



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

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DA AROEIRA (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão)  
E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DA BARAÚNA (*Schinopsis brasiliensis* Engl.)

FERNANDO SIMONI BACILIERI

2019

FERNANDO SIMONI BACILIERI

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DA AROEIRA (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão)  
E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DA BARAÚNA (*Schinopsis brasiliensis* Engl.)

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

Orientador

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

Coorientadora

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.

---

B125c      Bacilieri, Fernando Simoni, 1977-  
2019      Conservação *in vitro* da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão) e estabelecimento *in vitro* da baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) [recurso eletrônico] / Fernando Simoni Bacilieri. - 2019.

Orientador: José Magno Queiroz Luz.  
Coorientadora: Ana Valéria Vieira de Souza.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.3605>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

I. Agronomia. I. Luz, José Magno Queiroz, 1967-, (Orient.).  
II. Souza, Ana Valéria Vieira de, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU: 631

FERNANDO SIMONI BACILIERI

CONSERVAÇÃO IN VITRO DA AROEIRA (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão)  
E ESTABELECIMENTO IN VITRO DA BARAÚNA (*Schinopsis brasiliensis* Engl.)

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

Aprovado em 28 de junho de 2019.

Dra. Roberta Carmargos de Oliveira

UFU

Dr. Berildo de Melo

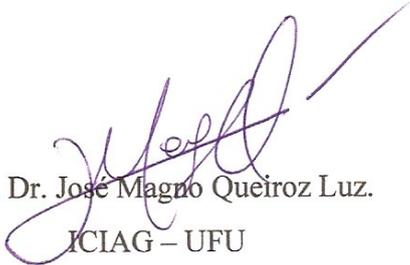
UFU

Dra. Ana Valéria Vieira de Souza

EMBRAPA

Dra. Alcione Silva Arruda

UEG

  
Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz.

ICIAG – UFU

(Orientador)

UBERLÂNDIA

MINAS GERAIS - BRASIL

2019

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Ivone e Luiz, a minha esposa Ketlin e ao meu filho Miguel.

## **OFEREÇO**

Aos estudantes de agronomia, aos agricultores e aos profissionais do campo!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ivone e Luiz Roberto os mestres da vida que me ensinaram princípios e valores para vida toda.

Aos meus irmãos Fábio e Flávio eternos companheiros de caminhada e evolução. Minha amada esposa Ketlin e meu filho Miguel pelo amor incondicional.

Aos mentores que participaram da minha formação desde o início como a tia Regina do pré-zinho até hoje com destaque aos professores da etapa da graduação da Universidade de Taubaté Adriana Labinas, Alecssandra de Almeida, Ana Aparecida, Antônio Cortez, Daniel Balesteiros, Getúlio Batista, Marcos Furlan, Ricardo Silva, Vicente Jesus de Carvalho (*in memoriam*) e aos professores do doutorado que não posso deixar de agradecer Regina Lana, José Geraldo Mageste, Gaspar Korndörfer, Denise Santana, Adriane de Andrade muito obrigado pela experiência, pelos ensinamentos e a amizade compartilhada. Também ao meu orientador, professor José Magno Queiroz Luz pela paciência e direcionamento.

Aos mentores de uma nova maneira de viver Valente (*in memoriam*) e Armando Tofanelo (*in memoriam*) por não me deixarem sozinho e pelo direcionamento na vida.

Aos companheiros de laboratório de cultura de tecidos onde passamos longos períodos, sem os quais esse trabalho não seria realizado Herick, Rayssa e Simone.

Aos funcionários da secretária da pós-graduação Eduardo, Cida, Yara, Mariana e Palloma que sempre me atenderam prontamente.

Aos amigos e colegas da pós-graduação Bruno Nicchio, Danyela, Daniel Magalhães, Ernane, Gustavo, João Eduardo, Rafael Assis e Roberta, obrigado pelo apoio e ajuda durante este doutorado, e pela amizade.

À Universidade de Taubaté que me formou como Engenheiro Agrônomo e a Universidade Federal de Uberlândia que me tornou mestre e doutor em agronomia.

A Embrapa Semiárido especialmente a Dra. Ana Valéria, Juliana e o Flavio pela etapa conduzida em Petrolina e todo apoio para realização desta pesquisa.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro fundamental para realização deste doutorado.

Aos membros da banca por deixarem de lado suas atribuições pessoais e me fornecerem suas experiências, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

Agradeço, enfim, a todos que de uma forma ou de outra não atrapalharam para realização deste trabalho! A todos vocês, meu muito obrigado!!!

“Deus conceda-me serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para reconhecer a diferença”

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	6
CAPÍTULO 1.....	13
Conservação e retomada de crescimento de Aroeira ( <i>Myracrodruon urundeuva</i> ) .....	13
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4 CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2.....	29
Desinfestação e estabelecimento de Aroeira ( <i>Myracrodruon urundeuva</i> ).....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4 CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 3.....	44
Multiplicação, morfogênese e abscisão foliar <i>in vitro</i> de Baraúna ( <i>Schinopsis brasiliensis</i> ).....	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	44
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	60

## LISTA DE TABELAS

### PÁGINA

- 1 Osmorreguladores e concentrações utilizadas para a conservação de aroeira *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019. 16
- 2 Osmorreguladores e regulador vegetal utilizados para a conservação de aroeira *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019. 17
- 3 Número de folhas verdes e número de folhas secas de segmentos nodais de aroeira submetidos a diferentes agentes osmóticos aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019. 18
- 4 Percentagem de calos e percentagem de sobrevivência de segmentos nodais de aroeira submetidos a diferentes agentes osmóticos aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019. 20
- 5 Taxa de sobrevivência e número de folhas verdes de segmentos nodais de aroeira submetidos a doses de dois agentes osmóticos e um regulador vegetal aos 60 e 120 dias de conservação *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019. 21
- 6 Médias da taxa de sobrevivência (TS), número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA) e biomassa (MF) de segmentos nodais de aroeira submetidos a crescimento lento com dois agentes osmóticos e um regulador vegetal aos 60 dias de retomada do crescimento. Uberlândia-MG, 2019. 23
- 7 Tratamento com produtos químicos utilizados para desinfestação de aroeira. Uberlândia-MG, 2019. 33
- 8 Reguladores vegetais e concentrações utilizadas para o estabelecimento de aroeira. Uberlândia-MG, 2019. 34
- 9 Taxa de sobrevivência (%), contaminação (%) e fitotoxicidade de segmentos nodais de aroeira submetidos ao tratamento para desinfestação. Uberlândia-MG, 2019. 35
- 10 Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm) e biomassa (g) de aroeira submetidos ao tratamento com reguladores vegetais. Uberlândia-MG, 2019. 37

- 11 Tratamentos utilizados para estabelecimento *in vitro* de baraúna. Petrolina - PE, 2019. 48
- 12 Tratamentos utilizados para estabelecimento *in vitro* de baraúna. Petrolina - PE, 2019. 49
- 13 Tratamentos utilizados para redução da abscisão de baraúna. Petrolina - PE, 2019. 49
- 14 Comprimento de brotos, número de brotos e número de gemas de baraúna em função de diferentes auxinas adicionadas a zeatina em diferentes concentrações. Petrolina - PE, 2019. 52
- 15 Comprimento de brotos, número de brotos e número de gemas e abscisão foliar de baraúna em função de diferentes citocininas adicionadas ao meio em diferentes concentrações. Petrolina - PE, 2019. 53
- 16 Comprimento do broto (cm), número de gemas e abscisão foliar de plântulas de baraúna submetidos ao tratamento com inibidores de etileno. Petrolina-PE, 2019. 56

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
1 Plantas de aroeira obtidas da germinação das sementes (A). Preparação de segmentos nodais de aroeira (B), Uberlândia- MG, 2019.	32
2 Frascos contaminados (A). Escala de fitotoxicidez de produtos químicos utilizados para desinfecção de segmentos nodais de aroeira (B), Uberlândia- MG, 2019.	34
3 Plantas de baraúna obtidas da germinação das sementes (A). Plantas de baraúna estabelecidas <i>in vitro</i> no momento da avaliação (B). Frascos com explantes na câmara de crescimento, Uberlândia- MG, 2019.	47
4 Comprimento de brotos de baraúna em função de diferentes concentrações de zeatina. Petrolina-PE, 2019.	54
5 Abscisão foliar de baraúna em função de diferentes concentrações de zeatina. Petrolina-PE, 2019.	55
6 Abscisão foliar de baraúna em função de diferentes concentrações de BAP. Petrolina-PE, 2019.	55
7 Abscisão foliar de plântulas de baraúna em função de diferentes concentrações de nitrato de prata. Petrolina-PE, 2019.	57
8 Abscisão foliar de plântulas de baraúna em função de diferentes concentrações de cloreto de cobalto. Petrolina-PE, 2019.	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ácido abscísico	ABA
Ácido 3-indolacético	AIA
Ácido indolbutírico	AIB
Ácido naftalenoacético	ANA
Benzilamino purina	BAP
Centímetro	cm
Coefficiente de variação	CV
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	EMBRAPA
Gramas	g
Gramas por litro	g L <sup>-1</sup>
Graus Celsius	°C
Metro	m
Micrograma por litro	µL <sup>-1</sup>
Micromolar	µM
Miligramas por litro	mg L <sup>-1</sup>
Mililitros	mL
Milímetros	mm
Minas Gerais	MG
Ministério do Meio Ambiente	MMA
Mol por metro quadrado por segundo	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
Murashige e Skoog,	MS
Porcentagem	%
Pernambuco	PE
Polivilpirrolidona	PVP
Potencial hidrogeniônico	pH
Quilograma força por centímetro quadrado	kgf cm <sup>-2</sup>
Ultravioleta	UV
Universidade Federal de Uberlândia	UFU
Volume por volume	v/v
Woody Plant Medium	WPM
Zeatina	ZEA

## RESUMO

BACILIERI, FERNANDO SIMONI. **Conservação *in vitro* da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão) e estabelecimento *in vitro* da baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.).** 2019. 80 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG<sup>1</sup>.

