparato fotossintético. Sob condições de crescimento mínimo esse comportamento é desejado, porém, durante a fase de retomada de crescimentos não é desejável que essas conseqüências comprometam a recuperação metabólica dos explantes, levantando a importância de se avaliar o agente osmótico, bem como a dose menos impactante nas fases subseqüentes à conservação, a exemplo do sorbitol a 10 mg L⁻¹ nesse estudo.

Do ponto de vista molecular o manitol e o sorbitol não apresentaram grandes diferenças entre si, no entanto foi possível notar que ambos provocam diferentes respostas no metabolismo vegetal. Para a massa fresca na adoção da menor dose (5 g L⁻¹), o manitol já conseguiu exercer maior influência na retomada de crescimento das plantas, nas quais apresentaram menor incremento de biomassa em relação ao sorbitol. Alta influência desse agente osmótico foi reportada também em outros trabalhos visando crescimento mínimo, como em *Solanum tuberosum* L., *Vanilla* sp., *Cocos nucifera* L. e *Syngonanthus mucugensis* (FORTES, PEREIRA, 2001; DIVAKARAN et al., 2006; LÉDO et al., 2007; LIMA-BRITO et al., 2011).

Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que os explantes mantidos sob ação dos agentes osmóticos durante o período de conservação *in vitro* sofreram estresse, acarretando uma recuperação do crescimento mais lenta após transferência para meios de cultivo suplementados com reguladores vegetais. O aproveitamento efetivo desses fitorreguladores pelas plantas torna-se efetivo quando há um sistema radicular bem formado para a absorção dos mesmos. No entanto, neste trabalho observou-se que os explantes apresentaram dificuldades para emitirem essa estrutura. Bastos et al. (2006) preconizaram que na propagação vegetativa é comum em espécies lenhosas a emissão de brotações antes mesmo da emissão de raízes. Em complemento Herrera et al. (2004) explicam que o difícil enraizamento de algumas espécies pode ser justificado pelo fato de as estacas não possuírem quantidades suficientes de cofatores de

enraizamento necessários para o processo, destacando a necessidade de se ajustar doses ideais destes reguladores que estimulem um enraizamento mais eficiente das plantas.

Foi possível constatar que a espécie apresentou grande sensibilidade ao uso dos osmorreguladores. Mesmo assim, se tratando de conservação, esses carboidratos mostraram-se importantes para o intuito buscado, pois os explantes que não foram sujeitos a ação dessas substâncias apresentaram ritmo de desenvolvimento acelerado, o que levantaria a necessidade de sucessivas repicagens em curto espaço de tempo.

CONCLUSÕES

É possível conservar *Zizyphus joazeiro* por 240 dias sob condições de crescimento mínimo utilizando-se o sorbitol a 5 mg L⁻¹.

REFERÊNCIAS

BASTOS, D. C.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; LIBARDI, M. N.; ALMEIDA, L. F. P.; GALUCHI, T. P. D.; BAKKER, S. T. Propagação da pitaya vermelha por estaquia. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1106-1109, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000600009>

BEZERRA, C. S., PEREIRA, J. G. Diversidade de vegetação arbórea em uma área de Caatinga no município de Monteiro-PB. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 16, n. 1, Cariri, jun, 2017.

BEZERRA, C. S., PEREIRA, J. G. Diversidade de vegetação arbórea em uma área de Caatinga no município de Monteiro-PB. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 16, n. 1, Cariri, jun, 2017.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EmbrapaSPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.87-132.

DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Conservation of *Vanilla* species *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.110, n.2, p.175-180. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.003>

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma: a review. **Euphytica**, v.57, p.227-243, 1991.

<https://doi.org/10.1007/BF00039669>

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1261-4, 2001.

<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001001000007>

GUIMARÃES, T. G.; FONTES, P. C. R.; PEREIRA, P. R. G., ALVAREZ, V. V. H.; MONNERAT, P. H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo. **Bragantia**, v. 58, p. 209-216, 1999.

<https://doi.org/10.1590/S0006-87051999000100020>

HARDIN, J. A.; SMITH, M. W.; WECKLER, P. R.; CHEARY, B. S. *In Situ* Measurement of Pecan Leaf Nitrogen Concentration using a Chlorophyll Meter and Vis-near Infrared Multispectral Camera. **Hortscience**, Alexandria, v.47, n.7, p.955–960, 2012.

<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.7.955>

HATAKANA, T.; SAWABE, E.; AZUMA, T.; UCHIDA, N.; YASUDA, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Limerick, v. 107, p. 199-204, 1995.

[https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04103-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04103-2)

HERRERA, T. I.; ONO, E. O.; LEAL, F. P. Efeitos de auxina e boro no enraizamento adventício de estacas caulinares de louro (*Laurus nobilis* L.). **Biotemas**, v. 17, n. 1, p. 65-77, 2004.

KUMAR, P. P.; LAKSHMANAN, P.; THORPE, T. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. **In Vitro-Plant**, New York, v. 34, p. 4-103, 1998.

<https://doi.org/10.1007/BF02822771>

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA Artes e Textos, 2000. 531p.

LÉDO, A. S.; ALMEIDA, C. S.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. V. C.; SILVA JÚNIOR, J. F. Efeito do manitol no crescimento *in vitro* de acesso de jenipapeiro dos Cerrados para fins de conservação. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 25, I RGVNE, 2013.

LÉDO, A. S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 04, p. 346-351, 2007.

LIMA-BRITO, A.; ALBURQUEQUE, M. M. S.; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, S. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1354-1361, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000800010>

MONIZ, K. L. A. **Caracterização morfológica de sementes de frutos e estudos da germinação da espécie *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae)**. 88 f. 2002.

Dissertação(Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Feira de Santana, Feira de Santana, 2002.

NETO, V. B. P.; CAMPOS, G. O.; BOARETTO, A. G.; ZUFFO, M. C. R.; TORREZAN, M. A.; BENETÃO, J. Comportamento *in vitro* de *Aspasia variegata*, uma orquídea epífita do cerrado brasileiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.12, p.2178-2184, dez, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001200010>

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PIRES, D. C. M.; TRENTO, S. M.; OLIVEIRA, R. C.; SOUZA, C. S.; LUZ, J. M. Q.; SOUZA, A. V. V. **Conservação *in vitro* por crescimento lento de *Hancornia speciosa* Gomes**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTA, 8., Dourados. O Encontro dos Biomas Cerrado e Mata Atlântica: a exuberância do Pantanal, Bonito: SBFPO: ABCTP, 2017.

RENAU-MORATA, B.; ARRIGALA, I.; SEGURA, J. *In vitro* storage of cedar shoot under growth conditions. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 7, p. 636-642, 2006.

<https://doi.org/10.1007/s00299-006-0129-2>

REINBOTHE, C.; BAKKOURI, M.; BUHR, F.; MURAKI, N.; NOMATA, J.; KURISU, G.; FUJITA, Y. E REINBOTHE, S. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.15, n.11, p.614-624, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.002>

SÁ, A. J. ; LEDO, A. S.; LEDO. C. A. Conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 01, p. 57-62, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000100010>

SANTOS, M. C.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. SILVA.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JÚNIOR, J. F. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S1806-66902011000300020>

SILVA, H. F. J.; ASMAR, S. A.; OLIVEIRA, R. C.; MELO, B.; LUZ, J. M. Q.; PASQUAL, M. *In vitro* establishment and early development of barueiro (*Dipteryx alata* Vogel). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 1779-1790, 2016.

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n4p1779>

SILVA, N. D. G; DUTRA, L. F; BIANCHI, V. J; SOMMER, L. R; VARGAS, D. P; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2016.

SIQUEIRA FILHO, J. A. **A flora das Caatingas do Rio São Francisco** : história natural e conservação. Editora Andrea Jakobsson, Rio de Janeiro, Brasil. 552 p. 2012.

SINGH, V.; SINGH, B.; SINGH, Y.; THIND, H. S.; GUPTA, R. K. Need based nitrogen management using the chlorophyll meter and leaf colour chart in rice and wheat in South Asia: a review. **Nutrient Cycling Agroecosyst**, Dordrecht, v.88, p.361-380, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s10705-010-9363-7>

SOUZA, T. R.; SALOMÃO, L. C.; ANDRADE, T. F.; BÔAS, R. L. V.; QUAGGIO, J. A. Medida indireta da clorofila e sua relação com o manejo da adubação nitrogenada em plantas cítricas fertirrigadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 993-1003, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000300036>

VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germoplasma. **Biotechnology Advances**, v.9, p.197-215, 1991.

[https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90004-F](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90004-F)

CAPÍTULO 2

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE AMBURANA

(*Ambura cearensis* [Allemão] A.C. Smith)

RESUMO

A amburana é uma espécie lenhosa típica da Caatinga e apresenta múltiplos usos, com destaque no potencial medicinal. Interferências antrópicas em áreas de ocorrência natural, aliada ao extrativismo desordenado têm colocado a espécie em risco de extinção. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi otimizar um protocolo de multiplicação *in vitro* de *Amburana cearensis*. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Os três experimentos foram conduzidos em DIC e utilizaram-se segmentos nodais como explantes. Na fase de multiplicação testaram-se quatro meios de cultura (MS, MS/2, WPM e WPM/2), quatro doses de BAP e duas doses de sacarose, o que constituiu um fatorial 4 x 4 x 2, com seis repetições. Na segunda parte, referente ao alongamento dos explantes estudou-se o efeito das doses 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ das auxinas AIA, ANA e AIB, mais a testemunha, em arranjo fatorial 3 x 2 + 1, com quatro repetições. A terceira fase, relativa ao enraizamento adotou-se o AIB em três doses (0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) e quatro tempos de permanência dos explantes ao efeito desse regulador de crescimento, perfazendo um fatorial 3 x 4 com quatro repetições. As características avaliadas foram submetidas à análise de variância, sendo analisadas pelo teste de Tukey (α 5%) ou regressão, no software estatístico SISVAR. Concluiu-se nesse trabalho que para a multiplicação da amburana o meio MS pleno, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,6 mg L⁻¹ de BAP foi o mais favorável. Na fase de alongamento recomenda-se testar concentrações de auxinas superiores as utilizadas nesse trabalho ou ainda menores doses de carvão ativado. E na indução do enraizamento a dose de 2 mg L⁻¹ de AIB promoveu as melhores respostas à rizogênese.

Palavras-chave: Micropropagação, Caatinga, espécies nativas, meio de cultura.

ABSTRACT

The amburana is a woody species typical of the Caatinga and presents multiple uses, highlighting medicinal potential. Anthropic interferences in areas of natural occurrence, allied to the disorderly extraction have put the species at risk of extinction. Thus, the objective of this work was to optimize an *in vitro* multiplication protocol of *Amburana cearensis*. The works were developed in the Plant Tissue Culture Laboratory of Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. The three

experiments were mounted in DIC and nodal segments were used as explants. In the multiplication phase four culture media (MS, MS/2, WPM and WPM/2), four BAP doses and two sucrose doses were tested, which constituted a 4 x 4 x 2 factorial with six replicates. The effect of 0,05 and 0,1 mg L⁻¹ doses of auxin AIA, ANA and AIB, plus the control, in a factorial arrangement of 3 x 2 + 1, were studied in the second part, repetitions. The third phase, related to rooting, was used in three doses (0.5, 1 and 2 mg L⁻¹) and four residence times of the explants to the effect of this growth regulator, making a factorial 3 x 4 with four repetitions. The analyzed characteristics were submitted to analysis of variance and analyzed by the Tukey test (α 5%) or regression, in the statistical software SISVAR. It was concluded in this work that for the multiplication the full MS medium, plus 30 g L⁻¹ of sucrose and 0,6 mg L⁻¹ of BAP was the most favorable. In the elongation phase it is recommended to test auxin concentrations higher than those used in this work or even lower doses of activated carbon. And in the induction to rooting the dose of 2 mg L⁻¹ of AIB promoted the best responses to rhizogenesis.

Keywords: Micropropagation, Caatinga, native species, culture medium.

INTRODUÇÃO

A ambura, camarú, cerejeira ou amburana-de-cheiro (*Amburana cearensis*-Fabaceae) é uma espécie lenhosa típica da Caatinga (CANUTO et al., 2008, MAIA, 2004). Dentre as várias espécies desse bioma, a amburana também tem grande potencial econômico, dada a sua aplicação na carpintaria e na medicina popular. A casca da árvore e as sementes possuem efeito terapêutico e são utilizadas na produção de medicamentos caseiros destinados ao tratamento de afecções pulmonares, tosses, asma, bronquite e coqueluche (LORENZI; MATOS, 2002). Esses mesmos autores consideram essa planta útil para programas de fitoterapia em saúde pública, já que estudos fitoquímicos realizados demonstraram a segurança e eficácia dessa espécie, classificando-a como um fitoterápico.

Devido a essas amplas utilizações econômicas da amburana, as interferências antrópicas têm colocado esta espécie sob risco de ameaça. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (*IUCN- Red List* ou *Red Data List*), elaborada pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais- IUCN, classifica o estado de conservação da *A. cearensis* dentro do grupo das espécies ameaçadas de extinção e com subclassificação *Endangered (EN)- Em perigo*. Ou seja,

evidências apontam que esta espécie provavelmente será extinta num futuro próximo, se medidas urgentes de produção de mudas e conservação não forem elaboradas.

Considerando a importância socioeconômica da amburana, torna-se necessário desenvolver técnicas que viabilizem o processo de produção de mudas, uma vez que estas informações ainda são incipientes. Nesse contexto, a micropropagação além de disponibilizar grande quantidade de mudas em curto período de tempo, permite o controle das condições ambientais durante a propagação e a preservação de plantas matrizes sem riscos de infecção por microrganismos (BARBOZA, CALDAS, 2001). No entanto, é necessário o estabelecimento de protocolos que melhor aperfeiçoem esse processo. O qual pode ser aliado na busca da conservação da espécie.