A aroeira e a baraúna estão na lista oficial das espécies vegetais brasileiras ameaçadas de extinção e a cultura de tecidos pode ser empregada para conservação e micropropagação dessas espécies. Contudo, objetivou-se avaliar a conservação *in vitro* de aroeira por crescimento lento com posterior retomada de crescimento; comparar tratamentos químicos na assepsia de segmentos nodais de aroeira; testar reguladores de crescimento no estabelecimento da aroeira; analisar diferentes citocininas em concentrações distintas e zeatina combinada a auxinas no estabelecimento e desenvolvimento da baraúna e verificar inibidores de etileno sobre o desenvolvimento e a abscisão foliar da baraúna. Os experimentos com a aroeira e a Baraúna foram realizados, respectivamente, no Laboratório de Biotecnologia em Uberlândia- MG e na Embrapa Semiárido (Petrolina-PE). Na conservação de aroeira foi utilizado o meio de cultura MS (50%) e avaliados: osmorreguladores: manitol e sorbitol nas concentrações 10 e 20 g L<sup>-1</sup> e sacarose nas concentrações 30 e 40 g L<sup>-1</sup> adicionados ao meio no primeiro experimento. Já no segundo, reduziu-se as concentrações de manitol e sorbitol para 5 e 10 g L<sup>-1</sup> comparados entre si e ao regulador vegetal e ácido abscísico a 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, as poliaminas: putrescina, espermina e espermidina nas concentrações 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> foram testados para o estabelecimento da aroeira. Nos experimentos de baraúna utilizou-se o meio WPM. Para a multiplicação dois experimentos foram realizados, no primeiro zeatina (ZEA) e 6-benzilamino purina (BAP) foram comparadas nas concentrações 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 µL<sup>-1</sup> e no segundo zeatina (ZEA) nas concentrações 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 µL<sup>-1</sup> foi combinada as concentrações de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,5 µL<sup>-1</sup> de ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB). Por fim, os inibidores de etileno nitrato de prata e o cloreto de cobalto nas concentrações de 5; 10; 20 e 40 µM foram comparados para a redução da abscisão foliar da baraúna. Na etapa de conservação, sacarose na dose de 40 g L<sup>-1</sup> adicionada ao meio de cultura aumenta a quantidade de calos e reduz a sobrevivência de explantes de aroeira e o manitol afeta negativamente a retomada de crescimento dos explantes. A poliamina espermina promove o crescimento da parte aérea e na concentração 0,1 mg L<sup>-1</sup> proporciona maior números de folhas e comprimento de raiz. A partir de 0,2 µL<sup>-1</sup> de ANA e 0,4 µL<sup>-1</sup> de ZEA ocorre maior número de brotos de baraúna. O AIA é a auxina mais adequada a ser associada a ZEA para maior comprimento de brotos e número de gemas. O comprimento dos brotos e número de gemas não são influenciados pelo nitrato de prata e cloreto de cobalto nas concentrações avaliadas. Nas concentrações de 5 e 10 µM o cloreto de cobalto é mais eficiente que o nitrato de prata para a redução da abscisão foliar da baraúna. O nitrato de prata a partir da concentração de 20 µM evita completamente a abscisão foliar enquanto o cloreto de cobalto tem máxima redução da abscisão na concentração 40 µM.

**Palavras-chave:** crescimento lento, assepsia, inibidores de etileno, poliaminas.

---

Comitê Orientador: José Magno Queiroz Luz- UFU e Ana Valéria Vieira de Souza

## ABSTRACT

BACILIERI, FERNANDO SIMONI. *In vitro* conservation of aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão) and *in vitro* establishment of barauna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). 2019. 80 p. Thesis (Ph.D. in Agronomy / Plant Science) - University of Uberlândia. Uberlândia<sup>1</sup>.

Aroeira and barauna are on the official list of Brazilian plant species threatened with extinction and tissue culture can be used for the conservation and micropropagation of these species. However, the objective was to evaluate the *in vitro* conservation of aroeira by slow growth with later resumption of growth, compare chemical treatments in asepsis of mastic nodal segments; test growth regulators in the establishment of aroeira; analyze different cytokinins in different concentrations and zeatin combined with auxins in the establishment and development of barauna; and verify ethylene inhibitors on the development and leaf abscission of barauna. The experiments with aroeira and Barauna were carried out, respectively, at the Biotechnology Laboratory in Uberlândia-MG and at Embrapa Semiárido (Petrolina-PE). In the preservation of aroeira the culture medium MS (50%) was used and evaluated: osmoregulators: mannitol and sorbitol in concentrations 10 and 20 g L<sup>-1</sup> and sucrose in concentrations 30 and 40 g L<sup>-1</sup> added to the medium in the first experiment. In the second, the concentrations of mannitol and sorbitol were reduced to 5 and 10 g L<sup>-1</sup> compared to each other and to the plant regulator and abscisic acid to 1,0 and 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Subsequently, the polyamines: putrescine, spermine and spermidine in concentrations 0,5 and 1,0 mg L<sup>-1</sup> were tested to establish the aroeira. In the barauna experiments, the WPM medium was used. For the multiplication two experiments were carried out, in the first zeatin (ZEA) and 6-benzylamino purine (BAP) were compared in concentrations 0; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8 and 1.0 µL<sup>-1</sup>, and in the second zeatin (ZEA) at concentrations 0.2; 0.4; 0.8 and 1.0 µL<sup>-1</sup> concentrations of 0,1 were combined; 0.2; 0.4 and 0.5 µL<sup>-1</sup> of 3-indolacetic acid (IAA), naphthalene acetic acid (NAA) and indolbutyric acid (IBA). Finally, ethylene inhibitors silver nitrate and cobalt chloride at concentrations of 5; 10; 20 and 40 µM were compared to reduce leaf abscission in barauna. In the conservation stage, sucrose at a dose of 40 g L<sup>-1</sup> added to the culture medium increases the amount of calluses and reduces the survival of mastic explants and mannitol negatively affects the resumption of growth of explants. The polyamine spermine promotes the growth of the aerial part and in the concentration 0,1 mg L<sup>-1</sup> provides greater number of leaves and root length. From 0,2 µL<sup>-1</sup> of NAA and 0,4 µL<sup>-1</sup> of ZEA, a greater number of barauna shoots occurs. IAA is the most suitable auxin to be associated with ZEA for longer shoot length and number of buds. The length of the shoots and number of buds are not influenced by silver nitrate and cobalt chloride at the concentrations evaluated. At concentrations of 5 and 10 µM, cobalt chloride is more efficient than silver nitrate for reducing leaf abscission in barauna. Silver nitrate from a concentration of 20 µM completely avoids leaf abscission while cobalt chloride has a maximum reduction in abscission at a concentration of 40 µM.

**Key words:** asepsis, ethylene inhibitors, polyamines, slow growth.

---

Committee Advisor: José Magno Queiroz Luz- UFU and Ana Valéria Vieira de Souza

## INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Caatinga é o único exclusivamente brasileiro e é considerado um patrimônio biológico de imensurável valor devido a diversidade e riqueza da fauna e flora (DRUMOND, 2013). A heterogeneidade florística das paisagens reflete adaptações marcantes da flora a condições locais de clima e solo (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

O estudo e a conservação da biodiversidade da Caatinga são desafiadores, uma vez que há limitadas informações de pesquisa dessa região, sendo ainda, do ponto de vista ambiental, pouco protegida (apenas 1% do seu território apresentam unidades de conservação (ARCOVERDE et al., 2014).

As plantas nativas e com propriedades medicinais foram negligenciadas por décadas. No entanto, novos olhares e considerações tem sido lentamente voltado para os benéficos e potencialidades a partir da década de 80. Além dos aspectos agrônômicos de algumas arvores, com destaque para a qualidade da madeira, é crescente os relatos na literatura de propriedades terapêuticas, com diversas possibilidades de uso (XAVIER et al., 2015; MESQUITA et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

A exploração das espécies benéficas encontradas nas áreas da Caatinga tem ocorrido de forma extrativista, com a ampliação da extração e não restauração das áreas. A retirada descontrolada, irracional e irresponsável ao longo das décadas promoveu considerável pressão sob as populações das espécies, sendo algumas delas consideradas criticamente ameaçada em extinção (CNCFLORA, 2012). Pode-se citar como exemplos de espécies com grande aptidão de uso e em risco de extinção: a aroeira e a baraúna.