Os meios de cultura, segundo Caldas et al. (1990), além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Entre os mais difundidos e utilizados estão o MS (MURASHIGE, SKOOG 1962), desenvolvido inicialmente para tecido medular de *Nicotiana tabacum* e o Woody Plant Medium (WPM) elaborado por Lloyd e McCown (1981), para propagação de plantas lenhosas.

Os componentes dos meios de cultura quando em excesso, inibem o enraizamento são os macronutrientes, no entanto, quando diluídos excessivamente podem levar a deficiências minerais da parte aérea enraizada (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1990), o que torna necessário o ajuste ideal dos mesmos para cada espécie.

A maioria das espécies para se desenvolverem *in vitro* necessita de uma fonte externa de carboidratos, sendo a sacarose a mais utilizada. Essa necessidade ocorre em resposta às condições impostas ao cultivo, como baixa irradiância e trocas gasosas que levam as plantas a perderem o autotrofismo. A sacarose proporciona altas taxas de crescimento e desenvolvimento na maioria das espécies (JESUS et al., 2011), sendo a sua utilização essencial na dose adequada.

Além do meio de cultura e de fonte externa de carboidratos, a utilização de reguladores vegetais, em especial as auxinas e citocininas são importantes para o eficiente desenvolvimento celular. As citocininas estimulam a divisão celular (HARTMANN et al., 2002) e são fundamentais na etapa de regeneração de calos e na

brotação de gemas axilares e apicais (BARRUETO CID, 2000). Já as auxinas desempenham maiores funções no crescimento de órgãos, especialmente as raízes e são utilizadas também na indução da divisão celular e na fase de multiplicação para favorecer o crescimento das culturas (HARTMANN et al., 2002; BARRUETO CID, 2000). O ácido indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) são as auxinas mais utilizadas (ZIMMERMAN, 1981), sendo adicionadas no meio de cultura normalmente em baixas concentrações (GEORGE, SHERRINGTON, 1984).

Dentro da micropropagação, a fase de enraizamento pode variar de uma a três semanas, dividindo-se em três fases: indução, iniciação e alongação. Para as duas iniciais, a presença de auxina é fundamental, enquanto que, na última, torna-se inibidora (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998). George e Sherrington (1984) mencionam que para evitar essa inibição o ideal é adotar estratégias de manter os explantes por um período curto na presença destas substâncias. Em seguida, deve-se utilizar um novo meio de cultivo desprovido desses reguladores vegetais.

Dentre os aspectos relatados, o objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo de multiplicação *in vitro* para *Amburana cearensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, durante o período de junho a dezembro de 2017. As sementes utilizadas para o estabelecimento *in vitro* foram coletadas em área de Caatinga e previamente lavadas em água corrente e em seguida imersas por dois minutos em álcool 70% (v/v). Posteriormente tratadas com solução de hipoclorito de sódio 2%, acrescida de duas gotas de Tween por 15 minutos, sob agitação constante. Após essa etapa as sementes passaram por um processo de tríplex lavagem em água destilada e autoclavada (SOUZA et al., 2014).

Os explantes foram colocados em frascos com capacidade para 200 mL, nos quais receberam 40 mL de meio de cultura. Todos os meios foram acrescidos de 6,5 g L⁻¹ de ágar, 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado e o pH aferido para 5,7. Os frascos contendo os meios

foram vedados com tampas plásticas e em seguida autoclavados a uma temperatura de 121°C durante 20 minutos um dia antes da inoculação.

Após a colocação das sementes nos frascos, estes foram acondicionados em sala de crescimento, mantida em temperatura de 25 °C \pm 1°C e com fotoperíodo de 16 horas/dia, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias que proporcionavam uma intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após obtenção das plantas os segmentos nodais foram extraídos para a instalação dos respectivos experimentos.

Os dados obtidos relativos aos três experimentos foram submetidos à análise de variância através dos programas computacionais Sistema para Análise de Variância (SISVAR) (FERREIRA, 2000) e Assistência Estatística (ASSISTAT) (SILVA, AZEVEDO, 2016) as médias comparadas pelo teste de Tukey e Dunnett ao nível de 5% de probabilidade de erro. Antes disso a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, com os testes de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,01$) e Levene ($\alpha = 0,01$), foram testadas por meio do programa computacional SPSS.

Experimento 1: Multiplicação de explantes

O primeiro experimento teve como objetivo específico testar diferentes meios de cultura, doses de citocinina e de sacarose. Para isso, foram testados quatro meios de cultura- MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), MS/2 e WPM/2; quatro doses de BAP- 0,0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg L^{-1} e duas doses de sacarose- 15 e 30 g L^{-1} . Dessa maneira o experimento foi composto por um fatorial triplo (4 x 4 x 2) em delineamento inteiramente casualizado, com 32 tratamentos, seis repetições e cinco frascos por repetição.

O desenvolvimento das plantas foi acompanhado por um período de 40 dias, sendo que ao final foram avaliadas as seguintes características: Comprimento do maior broto (CB), número de brotos (NB), número de gemas (NG), massa fresca (MF) e massa seca (MS).

Experimento 2: Alongamento de explantes

A instalação desse experimento procedeu-se da mesma maneira que o experimento anterior. Para avaliar o efeito de diferentes auxinas no alongamento de brotos foram testados três tipos de reguladores, AIA, ANA e AIB, mais uma testemunha (ausência de auxina). As doses desses reguladores estudadas foram 0,05 e 0,1 mg L⁻¹. Dessa maneira este experimento foi composto por um fatorial 3 x 2 +1 em delineamento inteiramente casualizado, perfazendo 7 tratamentos, com quatro repetições e cinco fracos por parcela. Em todos os tratamentos foram acrescidos 1 mg L⁻¹ de BAP e o meio de cultura adotado foi o MS pleno.

Após 40 dias foram avaliados o comprimento da parta aérea, número de brotos, número de gemas, massa fresca e massa seca das plantas.

Experimento 3: Enraizamento

Brotações com, aproximadamente 0,5 a 1,5 cm de comprimento, obtidas de plantas cultivadas *in vitro*, foram colocadas em meio MS suplementado com três concentrações de AIB (0,5; 1 e 2 mg L⁻¹), onde permaneceram por períodos de 5, 10, 15 e 30 dias. Decorrido o período de permanência das brotações em cada tratamento, estas foram transferidas para o mesmo meio básico MS, porém não adicionado da auxina. As brotações que permaneceram por 30 dias em cada tratamento não foram transferidas e este foi considerado como tratamento controle.

O experimento foi instalado em DIC e esquema fatorial 3x4 (três concentrações de AIB x quatro períodos de permanência), totalizando doze tratamentos, com 5 repetições e 4 brotações/parcela. Aos 60 dias após a instalação do experimento avaliou-se a porcentagem de brotações enraizadas, número de brotos, comprimento dos brotos, número de raiz e comprimento das raízes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Multiplicação de explantes

Por meio da análise de variância, observou-se que houve interação significativa dos três fatores para as características: número de brotos (NB), número de gemas (NG) e massa fresca (MF). Para as demais características as interações foram duplas ou ainda não significativas, caracterizando independência dos fatores estudados, sendo assim analisados isoladamente (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo da análise de variância das características comprimento do broto (CB), número de brotos (NB), número de gemas (NG), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro meios de cultura (MC), duas doses de sacarose (SAC) e quatro doses de benzilaminopurina (BAP). Uberlândia- MG, 2019.

FV	GL	CB	NB	NG	MF	MS
MC	3	23,05*	6,67*	22,78*	21,07*	11,58*
SAC	1	3,51 ^{ns}	20,32*	1,66 ^{ns}	0,001 ^{ns}	19,85*
BAP	3	1,08 ^{ns}	15,82*	15,43*	13,06*	5,48*
MCxSC	3	0,28 ^{ns}	3,28*	5,57*	2,42 ^{ns}	0,36 ^{ns}
MCxBAP	9	0,61 ^{ns}	2,68*	2,12*	3,15*	1,70 ^{ns}
SACxBAP	3	1,80 ^{ns}	3,43*	4,50*	7,33*	3,63*
MCxSACxBAP	9	0,93 ^{ns}	4,87*	4,40*	3,05*	1,56 ^{ns}
CV (%)		50,16	24,23	29,00	43,03	36,01
Média Geral		0,90	1,37	4,59	0,11	0,025

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Para o incremento do comprimento do broto e massa seca, constatou-se que o meio MS pleno sobressaiu sobre os demais oferecendo condições nutricionais superiores aos outros meios testados (Tabela 2). É importante frisar que o meio MS possui altas concentrações de sais nitrogenados em sua composição quando comparado aos demais meios de cultura, mostrando-se o mais adequado para o incremento de biomassa para essa espécie, apontando que a *A. cearensis* requer maiores necessidades nutricionais para o seu desenvolvimento *in vitro*. Essa resposta foi constatada também por Araruna et al. (2017), onde notaram que esse meio nutricional foi o que também proporcionou melhores condições para o estabelecimento *in vitro* de *Dipteryx alata*.

TABELA 2. Comprimento médio do broto (cm) e massa seca (g) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* em diferentes meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019.

Meio de cultura	Comprimento do broto (cm)	Massa seca (g)
MS	1,344 a	0,031 a
MS/2	0,869 b	0,024 b
WPM	0,781 bc	0,024 b
WPM/2	0,613 c	0,020 b
KS	0,13	0,07
F	2,68	2,22
DMS	0,23	0,004

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; CV: coeficiente de variação; KS, F: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, ambos a 0,01.

Para as características número de brotos e número de gemas observou-se que a dose plena de sacarose (30 g L⁻¹) pode não ser favorável ao incremento dessas características, seja adotando o meio MS ou WPM. Outro fato de grande relevância aponta que os explantes cultivados em meio MS pleno têm a tendência de apresentarem números de brotos e número de gemas superiores ou iguais aos demais tratamentos (Tabela 3). Essa resposta aponta que meios de cultura mais complexos em relação à concentração de macro e micro nutrientes fornecem melhores condições de desenvolvimento ao tecido vegetal dessa espécie. Entretanto, essa afirmação não engloba a sacarose que nessa situação demonstrou desfavorecer as estruturas vegetativas da espécie em estudo.

É importante ressaltar que durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996; MALDANER et al., 2006). Conforme Taiz e Zeiger (2004), a pressão osmótica muito alta limita a absorção de água, sendo que a diluição aumenta a disponibilidade de água e reduz a oxigenação, fato que pode explicar o porquê a concentração integral de sacarose não proporcionou respostas superiores em dados tratamentos.

TABELA 3. Número de brotos e número de gemas de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro concentrações de reguladores de crescimento, duas doses de sacarose e em diferentes meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019.

BAP (mg L ⁻¹)	Sacarose (g L ⁻¹)	Meios de culturas			
		MS	MS/2	WPM	WPM/2
Número de brotos					
0,0	15	2,26 aA	1,18 aB	1,00 aB	1,00 aB
	30	1,00 bA	1,00 aA	1,04 aA	1,00 aA
0,25	15	1,10 aA	1,08 aA	1,43 aA	1,23 aA
	30	1,40 aA	1,26 aA	1,10 aA	1,23 aA
0,50	15	1,73 aA	1,56 aAB	1,90 aA	1,23 aB
	30	1,73 aA	1,20 aB	1,26 bAB	1,33 aAB
1,00	15	1,63 aA	1,63 aA	2,03 aA	1,63 aA
	30	1,46 aA	1,46 aA	1,26 bA	1,43 aA
KS				0,18	
F				3,77	
		DMS _{sacarose} = 0,37		DMS _{meio} = 0,49	
Número de gemas					
0,0	15	7,53 aA	2,90 aB	3,00 aB	3,03 aB
	30	3,93 bA	3,29 aA	3,06 aA	3,96 aA
0,25	15	3,16 bB	2,15 bB	5,23 aA	3,90 aAB
	30	6,06 aA	4,60 aAB	3,68 bB	3,96 aB
0,50	15	6,76 aA	4,24 aB	6,33 aA	3,90 aB
	30	6,76 aA	3,63 aB	3,93 bB	4,51 aB
1,00	15	6,63 aAB	5,00 aB	7,00 aA	4,76 aB
	30	6,16 aA	4,83 aA	4,83 bA	4,33 aA
KS				0,08	
F				1,64	
		DMS _{sacarose} = 1,52		DMS _{meio} = 1,99	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; CV: coeficiente de variação; KS, F: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, ambos a 0,01.

Constatou-se que o número de gemas e o número de brotos mantiveram comportamento linear crescente com a progressão das doses de BAP, quando se utilizou 15 g L⁻¹ de sacarose nos meios de cultivo (Figura 1A e 2A). Já na dose maior desse carboidrato essas características apresentaram comportamento linear crescente somente no meio WPM, WPM/2 e MS/2. Para o meio MS notou-se que o incremento máximo do número de gemas (7,0) e brotos (1,7) foi até a dose aproximada de 0,65 mg L⁻¹ BAP, concentrações superiores desse regulador passaram a ser prejudiciais ao incremento dessas características (Figura 1B e 2B). Efeito fitotóxico de BAP a doses mais elevadas em *A. cearensis* foi constatado também por Campos et al. (2013) e em *Lychnophora pinaster* (SOUZA et al., 2003) e a *Rubus idaeus* (VILLA et al., 2006).

O meio MS apresenta cerca de 20% a mais de sais nitrogenados em relação ao meio WPM, esse fato remete que meios de cultivo com maior carga iônica acrescidos de maiores doses de sacarose promovem um desequilíbrio iônico nas células vegetais, comprometendo os processos de divisão celular, mesmo na presença de uma citocinina.

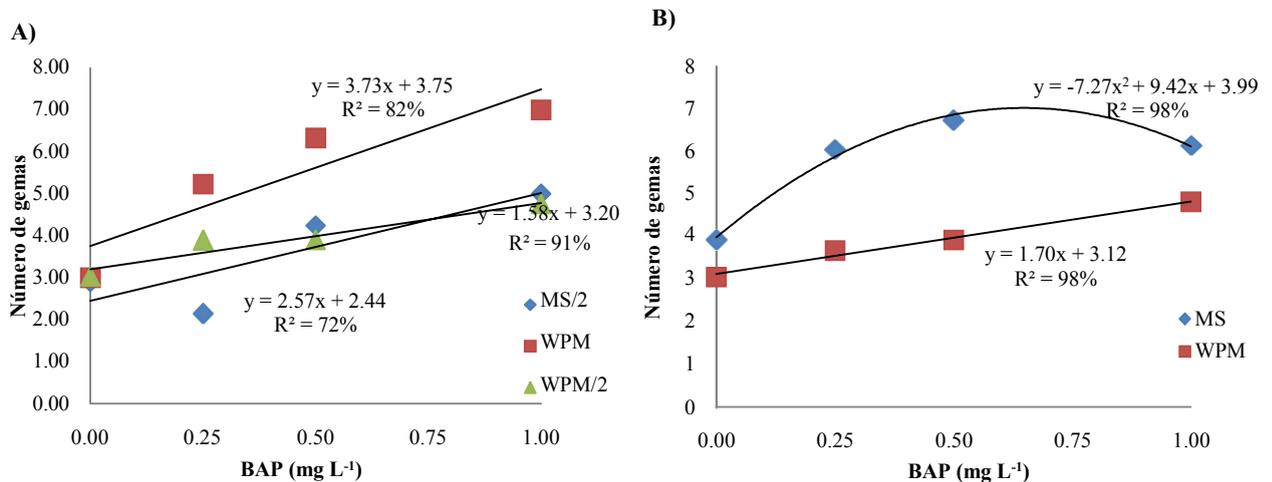


FIGURA 1. Número de gemas de plantas de umburana cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de BAP em diferentes meios de cultivo, acrescidos de 15 g L⁻¹ (A) ou 30 g L⁻¹ (B) de sacarose. Uberlândia- MG, 2019.

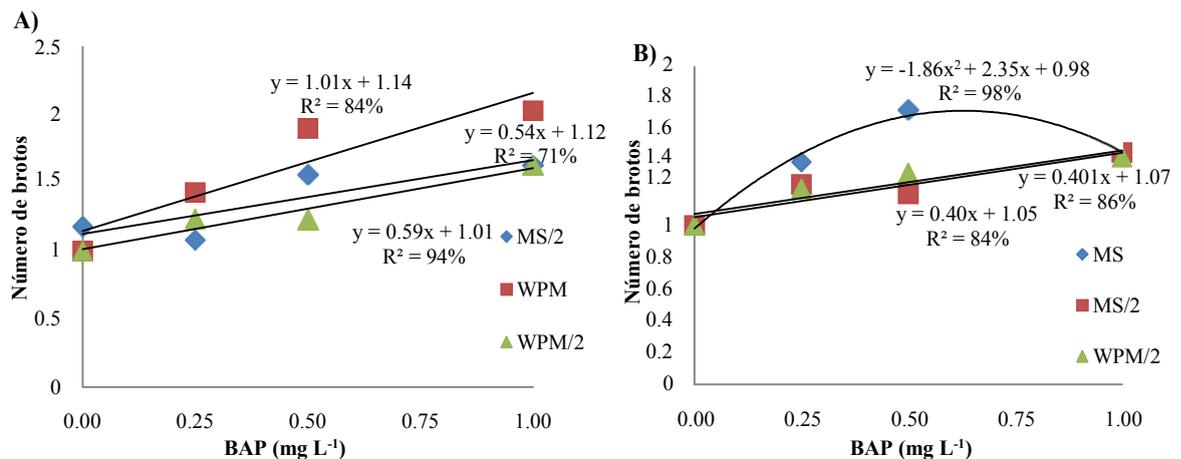


FIGURA 2. Número de brotos de plantas de umburana cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de BAP em diferentes meios de cultivo, acrescidos de 15 g L⁻¹ (A) ou 30 g L⁻¹ (B) de sacarose. Uberlândia- MG, 2019.

De acordo com as respostas para massa fresca, as distintas doses de sacarose promoveram diferença somente nos explantes cultivados em meio MS pleno, onde na ausência de regulador de crescimento a maior concentração de sacarose não promoveu

melhor incremento dessa característica. A ação da menor dose de BAP foi suficiente para inverter esse comportamento, onde a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose resultou em melhor desenvolvimento dessas plantas (Tabela 4). A citocinina por agir nos processos de divisões mitóticas, estimula a multiplicação celular permitindo gerar uma maior demanda por nutrientes presentes no meio, dessa forma a sacarose não agiu negativamente no processo osmorregulatório das células para essa característica, exercendo efeitos positivos no tratamento acrescido de 0,25 mg L⁻¹ de BAP.

Com relação aos meios de cultivo, seja na dose de 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose ou nas quatro diferentes concentrações de BAP, o meio MS pleno esteve entre os melhores meios de cultura, não apresentando resultados inferiores para massa fresca em nenhum dos tratamentos.

TABELA 4. Massa fresca de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro concentrações de reguladores de crescimento, duas doses de sacarose e em diferentes meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019.

BAP (mg L ⁻¹)	Sacarose (g L ⁻¹)	Massa fresca (g)			
		Meio de cultura			
		MS	MS/2	WPM	WPM/2
0,0	15	0,24 aA	0,06 aB	0,04 aB	0,05 aB
	30	0,07 bA	0,05 aA	0,04 aA	0,05 aA
0,25	15	0,07 bA	0,06 aA	0,10 aA	0,06 aA
	30	0,15 aA	0,10 aA	0,11 aA	0,10 aA
0,50	15	0,18 aA	0,12 aAB	0,12 aAB	0,08 aB
	30	0,19 aA	0,13 aAB	0,11 aB	0,10 aB
1,00	15	0,17 aA	0,16 aAB	0,10 aAB	0,09 aB
	30	0,13 aA	0,15 aA	0,09 aA	0,12 aA
KS			0,08		
F			1,99		
		DMS _{sacarose} = 0,054		DMS _{meio} = 0,07	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; CV: coeficiente de variação; KS, F: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, ambos a 0,01.

A utilização da dose de 30 g L⁻¹ de sacarose otimizou os efeitos do BAP, isso porque nessa condição a menor concentração desse regulador (0,58 mg L⁻¹) foi o suficiente

para a obtenção de máximo ganho de massa fresca (0,19 g) se comparado com os tratamentos acrescidos de 15 g L⁻¹ de sacarose, onde essa mesma dose do regulador vegetal proporcionaria um incremento de biomassa de 0,13 g (Figura 3). Essa melhor resposta foi favorecida com o uso do meio MS, que atingiu máximo ganho de biomassa sem a utilização de doses extremas de citocinina, demonstrando oferecer melhores condições que as demais composições.

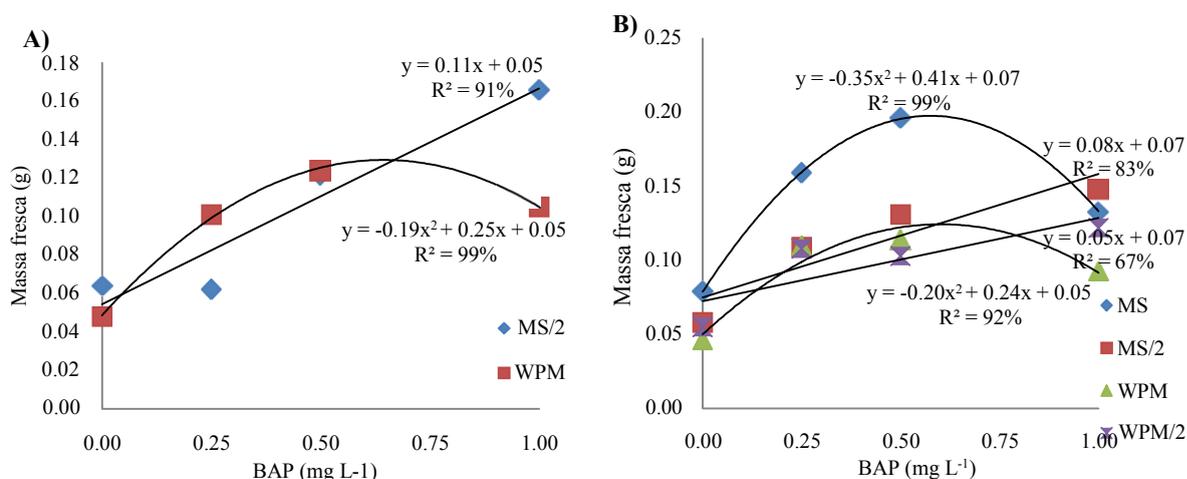


FIGURA 3. Massa fresca de plantas de amburana cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de BAP em diferentes meios de cultivo, acrescidos de 15 g L⁻¹ (A) ou 30 g L⁻¹ (B) de sacarose. Uberlândia- MG, 2019.

A massa seca está diretamente relacionada ao esqueleto de carbono, estrutura indispensável na sua formação e que para ser formado requer no processo de multiplicação *in vitro* maior suprimento de uma fonte exógena de energia (LEIFERT et al., 1995; NICOLOSO et al., 2003). Essa afirmação pode ser evidenciada nos resultados obtidos no presente estudo, ou seja, a dose de 30 g L⁻¹ adicionada aos meios de cultura proporcionou resultados iguais ou superiores para essa característica (Tabela 5). De acordo com Nemeth (1986), concentrações ideais de sacarose estão associadas na manutenção de níveis endógenos de hormônios, afirmação que pode explicar porque a junção dos efeitos do carboidrato e do BAP podem ser aliados ao desenvolvimento dos explantes.

TABELA 5. Massa seca de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob quatro concentrações de reguladores de crescimento e duas doses de sacarose. Uberlândia- MG, 2019.

Sacarose (g L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0,00	0,25	0,50	1,00
15	0,020 a	0,019 b	0,023 b	0,024 a
30	0,020 a	0,030 a	0,031 a	0,028 a
KS			0,07	
F			2,22	
	DMS _{sacarose} = 0,005		DMS _{meio} = 0,006	

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; CV: coeficiente de variação; KS, F: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, ambos a 0,01.

Os melhores resultados utilizando-se a maior dose de sacarose nesse trabalho também foram reportados em outros estudos de cultivo *in vitro* envolvendo *Pfaffia tuberosa* (FLORES et al., 2013), *Anacardium othonianum* (SOUZA et al., 2017), *Mikania glomerata* (WERNER, PLA, 2012) e embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata* (BANDEIRA et al., 2013). Essas respostas frisam que a dose de 30 g L⁻¹ de sacarose consegue fornecer máximo desempenho dessas espécies *in vitro* sem alcançar níveis prejudiciais ao desenvolvimento das plantas.

O nitrogênio é o macronutriente mais requerido pelas plantas, sendo o elemento mais demandado depois do carbono, hidrogênio e oxigênio. O meio WPM possui menores concentrações desse macronutriente (especialmente íons nitrato e amônio), assim como menores teores de potássio, se comparado ao meio MS. Dessa forma, as diferentes respostas dos meios de cultura para a massa seca evidenciam que meios nutritivos mais completos e concentrados favorecem melhores respostas de desenvolvimento do cultivo *in vitro* da amburana (Figura 4). Embora esses resultados apontaram o meio MS como o mais adequado para a multiplicação da amburana, Campos et al. (2013) obtiveram boas respostas de multiplicação para essa mesma espécie adotando o meio WPM, porém, neste caso o tipo de explante que forneceu melhores respostas foi o segmento cotiledonar. Esse fato reporta que além de fatores nutricionais, o tipo de explante exerce influência nas respostas geradas.

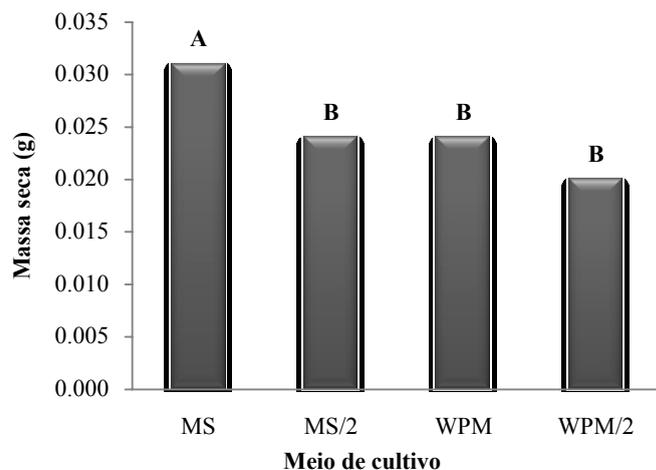


FIGURA 4. Massa seca de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* em função de distintos meios de cultura. Uberlândia- MG, 2019.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; DMS= 0,004

Experimento 2: Alongamento de explantes

Para todas as características avaliadas observou-se que os diferentes reguladores utilizados, bem como as duas doses não promoveram diferenças significativas (Tabela 6).

TABELA 6. Comprimento da parta aérea (CPA), número de brotos (NB), Número de gemas (NG), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob ausência ou presença de regulador de crescimento. Uberlândia- MG, 2019.

Regulador	Concentração (mg L ⁻¹)	CPA (cm)	NB	NG	MF (g)	MS (g)
AIA	0,05	1,26	1,22	3,84	0,43	0,09
	0,10	0,94	1,42	3,93	0,51	0,08
ANA	0,05	0,97	1,28	3,85	0,37	0,07
	0,10	0,73	1,27	3,65	0,35	0,07
AIB	0,05	0,92	1,23	3,93	0,43	0,09
	0,10	0,69	1,31	3,83	0,38	0,07
Testemunha		1,04	1,10	3,94	0,34	0,07
DMS		0,70	0,33	1,03	0,25	0,05

DMS: Diferença média significativa; Médias não diferiram pelo teste de Tukey ou Dunnett, ambos a 0,05 de significância.

Os resultados obtidos sugerem que as doses testadas possam ter sido muito baixas, não promovendo estímulo mínimo aos explantes suficiente para gerar alongamento celular. De acordo com McCown (1988), as dosagens efetivas de auxinas situam-se, geralmente, entre 0,05 a 10,0 mg L⁻¹ para períodos mais prolongados, como dias ou até semanas. Essa informação sustenta a hipótese de que doses maiores possam ser ideais no alongamento dos explantes, merecendo ser testadas.