A aroeira, aroeira do sertão ou urundeúva (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) é uma planta caducifólia, exigente em luminosidade, com capacidade de viver em condições de clima semiárido e com tamanho que varia conforme a região de sua ocorrência (LORENZI, 2002; ANDRADE et al., 2000), podendo atingir 30 m de altura e até 1 m de diâmetro. Essa espécie possui plasticidade adaptativa, podendo ser encontrada em diferentes fitofisionomias brasileiras, desde ambientes úmidos a secos (MATIAS et al., 2017).

A aroeira possui frutos do tipo drupa globosa ou ovóide, com cálice persistente, considerado um fruto-semente (FIGUEIRÔA et al., 2004). A semente é única (0,2 a 0,4 cm de diâmetro), globosa, desprovida de endosperma, com epicarpo castanho escuro, mesocarpo castanho, carnosos, resinífero, com odor característico e tegumento membranáceo (MEDEIROS, 2000; ALMEIDA et al., 1998).

Plantas da família Anacardiaceae, como a aroeira, apresentam destacado papel socioeconômico. A sua madeira possui expressiva resistência mecânica e não apodrece facilmente, o que a torna desejável em construção e móveis (PAES et al., 2009).

As atividades medicinais de aroeira relacionam-se as chalconas diméricas: urundeuvina A, B, C e matosinha (BANDEIRA et al., 2003), cujo extrato apresentou potencial atividade antimicrobiana no biofilme dental e antifúngica sobre cepas de *Candida* isoladas da cavidade oral (ALVES et al., 2009). Frações de chalconas isoladas do tronco e da casca apresentam ação neuroprotetora (NOBRE JUNIOR et al., 2009); efeito antiulcerogênico e protetor da mucosa gástrica (CARLINI et al. 2010); entre vários outros usos, considera-se os extratos de folhas com forte atividade antioxidante e atividade antimicrobiana moderada (MOTA et al., 2015).

A aroeira pode ser utilizada também como combustível na forma de lenha ou carvão, forrageira na utilização das folhas para a alimentação dos rebanhos, principalmente do bovino e caprino, com uso veterinário destinado ao tratamento de inflamações gerais e para limpar o útero de vacas após o parto, como planta ornamental, para restauração florestal, em sistemas agroflorestais, aplicações industriais, como curtumes, pelo seu elevado teor de tanino (MAIA, 2006).

Durante o período seco na caatinga, os grãos de pólen da aroeira fornecem majoritariamente o néctar para *Apis mellífera*. O mel produzido nesta região é caracterizado como mel de *M. urundeuva* (aroeira) devido à escassez de recursos florais, como altas temperaturas e baixa umidade, induzindo as abelhas a procurar essas fontes massivas de alimentos para garantir seu alimento (BASTOS et al., 2016). O mel da aroeira apresenta boa qualidade e características próprias, como cor escura, umidade baixa e menos pH e acidez ácidos, o que torna uma potencial fonte de renda e estímulo à produção e valorização de produtos locais (SANTOS et al., 2018).

As sementes de aroeira são tolerantes a uma ampla faixa de temperaturas e potenciais osmóticos. Contudo, o potencial destas variam com a qualidade fisiológica dos lotes. Estudos com a espécie levantaram modelos climáticos que indicam que as alterações no clima afetarão a germinação das sementes, e, em consequência da sua conservação (OLIVEIRA et al., 2019).

A *Schinopsis brasiliensis* popularmente conhecida como baraúna, braúna, braúna-do-sertão, braúna-parda, quebracho, chamacoco e chamucoco também pertence à família Anacardiaceae. A espécie apresenta porte arbóreo e pode atingir até 15 m de altura e 60

cm de diâmetro com ramos providos de espinhos e tronco reto (CARVALHO, 2009; LORENZI, 2002).

A baraúna apresenta folhas compostas, imparipinadas de cor verde escuras na parte superior e pálidas na inferior. As flores são pequenas, brancas, glabras e suavemente perfumadas. O fruto é uma drupa alada de coloração castanho-claro e cheia de massa esponjosa. A semente tem cor amarelo-claro e superfície rugosa baça a qual é envolta por um tegumento lenhoso (caroço) difícil de ser rompido (CARVALHO, 2009; BRAGA, 1976).

A baraúna também possui múltiplas utilizações, com elevado uso madeireiro (especialmente procurada por seus usos em construções rurais e domésticas), medicinal, paisagístico (urbana ou rural) e veterinário (CARVALHO, 2009). A madeira devido a dureza do cerne tem resistência a fungos xilófagos (PAES et al., 2004), por isso é considerada madeira de lei por diversos autores (FERRAZ et al., 2006; RAMOS et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

Baraúna é amplamente utilizado na medicina tradicional (folhas, casca, caule, entrecasca, resina e frutos) para fins anti-inflamatórios, analgésicos, hemostáticos, antissépticos e antimicrobianos. Estudos fitoquímicos mostraram a presença de polifenóis, flavonoides e taninos (FERNANDES et al., 2015; MEDEIROS et al., 2018). Dentre os usos, destacam-se a ação anticoagulante (GOMES; BANDEIRA, 2012) e alívio de distúrbios gástricos e problemas hepáticos (RIBEIRO et al., 2014). O chá da casca triturada é usado para dor nos dentes e na cabeça (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Atualmente a baraúna é considerada uma árvore nobre. Devido ao quase esgotamento das reservas de baraúna é proibido a coleta, transporte, armazenamento, manejo, beneficiamento e comercialização dessa espécie (MARTINELLI; MORAES, 2013; BRASIL, 2014; BRITO et al., 2018). Somado a perda gradual da variabilidade genética para as espécies citadas, o estabelecimento de mecanismos para preservação *in situ* e/ou *ex situ* configura estratégia para manutenção de espécies de notável potencial econômico e ambiental (SANTOS et al., 2017).

A conservação de recursos genéticos *in situ* é um método de conservação que visa preservar os ecossistemas e os habitats naturais com a manutenção e a reconstituição de populações viáveis de espécies de interesse nos seus ambientes naturais e, no caso de espécies domesticadas e cultivadas, nos ambientes onde desenvolveram seus caracteres distintos (SIMON, 2010). Já na conservação *ex situ* é encontrada na natureza em pequenos fragmentos florestais, com frequência, em distribuição agrupado, em forma de manchas,

constituído por menos de cem indivíduos. Neste processo, ocorre expressiva perda de variabilidade genética (endogamia), com reduções na capacidade adaptativa, vigor, porte e produtividade (COSTA et al., 2015).

Para ampliar as possibilidades de expansão dessas espécies e atender a pressão imposta pela demanda crescente de recursos naturais, a obtenção de madeira e produtos farmacológicos poderia ser originada de árvores plantadas em sistemas agroflorestais ou florestas com gestão sustentáveis (RODRIGUEZ et al., 2017).

Segundo Brito et al. (2018) há carência de informações sobre o estabelecimento de protocolos de produção de mudas que possam servir de apoio para empreendimentos, tanto com fins comerciais como conservacionistas (CRUZ et al, 2016). Para tanto, faz-se necessário ampliação dos estudos sobre formas de conservação e multiplicação das espécies de modo tradicional ou ainda, por meio de métodos biotecnológicos, como a cultura de tecidos.

A conservação *ex situ* de germoplasma *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório a partir da técnica da cultura de tecidos (GEORGE, 1993; NASCIMENTO et al., 2015). A manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerado uma forma alternativa a conservação, especialmente para espécies nativas ameaçadas de extinção que têm limitada capacidade reprodutiva e/ou existem em habitats ameaçados, permitindo que o material vegetal de interesse fique disponível para recuperação ou uso futuro (ROCA et al., 1991). Figueiredo e Takita (2004) mencionam que esse método é vantajoso porque permite manter grande número de plantas em um espaço pequeno com redução de perdas genéticas e custos.

O crescimento lento envolve a redução do metabolismo das plantas. O cultivo envolve a utilização de meristemas e/ou ápices caulinares submetidas a ambientes com modificações nas condições físicas (temperatura e luminosidade) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (ARRIGONI-BLANK et al., 2014). O sucesso da técnica requer o desenvolvimento de protocolos específicos para cada tipo de espécie, acessos e explantes (WATT et al., 2004).

A micropropagação é uma modalidade dentro da cultura de tecidos que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas (CARVALHO et al., 2006). Pode ser definida como o cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais em condições assépticas, por períodos indefinidos num meio de cultura apropriado (SERAFINI et al. 2001; DE ANDRADE, 2007). A técnica é baseada na totipotencialidade da célula vegetal,

ou seja, na sua capacidade de, por si só, originar uma nova planta, devido às mesmas encerrarem em seu núcleo toda informação genética para isto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação envolve os seguintes estágios: início da cultura (dependente do tipo de explante ou da planta doadora); multiplicação de brotações (crucial e alcançada usando reguladores de crescimento de plantas); crescimento das brotações, com subsequente enraizadas *ex vitro* ou *in vitro* e aclimação das plantas cultivadas *in vitro* (SHAHZAD et al., 2017; BRIDGEN et al., 2018).

O controle e a prevenção de contaminações por microrganismos apresentam elevado destaque no cultivo *in vitro* (GOLLE et al., 2013). Nesse sentido, a assepsia configura etapa primordial para o estabelecimento adequado das plantas micro propagadas (SILVA et al., 2019). Para o estabelecimento *in vitro* do material a ser conservado ou multiplicado é necessário determinar a metodologia mais adequada para desinfestação dos explantes (FERREIRA et al., 2009).

Os microrganismos contaminantes competem pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000). Na literatura, inclusive, observa-se a recomendação de controle fitossanitário (fungicidas e bactericidas), antes da coleta dos explantes para a redução da contaminação no cultivo *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013).

Vários elementos influenciam no comportamento da cultura *in vitro*, tais como, fatores biológicos (tipo e condição fisiológica do explante, características genéticas), químicos (composição do meio de cultura, pH, reguladores de crescimento) e físicos (temperatura, luminosidade, fotoperíodo) entre outros (ANDRADE, 2000). Testes realizados em trabalhos sobre conservação de germoplasma *in vitro* por crescimento lento estão relacionados a adição de diferentes concentrações de retardadores de crescimento como de ácido abscísico ao meio de cultura; e/ou adição de agentes osmóticos como o manitol, sorbitol e sacarose (PIRES, 2017).

Assim que estão estabelecidos *in vitro*, os explantes passam para a etapa de multiplicação, que é a fase mais longa da micropropagação e visa a produzir o maior número possível de plantas uniformes e de alta qualidade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Nesta etapa, para maior eficiência pode-se fazer a combinação entre reguladores vegetais. A necessidade de reguladores, bem como ao tipo, concentração são

variáveis com a resposta da espécie, de acordo com seu conteúdo endógeno de hormônios e a sensibilidade aos compostos utilizados (LIMA et al., 2008).

O desenvolvimento de técnicas de propagação para plantas nativas é importante para evitar o extrativismo insustentável e a extinção de espécies. Os conhecimentos obtidos por meio do estabelecimento de protocolos e metodologias específicos facilitam a domesticação, melhoramento e propagação de genótipos de interesse (PÊGO et al., 2014). Contudo, é possível otimizar a produção de mudas saudáveis em larga escala, com sanidade e identidade genética garantidas (WINHELMANN et al., 2019).

Apesar das pronunciadas vantagens, observa-se a necessidade de superar diversos obstáculos no processo de conservação *in vitro* e micropropagação de espécies nativas. Desta forma, objetivou-se avaliar a conservação *in vitro* de aroeira por crescimento lento com posterior retomada de crescimento; comparar tratamentos químicos na assepsia de segmentos nodais de aroeira; testar reguladores de crescimento no estabelecimento da aroeira; analisar diferentes citocininas em concentrações distintas e zeatina combinada a auxinas no estabelecimento e desenvolvimento da baráuna e verificar inibidores de etileno sobre o desenvolvimento e a abscisão foliar da baráuna.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, H. N.; FIGUEREDO, D. J. C.; CERQUEIRA, J. S. Os vegetais com potencial fitoterápico do complexo Aluizio Campos, **Revista Brasileira de Informação Científica**, Campina Grande, v. 3, n. 2, p. 17–26, 2012.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Embrapa-CPAC, Planaltina, v. 464, 1998.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000200028>

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

ANDRADE, L. A.; OLIVEIRA, F. X.; NEVES, C. M.; FELIX, L. P. Análise da vegetação sucessional em campos abandonados no Agreste Paraibano. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 2, p. 135-142, 2007. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v2i2a40>

ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P. A.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, England, v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.900497>

ARRIGONI-BLANK, M. F.; TAVARES, F. F.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. C.; MENEZES, T. S.; SANTANA, A. D. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, New York, v. 1, p. 1-7, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/208506>

BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. Structural elucidation and total assignment of the H and C NMR spectra of new chalcone dimers. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Bucknell, v. 41, p. 1009-1014, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrc.1292>

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. **Coleção Mossoroense**, V., Fortaleza, v. 315, p. 540, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 443, de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 dez. 2014. Seção 3, 25 p.

BASTOS, M. A. F.; CALAÇA, P. S. S. T.; SIMEÃO, C. M. G.; CUNHA, M. R. R. Characterization of the honey from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae - Aroeira) in the Dry Forest of northern of Minas Gerais/Brazil. **Advances in Agricultural Science**, Oregon, v. 4, n. 1, p. 64-71, 2016.

BRIDGEN, M. P.; VAN HOUTVEN, W.; EECKHAUT, T. Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. **Ornamental Crops**, Springer, Cham, p. 127–144, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0_6)

BRITO, L. P. S.; BEZERRA, T. T.; NUNES, E. M. B.; CAVALCANTE, M. Z. B.; SIQUEIRA FILHO, J. A. Produção de mudas de *Schinopsis brasiliensis* Engler sob prévia lavagem do pó de coco e submetidas a doses crescentes de fertilizante de liberação controlada. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 1022-1034, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509833385>

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA. *Myracrodruon urundeuva* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Myracrodruon%20urundeuva>. Acesso em: 23 fev. 2018.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 28p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148) 2006.

CARVALHO, P. E. R. Braúna-do-sertão *Schinopsis brasiliensis*. Colombo, PR: Embrapa Floresta, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Colombo, PR: Embrapa Floresta, 2003.

COSTA, R. B.; LOPES, A.; ZORZ, A.; DINIZ, F.; GOMES, J.; NICACIO, P.; FONSECA, F. **Fragmentação florestal e reprodução de espécies arbóreas: Múltiplos olhares sobre a biodiversidade**. Cuiabá, MT: Carlini & Caniato Editorial, p. 9-31, 2015.

CRUZ, F. R. S.; ANDRADE, L. A.; FEITOSA, R. C. Produção de mudas de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) em diferentes substratos e tamanho de recipientes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 69-80, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509821092>

DE ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados-Documents (INFOTECA-E), 2002.

DRUMOND, M. A. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa et al. (org.) **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Edição Universitária, cap.1, p. 1-18, 2013.

FERNANDES, F. H. A.; BATISTA, R. S. A.; MEDEIROS, F. D.; SANTOS, F. S.; MEDEIROS, A. C. D. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 25, p. 208–211, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.006>

FERNANDES, M. F.; QUEIROZ, L. P. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 70, p. 51-56, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21800/2317-66602018000400014>

FERRAZ, J. S. F.; ALBUQUERQUE, U. P.; MEUNIER, I. M. J. Valor de uso e estrutura da vegetação lenhosa às margens do riacho do Navio, Floresta, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 20, n. 1, p. 125-134, 2006.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuazeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2009.

FIGUEIREDO, L. H. M.; TAKITA, M. A. Cultura de tecidos e transformação genética de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n. 2, p. 439-459, 2004.

FIGUEIRÔA, J. M.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 18, n. 3, p. 573-580, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000300015>

GEORGE, E.F. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. - The technology. 2 ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p. UPTA, P.; JAIN, V.; PAREEK, A.; KUMAR, P.; SINGH, R.; AGARWAL, P.; SHARM, V. Evaluation of effect of alcoholic extract of heartwood of *Pterocarpus marsupium* on in vitro antioxidant, anti-glycation, sorbitol accumulation and inhibition of aldose reductase activity. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, Taipei, v. 7, n. 3, p. 307-314, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.11.001>

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; BELLÉ, R. A.; CURTI, A. R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Revista Cerne**, Lavras, v. 19, p. 77-82, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-77602013000100010>

GOMES, T. B.; BANDEIRA, F. P. S. F. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia. **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 26, n. 4, p. 796–709, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000400009>

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. e CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.1, p.17-22, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000100002>

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, v. 1, 368 p.

MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. 1.ed. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2006.

MATIAS, R. A. M.; FERREIRA, B. S.; SOARES, T. S. Quantificação de biomassa e estimativa de estoque de carbono de indivíduos de aroeira em um fragmento de floresta estacional decidual. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Betim, v. 15, p. 651-657, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5892/ruvrd.v15i2.3446>

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

MEDEIROS, A. C. S.; SMITH, R.; PROBERT, R.; SADER, R. Comportamento fisiológico de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) em condições de armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 40, p. 85-98, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0\\_38](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0_38)

MEDEIROS, A. C. D.; ALENCAR, L. C. B.; FELISMINO, D.C. *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Medicinal and Aromatic Plants of South America**, Rio de Janeiro, p. 421–429, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20170028>

MESQUITA, M. O. M.; PINTO, T. M. F.; MOREIRA, R. F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 119-249, 2017.

MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36 e 37, p. 5-10, 2000.