A ausência de diferenças entre os tratamentos desse experimento pode estar associada também a baixos índices de auxina endógena dos explantes. Vários pesquisadores afirmam que a auxina endógena age como ativador de gene, e a aplicação de auxinas sintéticas favorece a conjugação entre a auxina endógena e aminoácidos que promovem a síntese de proteínas específicas e necessárias para a multiplicação celular (GASPAR, HOFINGER, 1988; ONO, RODRIGUES, 1996; ASSIS, TEIXEIRA, 1998; ALOUFA, 2003).

É importante lembrar também que o carvão ativado é adicionado ao meio de cultura devido a sua capacidade de adsorver substâncias tóxicas liberadas pelos explantes ou impurezas de outros componentes, conforme preconizado por Grattapaglia e Machado (1998). No entanto, esse antioxidante possui efeito não seletivo, o que pode induzir androgenia, alterar o pH, remover nutrientes orgânicos e reguladores vegetais, inibir o crescimento e a morfogenia (ARDITTI; ERNST, 1992; GEORGE, 1993; PAN; STADEN, 1998; SANTOS-SEREJO, 2006). Esse fato remete a importância de se realizar trabalhos que visem ajustar a concentração desse aditivo no meio de cultura a fim de proporcionar máxima eficiência, sem deixar que efeitos antagônicos venham acometer o desenvolvimento dos explantes, informação complementar que pode otimizar esse e outros trabalhos com esta espécie.

Experimento 3: Enraizamento

O resumo da análise de variância demonstrou que somente o número de raízes e comprimento da maior raiz diferiram entre os tratamentos, havendo uma interação dupla dos fatores para essas características (Tabela 7).

TABELA 7. Resumo da análise de variância das características número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) de plantas de Amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob três doses de AIB e cinco tempos de exposição. Uberlândia-MG, 2019.

FV	GL	NB	CB	NR	CR
AIB	2	1,0 ^{ns}	1,06 ^{ns}	43,12*	44,50*
TEMPO	3	1,0 ^{ns}	1,91 ^{ns}	5,73*	4,52*
AIB x TEMPO	6	1,0 ^{ns}	0,75 ^{ns}	3,89*	7,29*
CV (%)		12,70	34,99	69,0	62,0
Média Geral		1,01	1,19	1,23	0,94

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Percebe-se que em quase todos os tempos de exposição dos explantes à auxina, os maiores números de comprimento médio de raízes foram obtidos com o uso da maior dose de AIB (Tabela 8). Melhores resultados com a adoção de maiores doses de auxinas foram encontrados também por Nodoye et al. (2003) em bálsamo egípcio (*Balanites aegyptiaca*), Radmann et al. (2002) em porta-enxertos de macieira e por Souza et al. (2017) trabalhando com cajuí (*Anacardium othonianum*). Entretanto, estudos que apontam melhores resultados com o uso de AIB em concentrações mais baixas ou ainda dispensam o uso desse regulador são reportados para *Stevia rebaudiana* (DEY et al., 2013), *Mikania glomerata* (WERNER et al., 2013), *Miconia ligustroides* (PRUDENTE et. al., 2016). Essas informações ressaltam que as respostas provocadas por esse indutor de enraizamento são específicas para cada espécie, levantando a necessidade de estabelecimentos de protocolos específicos.

TABELA 8. Número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob três doses de AIB e cinco tempos de exposição. Uberlândia- MG, 2019.

AIB (mg L ⁻¹)	NR				CR (cm)			
	Tempo (dias)				Tempo (dias)			
	5	10	15	30	5	10	15	30
0,5	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 c
1,0	0,80 ab	0,20 b	0,80 b	3,00 a	0,28 b	0,16 b	1,29 a	1,40 b
2,0	1,60 a	3,00 a	2,40 a	3,00 a	1,82 a	1,78 a	1,93 a	2,58 a
KS	0,23				0,22			
F	8,07				8,04			
DMS	1,30				0,90			

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; DMS: diferença média significativa; KS, F: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, ambos a 0,01.

O processo de enraizamento adventício envolve a conjugação entre auxinas internas e externas e quando a espécie possui uma concentração adequada do hormônio endógeno AIA, a conjugação com reguladores vegetais sintéticos, como AIB ou ANA por determinados períodos entre dez e vinte dias, aproximadamente, já é suficiente para induzir a formação de raiz sob condições *in vitro*. A permanência da brotação na presença da auxina sintética por períodos prolongados pode acarretar na inibição do crescimento das raízes induzidas (GASPAR, HOFINGER, 1988; GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998; SOUZA, PEREIRA, 2007). Porém, nesse trabalho foi observado que a exposição dos explantes ao AIB, mesmo por um tempo maior, não favoreceu efeitos fitotóxicos aos mesmos, pelo contrário, o tempo de 30 dias foi o que forneceu melhores condições ao processo de rizogênese (Figura 5). Essas respostas corroboram com os resultados encontrados por Campos et al. (2013) que trabalharam com essa mesma espécie. Esses resultados podem ter sido atribuídos ao fato de que AIB possui expressiva funcionalidade *in vitro* por provocar, dentre as auxinas, menor fitotoxicidade aos explantes e apresentar eficiência em uma ampla faixa de concentrações, garantindo assim, êxito na formação de raízes (BANDEIRA et al., 2012).

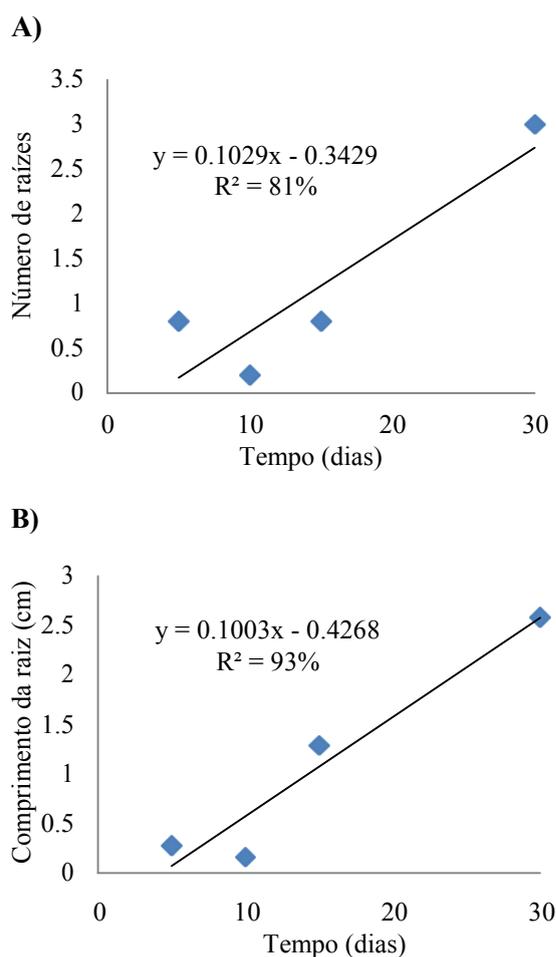


FIGURA 5. Médias do número de raízes (A) e comprimento de raízes (B) de plantas de amburana (*Amburana cearensis*) cultivadas *in vitro* sob diferentes tempos de exposição ao meio de cultura contendo 1 mg L^{-1} de AIB. Uberlândia- MG, 2019.

Ramos et al. (2003) enfatizaram que as auxinas são fundamentais no processo de enraizamento, possivelmente por estimularem a síntese etileno, favorecendo assim a emissão de raízes. Embora tenha sido possível obter modelo de regressão somente para a dose de 1 mg L^{-1} de AIB, o presente estudo apontou que as adoções de maiores tempos de exposição dos explantes ao AIB bem como a maior dose confirmam os efeitos benéficos dessa auxina para a amburana, reforçando assim a necessidade da sua utilização em protocolos de multiplicação dessa espécie.

CONCLUSÕES

O meio MS pleno, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose é o mais recomendado para a multiplicação *in vitro* de amburana e a dose de 0,6 mg L⁻¹ de BAP mostrou-se como a mais favorável para o desenvolvimento *in vitro* da espécie.

Para o estímulo do alongamento dos explantes recomenda-se testar concentrações de auxinas superiores as utilizadas nesse trabalho ou ainda menores doses de carvão ativado.

Para a indução do enraizamento recomenda-se utilizar 2 mg L⁻¹ de AIB e o tempo de exposição dos explantes a essa auxina por 30 dias.

REFERÊNCIAS

ALOUFA, M. A. I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, p.3-5. 2003.

Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996). 1998. Amburana cearensis. The IUCN Red List of Threatened Species 1998: e.T32291A9687595.

<http://www.iucnredlist.org/details/32291/0> (acesso em 06/06/2018).

ARARUNA, E. C., OLIVEIRA, J. P. R., PEREIRA, V. J., ASMAR, S. A., MELO, B. Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata in vitro*. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 52, n.12, p.1295-1300, 2017.

<https://doi.org/10.1590/s0100-204x2017001200020>

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley 1992. 682 p.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v. 1, p.261-96, 1998.

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba influenciada por temperaturas de armazenamento dos frutos e concentrações de sacarose. **Revista Árvore**, v. 37, n. 4, p. 91-700, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000400012>

BANDEIRA, J. M.; THUROW, L. B.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A.; BIANCHI, V. J. Rooting and acclimatization of the Japanese plum tree, cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 597-603, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000200035>

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PExSC – 52. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.3, p.417-423, 2001.

<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000300004>

BARRUETO CID, L. P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L. P. (Org.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.

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. p. 37-70.

CAMPOS, V. C. A.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, A. V. V. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.4, p.639-644, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000018>

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E., LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. S. B. Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie. Petrolina: **EMBRAPA**, 2008. 24 p. (EMBRAPA Semi- Árido. Documentos, 208).

DEY, A.; KUNDU, S.; BANDYOPADHYAY, A.; BHATTACHARJEE, A. Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Comptes rendus biologies** , v. 336, n. 1, p. 17-28, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2012.11.007>

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FLORES, R.; ULIANA, S. C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sacarose e sorbitol a conservação in vitro de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Oregon, 1988. v.2, p.117-131.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 574 p. 1996

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 - the technology. 2. ed. Edington Limited, 574 p. 1993..

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 709 p. 1984.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPH, p.99-169. 1990.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation**: principles and practices. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

JESUS, A. M. S.; VILLA, F.; LARA, C. C.; PASQUAL, M. Avaliação do efeito as concentrações de sacarose e dos estágios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. **Revista Ceres**, v.58, n.6, p. 679-684, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000600001>

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.14, n.2, p.83-109, 1995.

<https://doi.org/10.1080/07352689509701923>

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

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002. 512 p.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Ed, 2004. 413 p.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1201-1206, 2006._
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000400024>

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. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. **Bot. Bull. Academia Sinica**, Shanghai, v. 18, p.1-24, 1962.

NEMETH, G. **Induction of rooting**. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology agriculture and forestry I*, Berlin: Springer-Verlag, 1986.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-70576-2_4

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S1413-70542003000100010>

NODOYE, M.; DIALLO, I.; GASSAMA, Y. K. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.11, p.421-4, 2003.

<https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1084>

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, p. 83, 1996.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal *in vitro* culture-A review. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v.26, n. 3, p. 155-163, 1998.

<https://doi.org/10.1023/A:1006119015972>

PRUDENTE, D. O.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; REIS, M. V., PAIVA, P. D. O.; NERY, M. C. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, v. 12, n. 1, p. 13-19, 2016.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira „M-9“. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.157-63, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000300011>

RAMOS, J. D.; MATOS, L. E. S., GONTIJO, T. C. A., PIO, R., JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C. Enraizamento de estacas herbáceas de „mirabolano' (*Prunus cerasifera* EHRN) em diferente substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n.1, p.189-91, 2003.
<https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000100053>

SANTOS-SEREJO, J.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. Meios Nutritivos para Micropropagação de Plantas, 2006 In: SOUZA, A. S., JUNGHANS, T. G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Embrapa mandioca e fruticultura tropical, 1. Ed. Cruz das Almas-BA., c. 4,122p.

SILVA, F. A. S.; AZVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal Agricultural Reserch**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

<https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11522>

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.

SOUZA, A.V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p.1532-1538, 2003.

SOUZA, A. V. V.; SANTOS, M. C.; SOUZA, M. D.; LARISSE, R. L. Protocolos de assepsia para o estabelecimento de espécies medicinais nativas da Caatinga. Petrolina: **EMBRAPA**, 2014. (EMBRAPA Semi- Árido. Comunicado Técnico, 160).

SOUZA, I. D., SOUZA, J. B., PEREIRA, F. D., SANTANA, J. G., NETO, A. R., ASSIS, E. S. Composição do meio de cultivo para produção de microplantas de caju-de-árvore-do-Cerrado (*Anacardium othonianum* RIZZ). **Revista Científica**, n. 5, v. 1, p. 1-11, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** 3- ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VILLA, F.; FRÁGUAS, C. B.; DUTRA, L. F.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar „Brazos“. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.2, p.266-270, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000200011>

WERNER, A. M. PLA, G. P. Influência do ácido indolbutírico (AIB) e da sacarose no desenvolvimento radicular do guaco (*Mikaniaglomerata*) cultivado *in vitro*. **Cadernos acadêmicos**, v. 4, n. 2, p. 215-217, 2013.

ZIMMERMANN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 217-222, 1981.