MOTA, B. C. F.; ANDRADE, R. V.; FONSECA, J. M. S.; SANTOS, A. C.; MELO JÚNIOR, A. F.; MENEZES, E. V. Comparative studies between the chemical constituents and biological properties of the extracts from the leaves and barks of *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 9, n. 6, p. 159-168, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5513>

NASCIMENTO, J. P. B.; VIEIRA, D. C. M.; MEIADO, M. V. *Ex situ* seed conservation of Brazilian Cacti. **Revista Gaia Scientia**, João Pessoa, v. 9 n. 2, p. 111-116, 2015.

NOBRE JUNIOR, H. V.; OLIVEIRA, R. A.; MAIA, F. D.; NOGUEIRA, M. A. S.; DE MORAES, M. O.; BANDEIRA, M. A. M.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamineinduced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochemical Research**, New York, v. 34, p. 1066-1075, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9876-5>

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, p. 439-453, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>

OLIVEIRA, G. M.; SILVA, F. F. S.; ARAUJO, M. N.; COSTA, D. C. C.; GOMES, S. E. V.; MATIAS, J. R.; ANGELOTTI, F.; CRUZ, C. R. P.; SEAL, C. E.; DANTAS, B. F. Environmental stress, future climate, and germination of *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 41, n. 1, p. 032-043, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n1191945>

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semiárido brasileiro a fungos xilófagos em condições de laboratório. **Revista Árvore**, Viçosa v. 28 n. 2. p. 275-282, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622004000200014>

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R.; SANTO, G. J. C. Resistência natural de nove madeiras do semiárido brasileiro a fungos xilófagos em simulares de campo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 511-520, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000300013>

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland: an ornamental species. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, p. 347-353, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i3.17946>

PIRES, D. C. M. **Conservação *in vitro* por crescimento lento de mangabeira do Cerrado (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

RAMOS, M. A.; DE MEDEIROS, P. M.; DE ALMEIDA, A. L. S.; FELICIANO, A. L. P.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Can wood quality justify local preferences for firewood in an area of caatinga (dryland) vegetation? **Biomass and Bioenergy**, Birmingham, v. 32, p. 530-539, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.11.010>

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_059](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_059)

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, 1991.

RODRIGUEZ, S. C.; ALVARADO, J. C.; ESPÍRITO-SANTO, M. M.; NUNES, Y. R. F. *Myracrodruon urundeuva* fr all. (aroeira tree) population Dynamics, diameter growth rate and its potential for sustainable management in successional tropical dry forests of Brazil. **Revista árvore**, Viçosa, v. 41, n. 3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-90882017000300010>

SANTOS, J. P.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Richness and distribution of useful woody plants in the semiarid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, Amsterdam, v. 72, n. 5, p. 652-663, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2007.08.004>

SANTOS, M. O.; ALMEIDA, B. V.; RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; MACÊDO, M. J. F.; MACEDO, J. G. F.; SOUSA, F. F. S.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; ARAÚJO, T. M. S.; SOUZA, M. M. A. The conservation of native priority medicinal plants in a Caatinga area in Ceará, northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 2675-2685, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160633>

SANTOS, M. O.; RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; MACÊDO, M. J. F.; MACEDO, J. G. F.; LACERDA, M. N. S.; MACÊDO, M. S.; SOUZA, M. M. A. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 3, p. 2767-2779, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170594>

SANTOS, E. M. S.; SANTOS, H. O.; GONÇALVES, J. R. S. M.; ALMEIDA, A. C.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. R.; ALVES, J. N.; NEIVA, R. N.; SANTOS, G. L. M.; VIANA, M. I. J.; ARAÚJO, B. R. S.; SANTOS, T. C.; COSTA, S. Quali-quantitative characterization of the honey from *Myracrodruon urundeuva* allemão (Anacardiaceae - Aroeira): macroscopic, microscopic, physico-chemical and microbiological parameters. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 17, n. 51, p. 1422-1435, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16633>

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: princípios e aplicações**. Guaíba: Agropecuária, p. 25–74, 2001.

SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; PARVEEN, S.; SAEED, T.; SHAHEEN, A.; AKHTAR, R.; AHMAD, Z. Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. **Plant Biotechnology: Principles and Applications**, Singapore, p. 1–36, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5_1)

SILVA, A. C. M.; COSTA, T. P. D.; COSTA, M. K. C.; SAI, E. F.; RODRIGUES, R. R. Assepsia de segmentos nodais de mini-rosa (*Rosa* sp.) para o estabelecimento *in vitro*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 7, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v7n1.silva>

SIMON, M. F. **Manual de curadores de germoplasma vegetal: Conservação *in situ***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010, 13 p.

WATT, M. P.; THOKOANE, N. L.; MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 61, n. 2, p. 161-164, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006447506869>

WINHELMANN, M. C.; TEDESCO, M.; LUCCHESI, J. R.; FIOR, C. S.; SCHAFFER, G. Propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima*. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 70, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970025>

XAVIER, M. V. A.; MATOS, C. H. C.; OLIVEIRA, C. R. F.; SÁ, M. G. R.; SAMPAIO, G. R. M. Toxicidade e repelência de extratos de plantas da caatinga sobre *Tetranychus bastosi* Tutler, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) em pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 790-797, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/14\\_063](https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_063)

## CAPÍTULO 1

### **CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E RETOMADA DE CRESCIMENTO DE AROEIRA *Myracrodruon urundeuva* Allemão**

#### **RESUMO**

A aroeira é uma espécie nativa considerada nobre devido as características da madeira e diversas propriedades medicinais. A demanda pelos atributos desejáveis que esta espécie apresenta é crescente. No entanto, o extrativismo predatório ao longo das décadas tem limitado a regeneração natural da aroeira, o que torna urgente a obtenção de métodos de preservação que contribuam para evitar a extinção da espécie. Contudo, objetivou-se avaliar a conservação *in vitro* de aroeira por meio da técnica do crescimento lento com posterior retomada do crescimento. Dois experimentos para conservação e um de retomada de crescimento foram realizados no Laboratório de Biotecnologia em Uberlândia-MG. O delineamento utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. No primeiro experimento de conservação foram avaliados: manitol e sorbitol nas doses de 10 e 20 g L<sup>-1</sup> e sacarose (30 g L<sup>-1</sup> e 40 g L<sup>-1</sup>) nos períodos de 30; 60; 90 e 120 dias. Já no segundo avaliou-se o efeito de manitol e sorbitol nas doses de 5 e 10 g L<sup>-1</sup> e ácido abscísico - ABA (1 e 2 mg L<sup>-1</sup>) nos tempos 60 e 120 dias. Após 120 dias de conservação *in vitro* foi realizado um experimento para retomada de crescimento, com os explantes do segundo experimento de conservação que foram transferidos para frascos onde permaneceram por 60 dias. A adição de sacarose na dose de 40 g L<sup>-1</sup> ao meio de cultura aumenta a quantidade de calos, porém reduz a sobrevivência de explantes de aroeira. A adição de sorbitol (5 e 10 g L<sup>-1</sup>) ou ácido abscísico (1 e 2 mg L<sup>-1</sup>) proporcionam taxa de sobrevivência semelhantes e não reduzem o desenvolvimento dos explantes. O manitol afeta a retomada de crescimento dos explantes provocando menor taxa de sobrevivência não sendo recomendado para conservação *in vitro* por crescimento lento de segmentos nodais de aroeira.

**Palavras-chave:** *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão, crescimento lento, osmorreguladores, regulador vegetal.

#### **ABSTRACT**

### **IN VITRO CONSERVATION AND RESUMPTION OF AROEIRA GROWTH *Myracrodruon urundeuva* Allemão**

The aroeira is a native species considered noble due to the characteristics of the wood and several medicinal properties. The demand for the desirable attributes that this species presents is growing. However, predatory extraction over the decades has limited the natural regeneration of aroeira, which makes it urgent to obtain preservation methods that contribute to avoid the extinction of the species. However, the objective was to evaluate the *in vitro* conservation of aroeira by means of the slow growth technique with later resumption of growth. Two experiments for conservation and one for resuming growth were carried out at the Biotechnology Laboratory in Uberlândia-MG. The design used in the experiments was completely randomized. In the first conservation experiment were evaluated: mannitol and sorbitol in doses of 10 and 20 g L<sup>-1</sup> and sucrose (30 g L<sup>-1</sup> and 40 g L<sup>-1</sup>) in periods of 30; 60; 90 and 120 days. In the second, the effect of mannitol and sorbitol at doses of 5 and 10 g L<sup>-1</sup> and abscisic acid-ABA (1 and 2 mg L<sup>-1</sup>) was evaluated

at 60 and 120 days. After 120 days of *in vitro* conservation, an experiment to resume growth was carried out, with the explants of the second conservation experiment that were transferred to flasks where they remained for 60 days. The addition of sucrose at a dose of 40 g L<sup>-1</sup> to the culture medium increases the amount of calluses, but reduces the survival of aroeira explants. The addition of sorbitol (5 and 10 g L<sup>-1</sup>) or abscisic acid (1 and 2 mg L<sup>-1</sup>) provides similar survival rates and does not reduce the development of explants. Mannitol affects the resumption of growth of explants causing a lower survival rate and is not recommended for *in vitro* conservation due to slow growth of nodal mastic segments.

**Keywords:** *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão, slow growth, osmoregulators, plant regulator.

## 1 INTRODUÇÃO

A aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão), pertencente à família Anacardiaceae, é uma árvore de madeira conhecida por seu uso na indústria de construção brasileira, com cerne fortemente resistente ao ataque de cupins e fungos fitopatogênicos (SILVA et al., 2019). A espécie apresenta elevada importância socioeconômica, com destaque para os aspectos etnofarmacológicos, uma vez que os compostos encontrados nas várias partes da espécie possuem propriedades terapêuticas consideráveis (RIBEIRO et al., 2014).

É de conhecimento popular local a ação analgésico, anti-inflamatório, antioxidante, antifúngico e antibacteriano da aroeira. Na literatura há relatos que tais benefícios a saúde estão relacionados principalmente aos compostos bioativos: polifenóis, taninos, flavonoides e alcaloides (CECÍLIO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; AGUIAR GALVÃO et al., 2018). Pesquisas recentes ligam os bioativos de aroeira a propriedades de prevenção ou tratamento de distúrbios neurodegenerativos, doenças que são crescentes na população mundial (VIANA; CALOU, 2019). Nesse sentido, há uma tendência de expansão na demanda pela espécie.

A aroeira, pela vasta aptidão de uso está em risco de extinção devido ao extrativismo realizado de forma desordenada. A espécie integra a lista vermelha de espécies ameaçadas e classificada na categoria vulnerável (BRASIL, 2014).

Em espécies que estão em risco de extinção faz-se necessário, inicialmente, ampliação dos estudos sobre formas de conservação e retomada de crescimento, sendo uma alternativa promissora utilizar métodos biotecnológicos, como a cultura de tecidos. A manutenção de coleções *in vitro* é indicada para a conservação de espécies com limitada capacidade reprodutiva e/ou existem em habitats ameaçados (ROCA et al.,

1991). O grande número de plantas em pequeno espaço físico, em ambiente controlado, livre dos riscos existentes a campo, reduz os custos de manutenção e garantem fidelidade genética (LÉDO et al., 2014).

O crescimento lento é uma técnica *in vitro* determinada pela redução do metabolismo das plantas. O cultivo consiste na utilização de meristemas e/ou ápices caulinares submetidas a ambientes com modificações nas condições físicas (temperatura e luminosidade) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (ARRIGONI-BLANK et al., 2014; HOLOBIU et al., 2018). O sucesso da técnica requer o desenvolvimento de protocolos específicos para cada tipo de espécie, acessos e explantes (WATT et al., 2004).

Segundo Silva et al. (2016), o manejo das plantas em temperaturas baixas associadas a adição de agentes osmóticos no meio de cultura resulta em maior eficiência na conservação de germoplasma *in vitro*. Os compostos utilizados para maximizar a conservação incluem o manitol, sorbitol e a sacarose (NASIRUDDIN; ISLAM, 2018; MUNOZ et al., 2019).

A concentração adequada de agentes osmóticos é fundamental para obter os resultados satisfatórios. Doses elevadas podem desregular o metabolismo das plantas, promover alterações na permeabilidade da membrana e também aumentar o estresse oxidativo, o que pode resultar em lesão tecidual (GUPTA et al., 2017).

Há escassez de estudos com técnicas de culturas de tecidos em espécies tropicais, tanto na avaliação da conservação como desempenho das plantas conservadas na fase de retomada do crescimento (SANTOS et al.; 2016). No caso da aroeira, não existem trabalhos com resultados que indiquem uma maneira de crescimento lento para conservação *in vitro* da espécie. Desta forma, objetivou-se a conservação *in vitro* de aroeira através da técnica do crescimento lento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia Campus Umuarama, sementes de aroeira fornecidas pela Embrapa Semiárido de Petrolina – PE, foram desinfetadas com álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, essas sementes foram enxaguadas cinco vezes com água destilada e autoclavada. Posteriormente, foram colocadas em frascos de vidro transparente, vedados com tampas plásticas, contendo 40 mL de meio MS na

concentração 50% (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7, que foram previamente autoclavados a uma temperatura de 121°C por 20 minutos.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 25 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (medida com luxímetro) fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. Após 120 dias, as plantas obtidas foram seccionadas para a extração de segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento, que foram utilizados como explantes na etapa de conservação *in vitro*.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais advindos do estabelecimento prévio *in vitro* foram colocados em frascos de vidro transparente, vedados por tampas plásticas, contendo 40 mL de meio MS 50% suplementado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e variando de acordo com os diferentes tratamentos estudados. O pH do meio foi ajustado para 5,7 e os frascos foram autoclavados à temperatura de 121 °C por 20 minutos, um dia antes de colocar os explantes no meio.

Para testar a metodologia de conservação *in vitro* por crescimento lento da aroeira foram realizados dois experimentos. O primeiro ocorreu entre os meses de outubro de 2017 a janeiro de 2018 com tratamentos descritos na Tabela 1. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições sendo a parcelas compostas de três frascos com dois explantes cada, em fatorial 6 x 4 com parcelas subdivididas no tempo, o primeiro fator referindo-se aos agentes osmóticos e o segundo fator aos períodos de avaliação: 30; 60; 90 e 120 dias. Foram avaliados o número de folhas verdes, número de folhas secas, porcentagem de calos e sobrevivência.

TABELA 1. Osmorreguladores e concentrações utilizados para a conservação de aroeira *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019.

Tratamento	Dose (g L <sup>-1</sup> )
Manitol	10
Manitol	20
Sorbitol	10
Sorbitol	20
Sacarose	30
Sacarose	40

O segundo experimento foi conduzido entre os meses de outubro de 2018 a janeiro de 2019 com os tratamentos descritos na Tabela 2. O delineamento foi inteiramente

casualizado com quatro repetições e parcelas compostas de três frascos com dois explantes cada, em fatorial 6 x 2 com parcelas subdivididas no tempo, o primeiro fator referindo-se aos agentes osmóticos e o segundo fator aos períodos de avaliação: 60 e 120 dias, em que foram avaliadas o número de folhas verdes e a taxa de sobrevivência por meio de contagem visual.

TABELA 2. Osmorreguladores e regulador vegetal utilizados para a conservação de aroeira *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019.

Tratamento	Dose (mg e g L <sup>-1</sup> )
Manitol	5
Manitol	10
Sorbitol	5
Sorbitol	10
Ácido Abscisico	1
Ácido Abscisico	2

Para retomada de crescimento após 120 dias de conservação *in vitro* foi realizado um experimento entre os meses de janeiro a março de 2019 com os explantes do segundo experimento que foram transferidos para frascos contendo 40 mL de meio MS a 50%, suplementado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e pH ajustado para 5,7, que foram previamente autoclavados à temperatura de 121°C por 20 minutos. Posteriormente, foram colocados em meio de cultura e mantidos em sala de crescimento a temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 25 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (medida com luxímetro) fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

A avaliação das plantas de aroeira ocorreu aos 60 dias após os explantes serem colocados nos frascos para retomada de crescimento, avaliando-se a taxa de sobrevivência, o número de folhas verdes, o comprimento da parte aérea, mensurado com régua milimetrada e a biomassa obtida pela pesagem em balança de precisão.

Os dados foram testados quanto às pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, a 1% de probabilidade, utilizando o software estatístico SPSS (IBM, 2013) e as variáveis foram submetidas à análise de variância com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2014). As médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Agentes osmóticos na conservação *in vitro* de segmentos nodais de aroeira

A análise de variância demonstrou que houve efeito significativo da interação agente osmótico x tempo em todas as variáveis avaliadas para conservação de segmentos nodais *in vitro* da aroeira (Tabelas 3 e 4). Sorbitol na menor dose resultou em maior quantidade de folhas verdes em todos os tempos de conservação *in vitro*, com destaque para o tempo de 60 dias em que o sorbitol proporcionou maior número de folhas verdes independente da concentração (Tabela 3). Este resultado evidenciou a influência da dose para efeito do sorbitol, pois quando utilizado na dose de 10 g L<sup>-1</sup> ele não reduziu o metabolismo dos explantes e o aumento da dose para 20 g L<sup>-1</sup> reduziu significativamente a quantidade de folhas verdes após 60 dias.

Vale ressaltar que o sorbitol (10 g L<sup>-1</sup>) promoveu número de folhas verdes entre 54 a 211% superior ao encontrado em sacarose (40 g L<sup>-1</sup>) ao longo dos períodos avaliados. Aos 120 DAC observou-se que o tratamento que apresentou desenvolvimento suprimido relacionou-se ao manitol, independente da dose.

TABELA 3. Número de folhas verdes e número de folhas secas de segmentos nodais de aroeira submetidos a diferentes agentes osmóticos aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019.