<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1981.120.29>

CAPÍTULO 3

DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE ACESSOS DE AMBURANA (*Amburana cearensis*): MÉTODOS HIERÁRQUICOS E DE OTIMIZAÇÃO

RESUMO

A avaliação de acessos em um banco de germoplasma é essencial para determinar seu potencial comercial ou sua utilidade como potenciais genitores em programas de conservação, especialmente no que se refere a espécies nativas. O objetivo do trabalho foi verificar a divergência genética de 68 genótipos de *Amburana* situados em diferentes localidades no estado de Pernambuco. As análises foram efetuadas no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), com 68 tratamentos e duas repetições. Os padrões genéticos foram distinguidos com base no conteúdo de DNA de cada indivíduo e via marcadores moleculares ISSR. A análise da divergência genética foi realizada por meio de análises multivariadas empregando-se diferentes métodos de agrupamento (Gower, Ligação média, UPGMA, Ward, Vizinho mais distante, WPGMA e Tocher) e o desempenho dos genótipos foi comparado pelos testes Scott-Knott ($p=0,05$). O método de otimização empregado (Tocher) foi concordante com todos os modelos hierárquicos utilizados, onde o agrupamento dos genótipos ocorreu de forma semelhante, especificamente para o acesso BB116, sendo este um importante material genético a ser preservado e estudado. Dentre os vários métodos hierárquicos aplicados o de Ligação Média apresentou maior poder de discriminação, permitindo a identificação de maior quantidade de grupos divergentes, inferindo assim grande variedade genética entre os acessos de *amburana*.

Palavras chave: Germoplasma, conservação, plantas nativas, Caatinga.

ABSTRACT

The assessment of access in a germplasm bank is essential to determine their commercial potential or their usefulness as potential parents in conservation programs, especially with respect to native species. The objective of this study was to verify the genetic divergence of 68 *Amburana* genotypes located in different locations in the state of Pernambuco. The analyzes were carried out in the tissue culture laboratory of the Federal University of Lavras in a randomized complete block design (DBC), with 68 treatments and two replicates. The genetic patterns were distinguished based on the DNA content of each individual and via molecular markers ISSR. Genetic divergence analysis was performed using multivariate analyzes using different clustering methods (Gower, Medium Link, UPGMA, Ward, Farther Neighbor , WPGMA and Tocher) and genotype performance was compared by the Scott-Knott ($p = 0.05$). The optimization method employed (Tocher) was in agreement with all the hierarchical models used, where the grouping of the genotypes occurred in a similar way, specifically for the BB116 access, being an important genetic material to be preserved and studied. Among the several hierarchical methods applied, the Medium Link presented greater discrimination power, allowing the identification of a greater number of divergent groups, thus inferring a great genetic variation among the *amburana* accessions.

Key words: Germplasm, conservation, native plants, Caatinga.

INTRODUÇÃO

Amburana cearensis (Allem.) A. C. Smith, (*Fabaceae*) se trata de uma espécie nativa da Caatinga com múltiplas utilidades a citar o uso madeireiro; medicinal, atribuída a cumarina, princípio ativo presente nas cascas e raízes; ornamental e reflorestamento; em sistemas agroflorestais, além de forrageira. Apresenta também grande importância para a apicultura pelo fato de fornecer néctar na estação seca do ano (MARINHO et al., 2002; MAIA, 2004; CANUTO et al., 2008). Todos esses destaques configuram a *amburana* como uma espécie de grande importância socioeconômica e ambiental nos locais de ocorrência.

Conhecer a diversidade genética é de grande importância para o melhoramento e conservação de espécies, pois de acordo com Cui et al. (2001), se adequadamente explorada, pode reduzir a vulnerabilidade da espécie a doenças e, ao mesmo tempo, acelerar o progresso genético para determinados caracteres de importância na busca da domesticação e consequente contribuição para a sua preservação. Por isso, o conhecimento da variabilidade genética da amburana é crucial na identificação de genitores para o estabelecimento de um programa de melhoramento e conservação, fornecendo condições para o desenvolvimento de cultivares, bem como de genótipos mais promissores no aspecto medicinal e adaptativo. Entretanto, essas informações ainda são incipientes, levantando a necessidade de estudos acerca dessa questão.

Para se conhecer a variabilidade genética de uma espécie são necessárias ferramentas biológicas que promovam a genotipagem de indivíduos. Os marcadores moleculares são considerados ferramentas úteis para esse fim, pois aumentam o poder da análise genética das plantas (CAIXETA et al., 2009). Dentre as classes de marcadores mais difundidos, os marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) têm grande aplicação nos estudos de distinção molecular de plantas. Dantas et al. (2012) enfatizaram a caracterização molecular como um importante estudo para o conhecimento de um banco de germoplasma. Esse tipo de marcador molecular permite a identificação de ampla variabilidade intra e interespecíficas e, com isso, fundamentam-se como uma ferramenta útil em programas de melhoramento e estudos de diversidade.

Dentre as análises feitas a partir de marcadores moleculares estão os métodos de agrupamento. Estes têm por finalidade separar um grupo original de observações em vários subgrupos, de forma a obter homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os subgrupos. Os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, sendo estabelecido um dendrograma, sem preocupação com o número ótimo de grupos, sendo adequado para identificar genótipos divergentes e com maior probabilidade de sucesso nos cruzamentos (CARGNELUTTI FILHO et al., 2008). Já nos métodos de otimização, os grupos são estabelecidos aperfeiçoando determinado critério de agrupamento, diferindo dos métodos hierárquicos pelo fato de os grupos formados serem mutuamente exclusivos (CRUZ et al., 2004). Pela complementaridade de informações, Bertan et al. (2006) ressaltaram que esses dois métodos são empregados em grande escala pelos melhoristas de plantas.

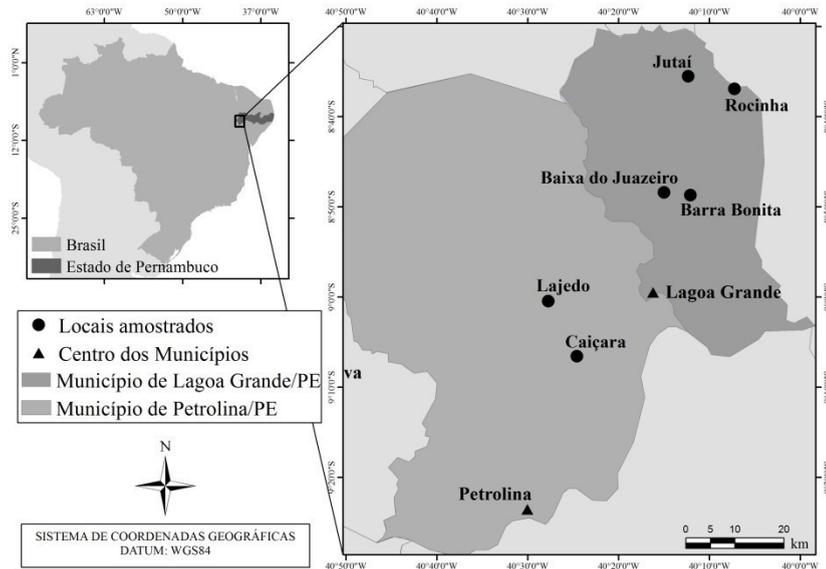
Estudos que abordem a diversidade genética de *A. cearensis* acerca de diferentes métodos de agrupamentos ainda são escassos. Além disso, diversos métodos com base em diferentes medidas de dissimilaridade podem levar a distintos padrões de agrupamento (CRUZ, REGAZZI, 1997; MINGOTI, 2005). Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar a divergência genética entre 68 acessos de amburana por meio de caracteres moleculares; verificar se há coerência entre o método de agrupamento Tocher com diferentes métodos hierárquicos (Gower, Ligação média, UPGMA, Ward, Vizinho mais distante e WPGMA); apontar combinações híbridas promissoras para a obtenção de populações potencialmente importantes para programas de melhoramento e conservação de *A. cearensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Material Vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras, entre março de 2017 a fevereiro de 2018. Os germoplasmas utilizados fazem parte do Programa de Recursos Genéticos da Embrapa e foram obtidos por meio do projeto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Nordeste, coordenado pela Embrapa Semiárido, sediada em Petrolina - PE. Os materiais propagativos utilizados foram provenientes de seis populações situadas nos seguintes locais e suas respectivas siglas: Jutaí (J), Rocinha (RO), Lajedo (LA), Barra Bonita (BB), Caiçara (CA) e Baixa do Juazeiro (BJ), todos situados no estado de Pernambuco (Figura 1). Dessa forma, cada genótipo foi designado pela sigla do local seguida do seu número de localização.

FIGURA 1. Localização dos seis locais de coleta dos acessos de *Ambura cearensis* no estado de Pernambuco. Uberlândia- MG, 2019.



As sementes de cada acesso foram semeadas em tubetes contendo uma mistura de solo mais areia (1:1). Decorridos sete dias após a germinação as mudas foram transferidas para sacos plásticos com capacidade de 1000 mL, contendo o mesmo substrato utilizado na etapa anterior. Seis meses após o transplante, quando as plantas atingiram cerca de 50 cm de altura, iniciaram-se as análises moleculares.

Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico foram utilizados folíolos jovens coletados de plantas adultas mantidas em casa de vegetação. Esse material foi colocado em saquinhos plásticos devidamente identificados com o código de cada genótipo. Para o transporte das amostras até o laboratório, os saquinhos foram acondicionados em caixa de isopor contendo gelo.

A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Nunes et al. (2011). De cada amostra utilizou-se aproximadamente 0,5 g de tecido foliar que foi macerado juntamente com nitrogênio líquido. As amostras de DNA foram visualizadas na presença de luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo (0,3 µg/mL) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH

8,0) EDTA 10 mM] para verificar a qualidade do DNA. A quantificação do DNA foi realizada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a contaminação das amostras com proteínas realizou-se leitura das absorbâncias a 280 nm e calculada a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras cuja relação variou de 1,5 a 2.

Marcador Molecular ISSR

Foram utilizados um total de cinco iniciadores de ISSR indicados na literatura como polimórficos (Tabela 1).

TABELA 1. Relação dos iniciadores ISSR utilizados na avaliação dos 68 genótipos de *Amburana cearensis*, com as respectivas sequências e temperatura de anelamento (Ta). Uberlândia- MG, 2019.

Iniciador	Sequência (5'- 3')	Ta
S-31	AGAGAGAGAGAGAGAGVC	49,6°C
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAAA	51,6°C
UBC827	ACACACACACACACACG	50°C
UBC890	VHV GTGTGTGTGTGTGTT	52°C
UBC891	HVH TGTGTGTGTGTGTG	52°C; 51,6°C

As reações de amplificação para ISSR foram realizadas em volume final de 25 µl. contendo: 50 ng de DNA, 7,5 µl de tampão de reação 5X, 1,5 mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0,8 µM do iniciador (Sigma, USA) e 2,4U de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA). As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Multigene Gradient, Labnet International, USA) programado para um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 minutos. A temperatura de anelamento dos iniciadores foi definida em função de cada iniciador (Tabela 2). Ambos os anelamentos ocorreram por 1 minuto e a extensão dos iniciadores a 72 °C por 2 minutos. Realizou-se um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação (5 µl das amostras) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo (0,3 µg/mL), imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM] por 4 h sob tensão de 110 V, os quais foram posteriormente fotodocumentados sob luz UV.

As bandas geradas pela amplificação do DNA genômico de cada acesso foram usadas como dados a serem interpretados neste estudo. As bandas, amplificadas pelo mesmo primer que ocuparam a mesma posição no gel foram consideradas como sendo pertencentes ao mesmo locus gênico. Seguindo este mesmo princípio, bandas geradas pelo mesmo primer, mas que ocupam posições diferentes foram consideradas pertencentes a locos gênicos diferentes.

A partir das análises das fotografias dos géis, os marcadores ISSR foram genotipados quanto à presença (1) e à ausência (0) das bandas, gerando uma matriz binária, utilizada para a divisão da variância entre seus componentes dentro e entre populações (níveis hierárquicos).

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC), com 68 tratamentos e duas repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F ($p=0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p=0,05$). Em seguida, foram realizadas análises multivariadas com o objetivo de determinar a dissimilaridade genética entre os genótipos, obtendo-se a matriz de dissimilaridade pelos métodos hierárquicos. A divergência genética foi representada por dendrogramas obtidos por seis métodos hierárquicos: Gower, Ligação média, UPGMA, Ward, Vizinho mais distante e WPGMA e pelo método de otimização de Tocher. As validações dos agrupamentos pelos métodos hierárquicos foram determinadas pelo coeficiente de correlação cofenético (CCC), calculado pelo teste de Mantel (1967). Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se o *software* Genes v. 2015.5.0 (CRUZ, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do teste de médias do padrão molecular das populações de *A. cearensis*, foi possível constatar que a diversidade genética é grande dentro das próprias populações que apresentaram indivíduos distintos referentes ao conteúdo de DNA (Tabela 2). Esse grau de miscigenação entre as seis populações pode fornecer uma estimativa do fluxo gênico aparente. Em *Ziziphus joazeiro* foi constatado restrições desse fluxo, visto a grande quantidade observada de alelos exclusivos dentro das populações, o que de acordo com Ferreira-Ramos (2008) sugere fortes restrições no fluxo gênico.

De maneira geral, as espécies arbóreas apresentam sistema misto de reprodução, bem como uma eficiência na dispersão de sementes e de pólen, o que favorece a ocorrência de fluxo gênico, aumentando assim a variação genética encontrada dentro das populações, com pouca diferenciação entre elas (ASSIS, 2015; LOVELLESS, HAMRICK, 1984). De acordo com Mori (2003), espécies com agentes polinizadores que atingem grandes distâncias (como vento, aves ou morcegos) e, ou, dispersores que distribuam as sementes por grandes extensões (como vento ou animais de grande porte) possuem maior variabilidade genética dentro de populações, conseqüentemente maior fluxo gênico. No caso da amburana, a polinização acontece principalmente por abelhas e lepidópteros e a dispersão anemocórica das sementes, visto que são dotadas de alas. Informação essa que colabora na compreensão dessa grande diversidade genética entre os acessos.

TABELA 2. Teste de médias do conteúdo de DNA de 68 acessos de *Amburana cearensis*. Uberlândia- MG, 2019.