Tratamento	Dose (g L <sup>-1</sup> )	Número de folhas verdes			
		30	60	90	120
Manitol	10	0,88 Bcd	2,00 Abc	1,25 ABcd	1,13 Abc
Manitol	20	1,06 Bcd	2,19 Abc	1,50 ABcd	1,13 Bc
Sorbitol	10	4,63 Ba	5,75 Aa	5,88 Aa	6,63 Aa
Sorbitol	20	2,00 Cbc	4,88 Aa	3,00 Bb	3,50 Bb
Sacarose	30	0,50 Bd	1,00 Bc	1,00 Bd	2,00 Ac
Sacarose	40	3,00 Ab	3,00 Ab	2,25 Abc	2,13 Ac
W: F <sub>Lev</sub>		<b>0,948; 2,383</b>			
CV (%)		23,77;20,40			
		Número de folhas secas			
		30	60	90	120
Manitol	10	0,00 Aa	0,50 Ab	0,75 Ab	0,00 Ab
Manitol	20	0,00 Aa	0,25 Ab	1,00 Ab	0,00 Ab
Sorbitol	10	0,25 Ca	2,00 Bab	4,00 Aa	4,50 Aa
Sorbitol	20	0,25 Ba	1,50 ABab	2,25 Aab	1,50 ABb
Sacarose	30	1,00 Aa	1,00 Aab	1,00 Ab	1,50 Ab
Sacarose	40	1,00 Ca	2,50 Ba	3,75 ABa	4,00 Aa
W: F <sub>Lev</sub>		<b>0,955; 2,554</b>			
CV (%)		71,24; 48,39			

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade; CV: coeficiente de variação.

As diferenças observadas entre os solutos contidos nos agentes osmóticos na conservação de aroeira podem estar relacionadas à compatibilidade dos solutos ao metabolismo da espécie. Dessa forma, as moléculas mais compatíveis podem promover funções enzimáticas benéficas, que auxiliam na proteção das plantas contra condições adversas como dessecação, salinidade, entre outros (BARRERA et al., 2019), respondendo de forma mais positiva na conservação.

Não houve diferença entre os osmorreguladores para número de folhas secas aos 30 dias de conservação (DC) (Tabela 3). Aos 60 DC, o menor número de folhas secas foi encontrado em manitol (10 e 20 g L<sup>-1</sup>), sendo os valores 10 e 5 vezes menos folhas secas que encontrado em sacarose 40 g L<sup>-1</sup>. Aos 90 e 120 DC, menor número de folhas secas também está relacionado ao meio de cultivo na presença de manitol. No entanto, nas duas últimas avaliações, sorbitol 10 g L<sup>-1</sup>, apresentou valores altos de folhas secas, não diferindo de sacarose 40 g L<sup>-1</sup>.

Ao avaliar o efeito do tempo dentro de cada manejo do meio de cultura, observou-se que não houve diferença no número de folhas em manitol 10 e 20 g L<sup>-1</sup> e sacarose 30 g L<sup>-1</sup>, a diferença mais pronunciada ao longo do período de conservação foi observado em sacarose 40 g L<sup>-1</sup>, sendo 4 vezes superior aos 120 DC, comparado a 30 DC (Tabela 3). A morte das folhas pode ser atribuída ao esgotamento dos nutrientes e vitaminas no meio de cultura, uma vez que a aroeira é altamente exigente do ponto de vista nutricional (KRATKA; CORREIA, 2015).

O manitol, que apresentou os menores valores de folhas secas, apresenta papel na proteção das células e estruturas celulares contra danos causados pelo oxigênio reativo, extinguindo os radicais livres antes que eles se difundam e danifiquem componentes celulares fundamentais (PATEL; WILLIAMSON, 2016). O manitol promoveu aumento na indução de novos ramos de *Simmondsia chinensis* (BEKHEET et al., 2016) e incremento no número de brotações por explante em cultivares de *Manihot esculenta* (JOLAYEMI; OPABODE, 2018).

Os dados referentes a quantidade de calos encontram-se na Tabela 4. Todos os agentes osmóticos favoreceram o desenvolvimento de calos nos segmentos nodais de aroeira a partir dos 30 dias de conservação *in vitro*. Manitol e sorbitol foram semelhantes quanto a formação de calos nos diferentes tempos de avaliação. A utilização de sacarose independente da dose resultou em maior percentagem de calos em relação aos agentes osmóticos manitol e sorbitol aos 30 dias e na avaliação final aos 120 dias a maior dose de sacarose resultou em formação de calos em 90% dos explantes.

TABELA 4. Porcentagem de calos e porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais de aroeira submetidos a diferentes agentes osmóticos aos 30, 60, 90 e 120 dias de conservação *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019.

Tratamento	Dose (g L <sup>-1</sup> )	Quantidade de calos (%)			
		30	60	90	120
Manitol	10	27,5 Bb	57,5 Abc	67,5 Ab	67,5 Ab
Manitol	20	20,0 Bb	70,0 Aab	80,0 Aab	80,0 Aab
Sorbitol	10	16,3 Bb	50,0 Ac	62,5 Ab	62,5 Ab
Sorbitol	20	30,0 Bb	72,5 Aab	80,0 Aab	77,5 Aab
Sacarose	30	50,0 Ba	80,0 Aa	80,0 Aab	80,0 Aab
Sacarose	40	50,0 Ba	70,0 Aab	87,5 Aa	90,0 Aa
W: F <sub>Lev</sub>		<b>0,9124; 2,677</b>			
CV (%)		15,05; 11,82			
		Sobrevivência (%)			
		30	60	90	120
Manitol	10	70,0 Abc	52,5 Bb	40,0 BCb	32,5 Cab
Manitol	20	90,0 Aa	70,0 Ba	45,0 Cb	45,0 Ca
Sorbitol	10	80,0 Aab	75,0 Aba	65,0 Ba	47,50 Ca
Sorbitol	20	60,0 Ac	60,0 Aab	47,5 ABb	45,0 Ba
Sacarose	30	90,0 Aa	60,0 Bab	47,5 Bb	47,5 Ba
Sacarose	40	90,0 Aa	45,0 Bb	40,0 Bb	22,5 Cb
W: F <sub>Lev</sub>		<b>0,9331; 2,993</b>			
CV (%)		13,44; 12,34			

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade; CV: coeficiente de variação.

Após 30 dias de conservação *in vitro*, os explantes de aroeira apresentaram queda da taxa de sobrevivência para todos os agentes osmóticos avaliados em função do tempo. Na avaliação aos 120 dias, somente 40% do total dos explantes sobreviveram e a utilização da maior dose sacarose proporcionou menor sobrevivência que sacarose na menor dose e sorbitol indiferente da dose com apenas 22,50% de explantes vivos (Tabela 4).

A redução do crescimento vegetativo em particular do crescimento de folhas e a taxa de sobrevivência pode estar relacionado a efeito fisiológico ocasionado por maior pressão osmótica no meio de cultura promovida por alta quantidade de sais, os quais promovem efeitos prejudiciais com redução na absorção de água necessária para o metabolismo e desequilíbrio hormonal (citocininas/auxinas), que causam problemas no crescimento da parte aérea (SALEH et al., 2017; BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2018).

Na literatura pode-se encontrar respostas positivas a adição de sacarose ao meio de cultivo MS em vários parâmetros avaliados. Em geral, valores entre 15 a 31 g L<sup>-1</sup> de

sacarose favorecem o desenvolvimento e doses superiores retardam os processos metabólicos tanto na emissão e crescimento radicular como o crescimento da parte aérea (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013), o que pode ser observado também no presente estudo, evidenciado com a menor taxa de sobrevivência entre os agentes osmóticos avaliados.

Pesquisas que corroboram com a faixa de sacarose citada pode ser encontrado em trabalhos com cana-de-açúcar (FERREIRA et al., 2016), pitaia vermelha (LOPES et al., 2017), *Miltonia flavescens* (LEMES et al., 2016), *Cattleya bowringiana* (PALAORO et al., 2018), entre outros. Arencibia et al. (2018) verificaram que a redução em 50% da concentração de sacarose usual no meio de cultura (3%) melhorou o enraizamento e a qualidade das brotações de *Populus* spp. cultivadas *in vitro*.

### 3.2 Agentes osmóticos e regulador vegetal na conservação *in vitro* de segmentos nodais de aroeira

Não houve interação entre os agentes osmóticos ou regulador vegetal x tempo das avaliações e os tratamentos nas doses testadas não influenciaram a taxa de sobrevivência e o número de folhas verdes de aroeira aos 60 ou 120 dias de conservação *in vitro*. Entretanto, observou-se diferenças significativas em função do tempo para ambas as características (Tabela 5).

TABELA 5. Taxa de sobrevivência e número de folhas verdes de segmentos nodais de aroeira submetidos a doses de dois agentes osmóticos e um regulador vegetal aos 60 e 120 dias de conservação *in vitro*. Uberlândia-MG, 2019.