Genótipo	Média	Genótipo	Média	Genótipo	Média
BB116	37,04 a	J44	29,05 f	BB 119	27,84 h
J45	31,95 b	BJ88	28,98 g	LA110	27,80 h
J27	31,33 c	J55	28,89 g	BB117	27,76 h
CA65	31,21 c	RO93	28,87 g	J50	27,70 h
J19	30,99 d	J30	28,73 g	J32	27,65 h
J26	30,87 d	RO95	28,71 g	BJ76	27,63 h
CA135	30,61 d	J51	28,59 g	RO101	27,34 i
CA129	30,56 d	J49	28,53 g	J46	27,30 i
J35	30,51 d	RO100	28,50 g	BB122	27,25 i
RO98	30,43 d	J43	28,47 g	BB120	27,06 i
J57	30,42 d	J40	28,47 g	BB121	27,06 i
J42	30,04 e	RO97	28,40 g	CA66	26,95 i
BJ80	29,92 e	RO109	28,38 g	BJ69	26,87 i
RO94	29,86 e	RO90	28,32 g	BB124	26,71 i
RO99	29,82 e	J41	28,31 g	J20	26,38 j
J53	29,72 e	RO104	28,20 h	BB127	26,30 j
J25	29,60 e	J36	28,16 h	BJ81	26,19 j
J56	29,49 e	LA111	28,16 h	BJ71	26,04 j
BB125	29,32 f	J33	28,13 h	BB126	26,00 j
J54	29,28 f	BB115	27,96 h	J48	25,37 k
RO89	29,19 f	J47	27,92 h	RO107	25,35 k
RO105	29,16 f	J17	27,92 h		
J52	29,08 f	J34	27,89 h		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de significância

Foram realizadas as análises de agrupamento hierárquico aglomerativo pelos métodos de Gower, Ligação média, UPGMA, Ward, Vizinho mais distante e WPGMA, baseados na Distância Euclidiana (Figura 2). Os coeficientes de correlação cofenético observados apresentaram adequada relação entre a matriz de distância e o dendrograma gerado (Tabela 3), o que demonstra fidelidade na apresentação do conjunto de dados.

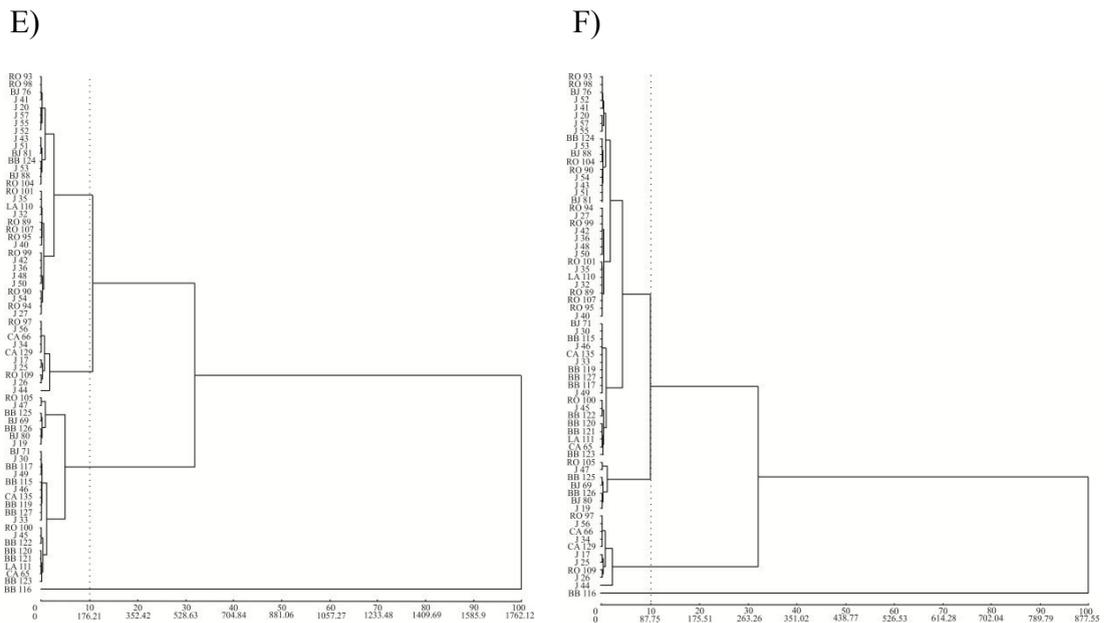


FIGURA 2. Dendrogramas representativos da dissimilaridade genética entre 68 acessos de amburana (*Amburana cearensis*) utilizando os métodos de agrupamento: Gower (A), Ligação média (B), UPGMA (C), Ward (D), Vizinho mais distante (E) e WPGMA (F) a partir das distâncias euclidianas obtidas, em diferentes locais no estado de Pernambuco. Uberlândia- MG, 2019.

TABELA 3. Coeficientes de correlação cofenética (ccc) obtidos entre a matriz de distâncias euclidianas médias e a matriz de distâncias co-fenéticas para as diferentes metodologias hierárquicas. Uberlândia- MG, 2019.

Metodologia	Ccc
Gower	0,84
Ligação média	0,48
UPGMA	0,89
Ward	0,43
Vizinho mais distante	0,74
WPGMA	0,80

A separação dos grupos foi realizada pela delimitação de uma linha de corte considerando em torno de 10% de dissimilaridade como critério para a definição dos grupos. A linha de corte foi estabelecida no local em que se observou mudança abrupta nas ramificações presentes no dendrograma (CRUZ *et al.*, 2012).

Com este corte os genótipos foram agrupados de três a seis grupos distintos. Em todos os métodos hierárquicos o grupo I foi representado apenas pelo acesso BB116, para os demais grupos a distribuição dos genótipos foi variável (Tabela 5). Martins *et al.*

(2002) mencionaram que a determinação de grupos de progenitores para hibridação pode ser determinada baseada nessa análise visual das divisões, sendo que os mais distantes são os mais apropriados para a realização de cruzamentos por produzirem maior efeito heterótico e variabilidade genética nas gerações segregantes. Essa informação é de grande valia para a espécie em questão, que ainda se encontra em estado selvagem de domesticação e que direcionamentos como estes servem como ferramentas essenciais para a busca efetiva desse processo.

O método de Ligação Média forneceu a melhor representação do dendrograma, visto que permitiu maior formação de subgrupos, ou seja, este método conseguiu distinguir os acessos de forma mais detalhada, classificando-os com maior variabilidade, resultado relevante para o melhoramento genético. Por outro lado o método UPGMA foi o que gerou a representação menos satisfatória na formação dos grupos, detectando menor diversidade genética entre os acessos e com isso dendrogramas menos úteis a depender do propósito almejado (Tabela 4).

TABELA 4. Divisão de genótipos de *Amburana cearensis* em diferentes grupos genéticos baseada em seis métodos hierárquicos de agrupamento. Uberlândia- MG, 2019.

Método hierárquico	Grupo	Genótipos
Gower	I	BB116
	II	BB115, J46, CA135, BB119, BB127, J33, BB117, J49, BJ71, J30, RO100, J45, BB122, BB120, BB121, CA65, BB123, LA111, BB124, J53, BJ88, RO104, RO90, J54, BJ81, J43, J51, RO101, J35, LA110, J32, RO99, J42, J36, RO95, RO89, RO107, J40, RO94, J27, J48, J50
	III	RO105, J47, BB125, BJ69, BB126, BJ80, J19
	IV	RO93, RO98, BJ77, J52, J20, J57, J55, J41, CA66, J34, CA129, RO97, J56, J17, J25, RO109, J26, J44
Ligação média	I	BB116
	II	BJ71, J30, J49, BB119, BB127, BB117, BB115, J46, CA135, J33, RO101, J35, LA110, J32, RO89, RO107, RO95, J40, RO99, J42, J36, J48, J50
	III	RO100, J45, BB122, BB120, BB121, CA65, BB123, LA111
	IV	RO105, J47, BB125, BJ69, BB126, BJ80, J19
	V	CA66, J34, CA129, RO97, J56, J17, J25, RO109, J26, J44
	VI	RO93, RO98, BJ76, J52, J41, J20, J57, J55, RO90, J, 54, RO94, J27,

		J43, J51, BJ81, BB124, J53, BJ88, RO104
UPGMA	I	BB116
	II	RO97, J56, CA66, J34, CA129, J17, J25, RO109, J26, J44
	III	RO93, RO98, BJ76, J52, J41, J20, J57, J55, RO90, J54, RO94, J27, J43, J51, BJ81, BB124, J53, BJ88, RO104, RO100, J45, BB122, BB120, BB121, LA111, CA65, BB123, BB115, J46, CA135, J33, BJ71, J30, BB119, BB127, BB117, J49, RO49, RO101, J36, LA110, J32, RO89, RO107, RO95, J40, RO99, J42, J36, J48, J50, RO105, J47, BB125, BJ69, BB126, BJ80, J19
Ward	I	BB116
	II	RO97, J56, CA66, J34, CA129, J17, J25, RO109, J26, J44
	III	RO100, J45, BB122, BB120, BB121, LA111, CA65, BB123, RO105, J47, BB125, BJ69, BB126, BJ80, J19
	IV	BB115, J46, CA135, J33, BJ171, J30, BB119, BB127, BB117, J49, RO101, J35, LA110, J32, RO89, RO107, RO95, J40, RO99, J42, J36, J48, J50
	V	RO93, RO98, BJ76, J52, J41, J20, J57, J55, RO90, J54, RO94, J27, J43, J51, BJ81, BB124, J53, BJ88, RO104
Vizinho mais distante	I	BB116
	II	RO105, J47, BB125, BJ69, BB126, BJ80, J19, BJ71, J30, BB117, J49, BB115, J46, CA135, BB119, BB127, J33, RO100, J45, BB122, BB120, BB121, LA111, CA65, BB123
	III	RO97, J56, CA66, J34, CA129, J17, J26, RO109, J26, J44
	IV	RO93, RO98, BJ76, J41, J20, J57, J55, J52, J43, J51, BJ81, BB124, J53, BJ88, RO104, RO101, J35, LA110, J32, RO89, RO107, RO95, J40, RO99, J42, J36, J48, J50, RO90, J54, RO94, J27
WPGMA	I	BB116
	II	RO97, J56, CA66, J34, CA129, J17, J25, RO109, J26, J44
	III	RO105, J47, BB125, BJ69, BB126, BJ80, J19
	IV	RO93, RO98, BJ76, J52, J41, J20, J57, J55, BB124, J53, BJ88, RO104, RO90, J54, J43, J51, BJ81, RO94, J27, RO99, J42, J36, J48, J50, RO101, J35, LA110, J32, RO89, RO107, RO95, J40, BJ71, J30, BB115, J46, CA135, J33, BB119, BB127, BB117, J49, RO100, J45, BB122, BB120, BB121, LA111, CA65, BB123

Ao analisar o aspecto de seleção de matrizes para a coleta de sementes, a existência de variabilidade genética é fundamental para assegurar ganhos na seleção natural da espécie. Neste caso, as populações analisadas apontaram potencial para este intuito, visto que a variabilidade genética intrapopulacional foi satisfatória, conferida pela diversidade de grupos formados nos seis métodos de agrupamentos aplicados. Resultados similares com aplicação de metodologias semelhantes foram reportados também entre populações de *Spondias lutea* (GOIS et al., 2014) e *Dimorphandra mollis* (OLIVEIRA et al., 2008), espécie medicinal nativa do Cerrado. Essas respostas corroboram com relatos descritos na literatura em que espécies arbóreas, em geral, apresentam maior variação genética dentro de populações, conforme preconizado por Yun et al. (1998) e Aagaard et al. (1998).

De acordo com diversos autores (KAGEYAMA, 2003; ROGALSKI, 2003; McKAY et al., 2003; LIMA, RODRIGUES, 2009), essa variabilidade é importante, pois a coleta de material em matrizes florestais distintas e que apresentem características edafoclimáticas semelhantes à área a ser restaurada, influenciam diretamente nos esforços de trabalhos de restauração ou conservação de espécies nativas, isso porque genótipos exóticos podem reduzir o sucesso de trabalhos como estes, sendo mal adaptados as condições locais ou afetando negativamente o fluxo gênico de populações nativas adjacentes.

Ao realizar a análise de agrupamento pelo método de Tocher entre os 68 acessos, observou-se a formação de dois grupos, de forma que dentro de cada grupo, considerou-se as matrizes geneticamente similares e entre grupos, dissimilares (Tabela 5). Aproximadamente 98,5% dos genótipos se concentraram no grupo I e somente o genótipo BB116 compôs o grupo II, representando um acesso importante e que merece mais atenção, já que tem identidade genética com maior divergência dos demais indivíduos, resposta que pode indicar que esse acesso apresenta origem diferente dos demais. Resposta similar foi encontrada em *Phaseolus vulgaris* (CARGNELUTTI FILHO et al., 2008), onde a aplicação desse método de otimização separou os grupos de forma bem semelhante ao desse trabalho. Já em indivíduos de *Spondias lutea* L. Gois et al. (2014) obtiveram a divisão de quatro grupos pela similaridade genética de Jaccard, entretanto, 80% dos acessos foram agrupados em um só grupo. Essas respostas permitem inferir que, embora divergentes, os acessos apresentam certo grau de parentesco.

Vieira et al. (2007) mencionou que o conhecimento de genitores de maior divergência genética orienta o processo de hibridação, aliado ao desempenho agrônomo dos mesmos, auxiliando também na definição de cruzamentos artificiais e aumentando a base genética de cultivares. Dessa forma, o acesso BB116 por possuir essas características tem grande potencial para ser utilizado em cruzamentos para geração de híbridos. Em outro extremo, a informação a cerca dos pares mais similares é útil nos programas envolvendo retrocruzamentos, nos quais o emprego de genitores similares, diferenciados basicamente pelo alelo a ser transferido, permite recuperar o genitor recorrente (ARAÚJO et al., 2002). Essas informações são de grande relevância para programas de conservação, já que oferecem subsídio para ações que viabilizem a domesticação da amburana com ampla variabilidade genética, aliada a seleções de boas características adaptativas e agronômicas.

TABELA 5. Representação do agrupamento de 68 acessos de amburana (*Amburana cearensis*) pelo método de otimização de Tocher a partir das distâncias euclidianas obtidas com base na análise de caracteres moleculares. Uberlândia- MG, 2019.

Grupos	Indivíduos
I	RO93 RO98 BJ76 J52 J41 J20 J57 J55 BB124 J53 BJ88 RO104 J51 J43 BJ81 J54 RO90 J27 RO94 J50 J48 RO99 J42 J36 RO95 RO107 RO89 J40 RO101 J35 LA110 J32 BB115 J46 CA135 J33 BB119 BB127 BB117 J49 J30 BJ71 RO100 J45 BB122 BB120 BB121 CA65 LA111 BB123 J56 RO97 J34 CA66 CA129 J19 BB126 BJ80 J25 J17 BJ69 BB125 RO109 J26 J47 RO105 J44
II	BB116
Total	68

O método de otimização de Tocher foi coerente com as respostas de todos os modelos hierárquicos testados, ou seja, todos os dendrogramas apontaram dissimilaridade do genótipo BB116, reforçando a confiabilidade deste método aplicado. Em concordância a esses resultados a formação de subgrupos pelo método de agrupamento foram concordantes também com o método de Tocher em trabalhos realizados com araquá (SANTOS et al., 2014) tomateiro (KARASAWA et al., 2005) e *Ricinus communis* (RODRIGUES et al., 2010).

Os resultados gerados nesse trabalho vêm a confirmar a importância dos marcadores moleculares para o objetivo proposto, e vai de encontro a outras pesquisas relatadas na literatura. Além disso, reforça a importância da aplicação dessa técnica em estudos de outras espécies nativas que ainda carecem de mais exploração no cunho científico e estão expostas à extinção.

CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética entre os acessos de amburana, constatada pela detecção de diferentes grupos formados pelos métodos de agrupamento, sugerindo que trabalhos voltados a cruzamentos sejam realizados entre acessos desses grupos distintos.

O método hierárquico Ligação Média apresentou maior poder de discriminação, permitindo a identificação de maior quantidade de grupos contendo acessos similares.

O método de otimização de Tocher mostrou-se eficiente para representar a distância genética dos acessos desse trabalho, visto que concordou com todos os métodos hierárquicos, revelando que o acesso BB116 é o mais divergente dos demais, sendo, portanto um material extremamente interessante para a realização de cruzamentos e em programas de conservação de espécies medicinais nativas.

REFERÊNCIAS

AAGAARD, J. E.; KRUTOVSKII, K. V.; STRAUSS, S. H. RAPDS and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiations among populations and race of Douglas-fir. **Heredity**, v. 81, n. 1, p. 69-78, 1998.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00355.x>

ARAÚJO, D. G.; CARVALHO, S. P.; ALVES, R. M. Divergência genética entre clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p.13-21, 2002

ASSIS, A. L. E. M. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Cabralea canjerana* (Vell.)**, 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal do Espírito Santos, Alegre, ES.

BERTAN, I., CARVALHO, F. I. F., OLIVEIRA, A. C., VIEIRA, E. A., HARTWIG, I., SILVA, J. A. G., SHIMIDT, D. A. M., VALÉRIO, I. P., BUSATO, C. C., RIBEIRO, G. Comparação de método de agrupamentos na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. **Revista Brasileira Agrociência** v. 12, n. 3, p. 279-286, Pelotas, 2006

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. **Tipos de Marcadores Moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Org.). Marcadores moleculares. 2. ed. Viçosa: Editora Jard, v. 1. p.11-101, 2009.

CANUTO, K. M. **Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith** . Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 313 f. 2007.

CARGNELUTTI FILHO, A., RIBEIRO, N. D., REIS, R. C. P., SOUZA, J. R., JOST, E. Comparação de métodos de agrupamento para o estudo da divergência genética em cultivares de feijão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2138-2145, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000800008>

CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum** 35: 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, UFV, p. 223-375. 2004.

CUI, Z., THOMAS, E., CARTER, JR., JOSEPH, W. B., RANDY, W. Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars. **Crop Science**, Madison, WI, n. 41, p. 1954-1967, 2001.

<https://doi.org/10.2135/cropsci2001.1954>

DANTAS, A. C. A.; NUNES, G. H. S.; ARAÚJO, S. I.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.183-189, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000100025>

GOIS, I. B.; FERREIRA, R. A.; SILVA-MANN, R.; BLANK, M. F. A.; NETO, E. M. S. Diversidade genética entre indivíduos de *Spondias lutea* L. procedentes do Baixo São Francisco Sergipano, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 2, p. 261-269, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S0100-67622014000200006>

GOIS, I. B.; FERREIRA, R. A.; SILVA-MANN, R.; PANTALEÃO, S. M.; GOIS, C. B.; OLIVEIRA, R. S. C. Variabilidade genética em populações naturais de *Ziziphus joazeiro* Mart., por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 4, p. 621-630, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S0100-67622014000400005>

KAGEYAMA, P. Y. Reflexos e potenciais da resolução SMA 21, de 21/11/2001, na conservação da biodiversidade específica e genética. Anais do seminário temático sobre recuperação de áreas degradadas. Instituto de Botânica, São Paulo, p. 07-12, 2003.

KARASAWA, M., RODRIGUES, R., SUDRÉ, C. P., SILVA, M. P., RIVA, E. M., AMARAL JÚNIOR, A. T.. Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da

divergência genética entre acessos de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.1000-1005, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S0102-05362005000400028>

LOVELLESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 15, p. 65-95, 1984.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.15.1.65>

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: Leitura e Arte, 2004.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research** v. 27, p. 209-220, 1967.

MARINHO, I. V., FREITAS, M. F., ZANELLA, F. C. V., CALDAS, A. L. **Espécies Vegetais da Caatinga Utilizadas pelas Abelhas Indígenas Sem Ferrão como Fonte de Recursos e Local de Nidificação**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 1., 2002, João Pessoa. Anais. João Pessoa: Ed. Universitária, 2002.

MARTINS, I. S., PIRES, I. E., OLIVEIRA, M. C. D. Divergência genética em progênies de uma população de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **Floresta e Ambiente**. Seropédica. v. 9, n. 1, p. 81-89, 2002.

McKAY, J. K.; CHRISTIAN, C. E.; HARRISON, S.; RICE, K. J. "How local is local"? A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. **Restoration Ecology**, v.13, n.3, p.432-440, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2005.00058.x>

MORI, E. S. Genética de Populações Arbóreas: orientações básicas para seleção e marcação de matrizes. IF Série Registros. São Paulo: Instituto Florestal; n. 25, p. 35-44, 2003.

OLIVEIRA, D. A.; PAULA, M. F. B. PIMENTA, M. A. S.; BRAGA, R. F.; FERREIRA, M. F. M.; RODRIGUES, L. A. Variabilidade genética de populações de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região Norte de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 3355-363, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0100-67622008000200018>

RODRIGUES, H. C. A., CARVALHO, S. P., CARVALHO, A. A., CARVALHO FILHO, J. L. S., CUSTÓDIO, T. N. Avaliação da diversidade genética entre acessos de mamoneira (*Ricinus communis* L.) por meio de caracteres morfoagronômicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n.6, p. 773-777, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000600012>

ROGALSKI, J. M.; BERKENBROCK, I. S.; REIS, A. Sucessão e manutenção da Diversidade biológica e variabilidade genética: ferramentas básicas para a restauração ambiental. Anais do Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas. Foz do Iguaçu, no prelo. 2003.

SANTOS, M. A. C.; QUEIROZ, M. A.; SANTOS, A. S.; SANTOS, L. C.; CARNEIRO, P. C. S. Diversidade genética entre os acessos de araçá de diferentes municípios do Semiárido baiano. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 2, p. 48-57, 2014.

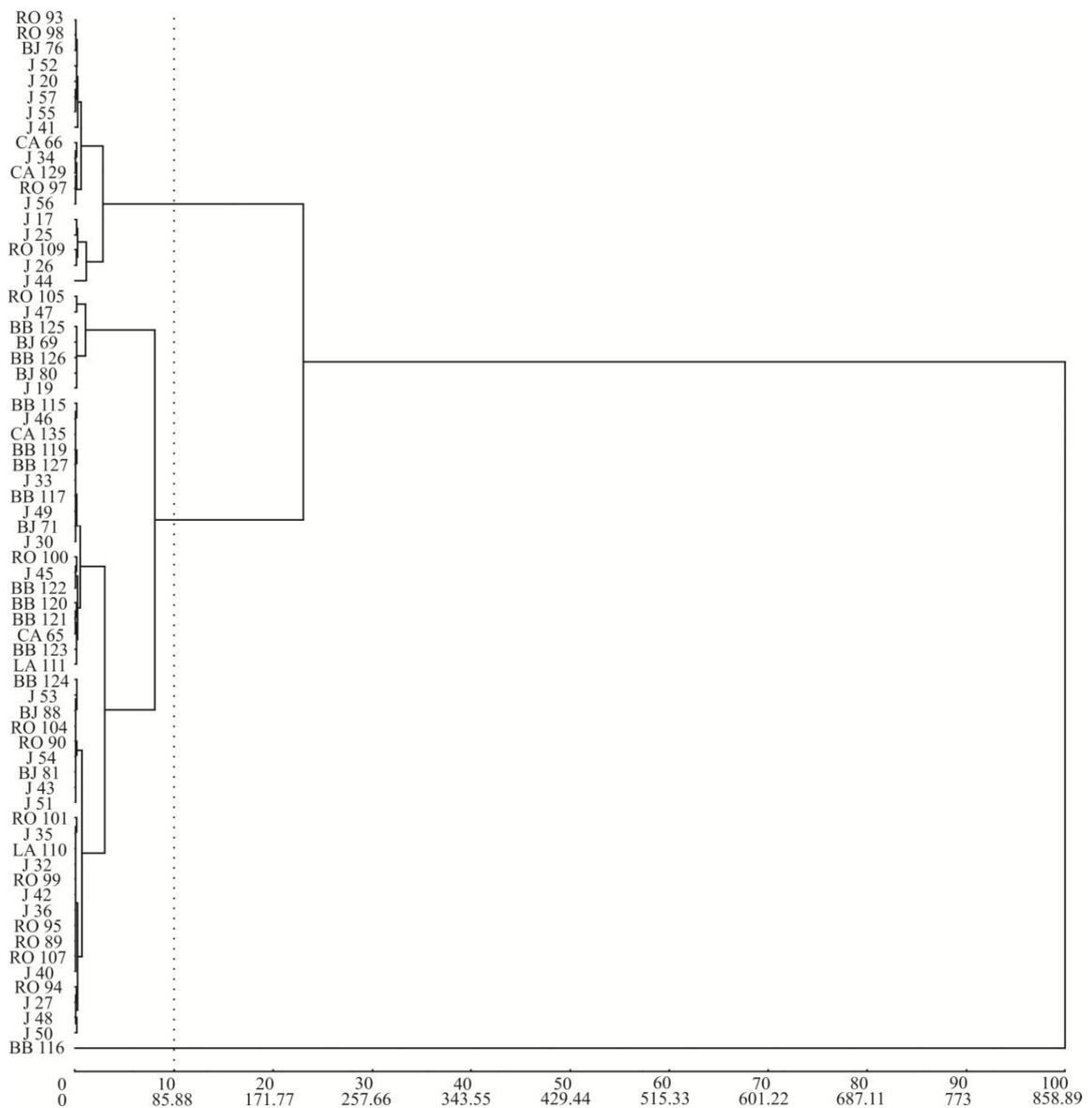
VIEIRA, E. A.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; MARTINS, L. F.; BENIN, G.; SILVAS, J. A. G.; KOPP, M. M.; HARTWIG, I.; CARVALHO, M. F.; VALÉRIO, I.P. Associação da distância genética em trigo estimada a partir de caracteres morfológicos, caracteres fenológicos e dos componentes do rendimento de grãos. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v. 13, n. 2, p. 161-168, 2007.

YUN, R.; ZHONG, M.; WANG, H.; WEI, W.; HU, Z.; QIAN, Y. Study on DNA diversity of Liaodong oak population at Dongling. **Acta Botanica Sinica**, Beijing, v. 40, p. 169-175, 1998.

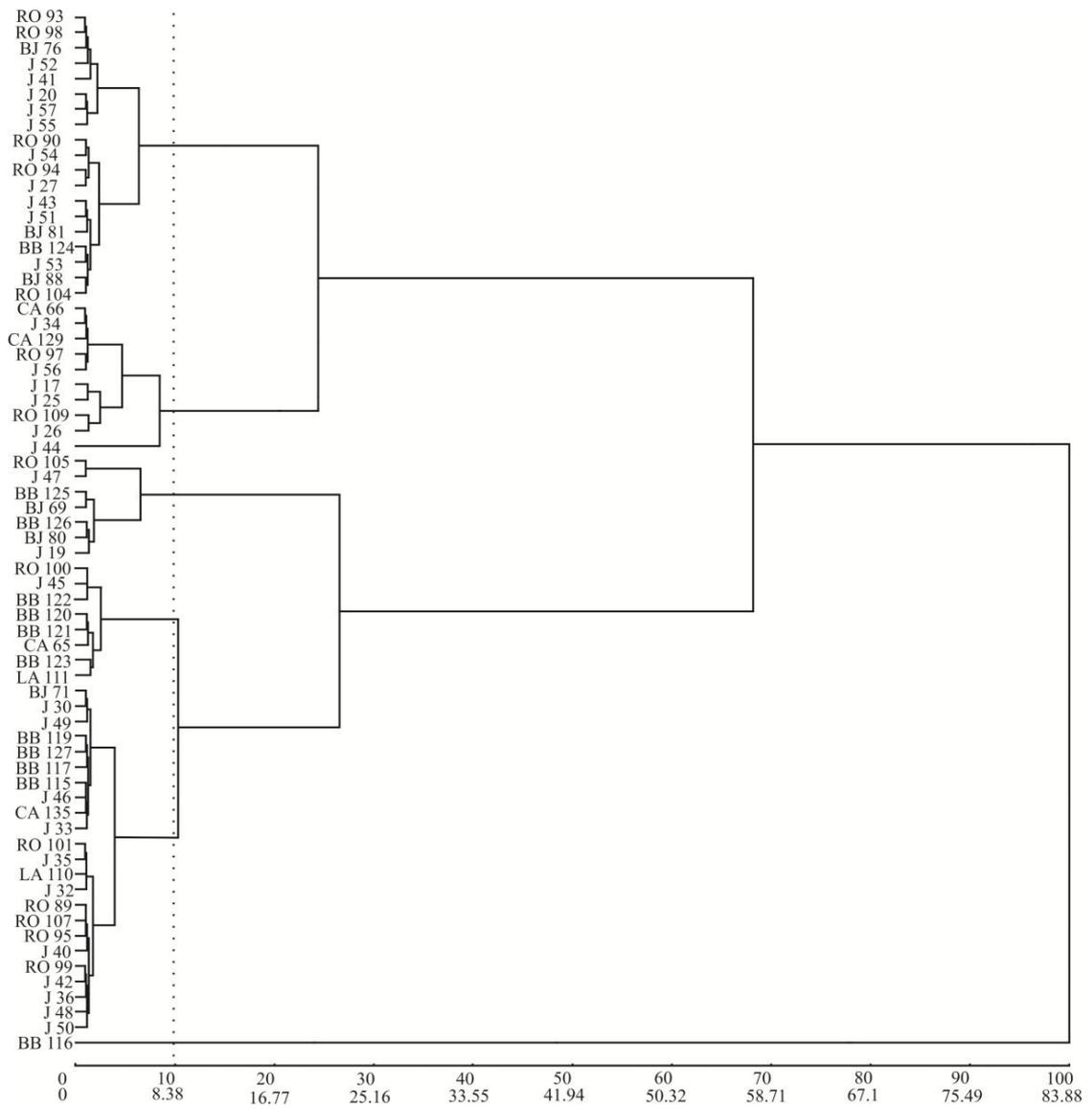
ANEXOS

ANEXO A. Dendrogramas representativos da dissimilaridade genética entre 68 acessos de amburana (*Amburana cearensis*) utilizando os métodos de agrupamento: Gower (A), Ligação média (B), UPGMA (C), Ward (D), Vizinho mais distante (E) e WPGMA (F) a partir das distâncias euclidianas obtidas, em diferentes locais no estado de Pernambuco. Uberlândia- MG, 2019.

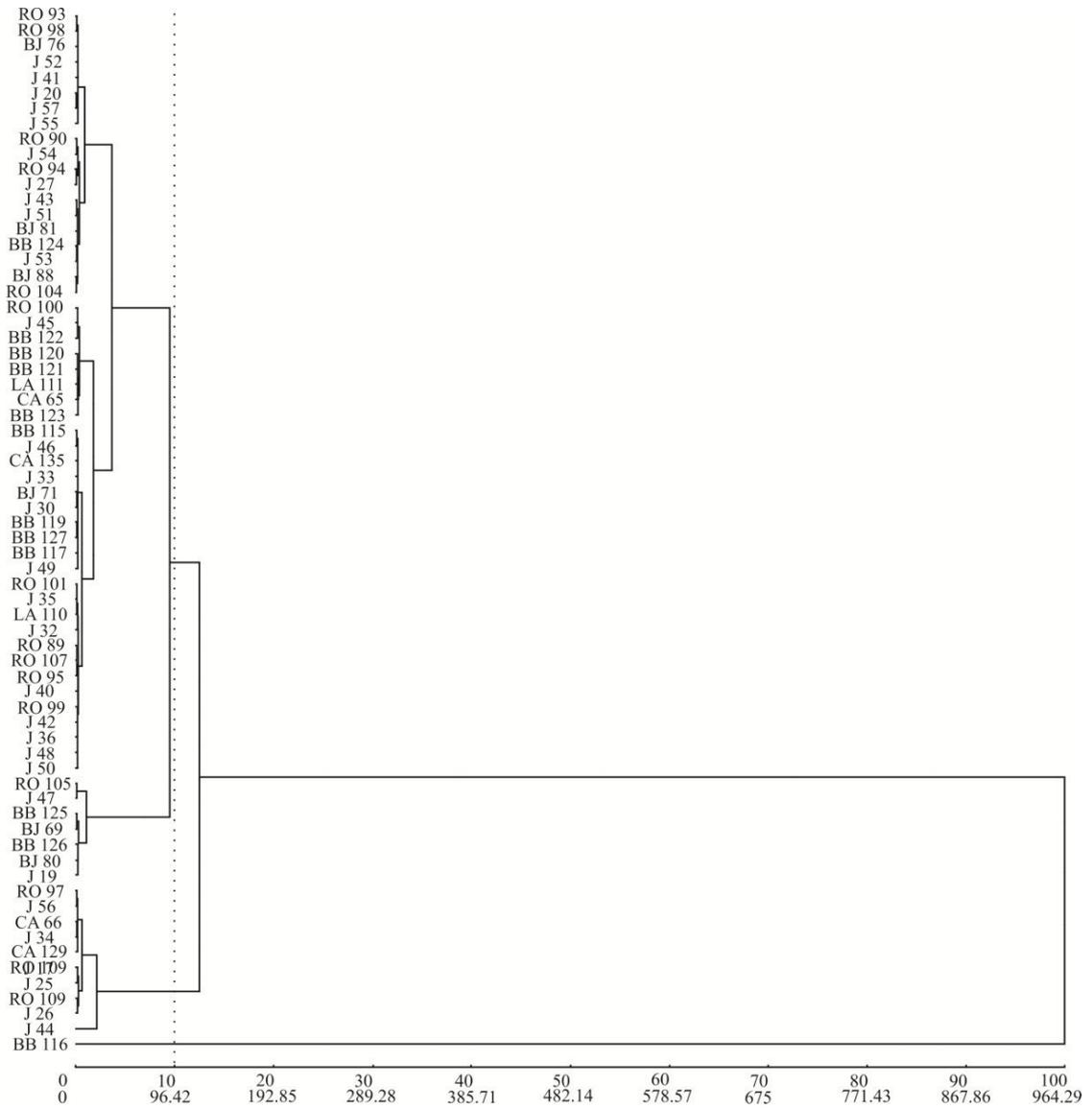
A)



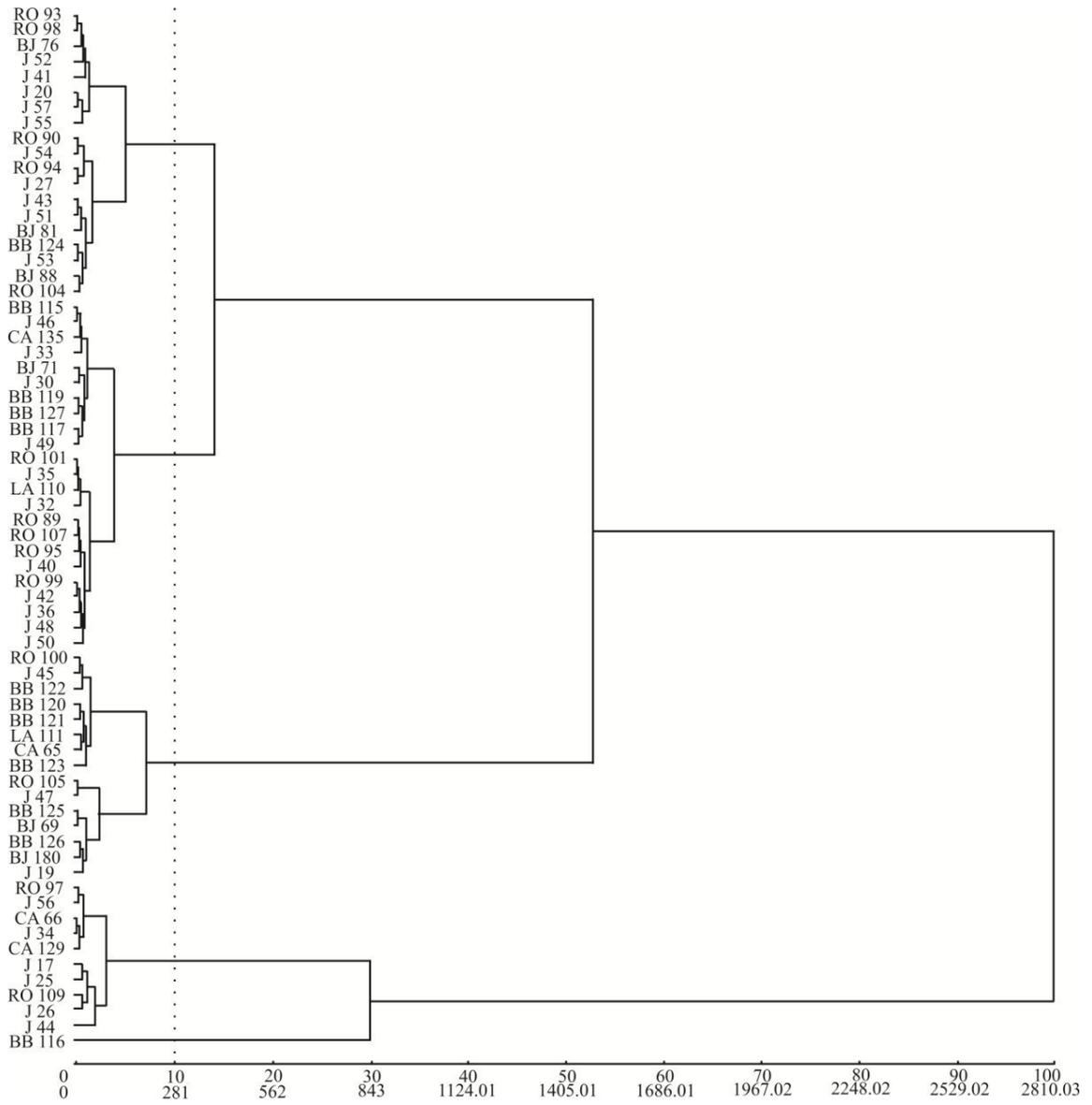
B)



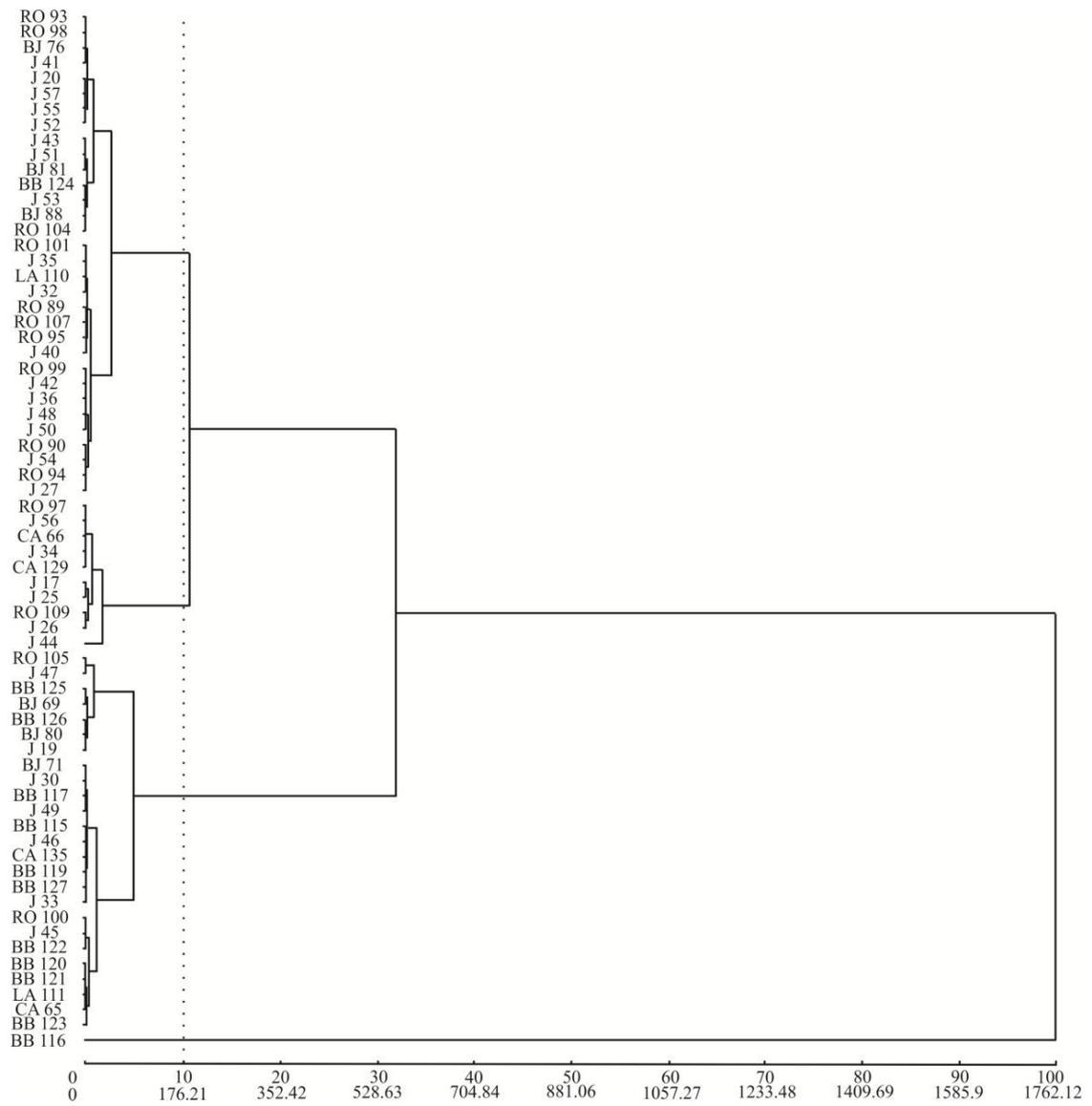
C)



D)



E)



F)