Tratamento	Dose (mg e g L <sup>-1</sup> )	Taxa de sobrevivência		Número de folhas verdes	
		60	120	60	120
Manitol	5	91,67 a	83,33 a	1,37 a	3,38 a
Manitol	10	91,67 a	75,00 a	1,62 a	4,29 a
Sorbitol	5	100,0 a	91,67 a	1,50 a	4,21 a
Sorbitol	10	91,67 a	87,50 a	1,17 a	2,63 a
Ácido Abscisico	1	100,0 a	91,67 a	1,21 a	6,46 a
Ácido Abscisico	2	100,0 a	87,50 a	1,23 a	5,90 a
Média		95,83 A	86,11 B	1,35 B	4,48 A
W: F <sub>Lev</sub>		<b>0,921;3,270</b>		<b>0,937;2,643</b>	
CV (%)		19,43; 11,63		45,66; 54,52	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade; CV: coeficiente de variação.

Os segmentos nodais de aroeira foram mantidos 120 dias em conservação *in vitro*. Verificou-se redução significativa da taxa de sobrevivência, passando de 95,8 (60 DC) para 86,1%, o que representou decréscimo de 10,1%. Já para o número de folhas verdes, o maior tempo de conservação *in vitro* (120 DC) proporcionou aumento de 331% em relação à avaliação aos 60 dias.

O manitol e o sorbitol são carboidratos que não são metabolizados pelas plantas e por isso podem ser utilizados na redução do potencial hídrico do meio de cultura (GEORGE, 1993), interferindo na absorção de água e nutrientes pelas plantas e, conseqüentemente, no desenvolvimento. Enquanto o ácido abscísico é um retardador do crescimento que controla o início e a manutenção da dormência em gemas e a abertura e fechamento de estômatos, atuando diretamente na planta (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Pires (2017) em trabalho visando a conservação *in vitro* por crescimento lento de mangabeira do Cerrado (*Hancornia speciosa* Gomes) com a utilização de manitol nas doses de 0 a 25 g L<sup>-1</sup> e sorbitol nas doses de 0 a 40 g L<sup>-1</sup> relatou que esses agentes osmóticos não foram viáveis para a conservação *in vitro* por crescimento lento da espécie.

O sucesso da técnica de crescimento lento *in vitro* depende de fatores como a concentração do agente osmótico ou regulador vegetal, composição do meio de cultura, o tipo de explante, a espécie em estudo e outros. A escolha dos carboidratos e/ou concentração pode ser uma poderosa alavanca para gerenciar com sucesso a competência morfogênica das culturas de tecidos vegetais. Além disso, os açúcares são cada vez mais consideradas componentes de sinalização percebidas por diversos sensores e regulam muitos processos fundamentais (HAMAMA et al., 2019).

### **3.3 Retomada de crescimento dos segmentos nodais de aroeira conservados *in vitro***

A taxa de sobrevivência dos segmentos nodais de aroeira aos 60 dias após a retomada de crescimento foi influenciada pelos tratamentos (Tabela 6). Segmentos nodais conservados em meio com adição de manitol apresentaram taxa de sobrevivência inferiores aos meios suplementados com sorbitol e ácido abscísico e quando utilizado manitol 10 g L<sup>-1</sup> não foi possível a recuperação do crescimento dos explantes, o que afetou as demais características avaliadas.

De acordo com os resultados observados pode-se constatar que os explantes mantidos sob ação do manitol durante o período de 120 dias de conservação *in vitro* sofreram estresse que afetou a recuperação do crescimento, mesmo após transferência

para meio não suplementado com agentes osmóticos ou regulador vegetal. Efeitos nocivos do manitol também foram observados para a conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira e multiplicação de amoreira-preta (SÁ et al., 2011; SILVA et al., 2016).

TABELA 6. Médias da taxa de sobrevivência (TS), número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA) e biomassa (MF) de segmentos nodais de aroeira submetidos a crescimento lento com dois agentes osmóticos e um regulador vegetal aos 60 dias de retomada do crescimento. Uberlândia-MG, 2019.

Tratamento	Concentração (mg e g L <sup>-1</sup> )	TS (%)	NFV	CPA (cm)	MF (g)
Manitol	5	2,50 b	0,75 bc	0,75 ab	0,013 ab
Manitol	10	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,000 b
Sorbitol	5	42,50 a	2,25 a	1,25 a	0,025 a
Sorbitol	10	37,50 a	1,25 abc	1,00 a	0,021 a
Ácido Abscísico	1	47,50 a	1,75 ab	1,75 a	0,015 a
Ácido Abscísico	2	45,00 a	1,00 abc	0,75 ab	0,016 a
W: F <sub>Lev</sub>		<b>0,95;6,96</b>	<b>0,94;2,05</b>	<b>0,92;2,40</b>	<b>0,96;3,65</b>
CV (%)		16,36	55,7	66,06	39,97
Transformação		$\sqrt{x + 0,5}$	-	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; W e F<sub>Lev</sub>.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade; CV: coeficiente de variação.

A utilização de sorbitol 5 g L<sup>-1</sup> para conservação *in vitro* proporcionou o maior número de folhas verdes que o manitol nas doses testadas e sem diferença significativa em comparação ao sorbitol 10 g L<sup>-1</sup> e ao ácido abscísico independentemente da dose. Isso indica que os explantes responderam melhor para a retomada do crescimento com a utilização de sorbitol (Tabela 6).

O crescimento da parte aérea (CPA) de segmentos nodais de aroeira apresentou diferenças em função dos tratamentos na retomada de crescimento aos 60 dias (Tabela 6). O agente osmótico sorbitol nas doses de 5 ou 10 g L<sup>-1</sup> e o regulador vegetal ABA na dose de 1 mg L<sup>-1</sup> resultaram em maiores CPA que o manitol na dose de 10 g L<sup>-1</sup>. De fato, o manitol implicou em redução no metabolismo das plantas conservadas *in vitro* em função do menor potencial osmótico do meio a tal ponto que houve paralisação do crescimento e morte dos explantes.

Para algumas espécies o sorbitol pode ser utilizado como fonte de carbono, o que favorece o crescimento vegetal, já para outras espécies age somente como regulador osmótico, podendo reduzir o crescimento. Assim como no presente trabalho, Flores et al. (2013) observaram viabilidade no crescimento lento de *P. tuberosa* em meio MS suplementado com 10 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, por um período de 120 dias. Conservação *in vitro*

usando MS com baixas concentrações de sacarose e sorbitol favoreceu o crescimento lento em conservação *in vitro* de *Lavandula dentata* L e *Rhazya stricta* Decne (ATTIA et al.; 2017).

A biomassa dos segmentos nodais de aroeira aos 60 dias de retomada de crescimento diferiu em função dos tratamentos (Tabela 6). Sorbitol e ABA foram estatisticamente superiores ao manitol na dose 10 g L<sup>-1</sup> e iguais a menor dose de manitol. Pires (2017) também observou que o manitol na conservação de explantes de mangabeira não possibilitou retomada do crescimento. Deve-se considerar que durante a conservação *in vitro*, a planta deve se manter viável e com capacidade de retomar o crescimento normal após ser cultivada em meio que promova seu crescimento e multiplicação o que não foi possível com uso da maior dose de manitol (10 g L<sup>-1</sup>).

#### 4 CONCLUSÕES

A adição de sacarose na dose de 40 g L<sup>-1</sup> ao meio de cultura aumenta a quantidade de calos, porém reduz a sobrevivência de explantes de aroeira.

A adição de sorbitol (5 e 10 g L<sup>-1</sup>) ou ácido abscísico (1 e 2 mg L<sup>-1</sup>) proporcionam taxa de sobrevivência semelhantes e não reduzem o desenvolvimento dos explantes.

O manitol afeta a retomada de crescimento dos explantes provocando menor taxa de sobrevivência não sendo recomendado para conservação *in vitro* por crescimento lento de segmentos nodais de aroeira.

#### REFERÊNCIAS

AGUIAR GALVÃO, W. R.; BRAZ FILHO, R.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; CAMPOS, A. R.; MOREIRA, A. C. O. M.; SILVA, S. O.; MESQUITA FILHO, F. A.; SAA, R. S.; MELO JUNIOR, J. M. A.; GONÇALVES, N. G. G.; FONSECA, S. G. C.; BANDEIRA, M. A. M. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - a conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 222, p. 177–189, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.024>

ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M. A.; ORELLANA, F.; ALARCÓN, J. E.; CORTEZ, N.; VALENZUELA, M. A. Establishment of photomixotrophic cultures for high-scale micropropagation by temporary immersion bioreactors (TIBs) in plant commercial species. **Acta Horticulturae**, Netherlands, v. 1224, p. 203–208, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1224.27>

ARRIGONI-BLANK, M. F.; TAVARES, F. F.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. C.; MENEZES, T. S.; SANTANA, A. D. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, London, v. 1, p. 1-7, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/208506>

ATTIA, A. O.; DESSOKY, E. D. S.; AL-SODANY, Y. M.; ISMAIL, I. A. Ex situ preservation for some endemic and rare medicinal plants in Taif, KSA. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Bulgaria, p. 31, n. 5, p. 912-920, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1356690>

BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. Effect of salinity stress on growth and physiology of medicinal plants. **Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress**, India, p. 153-167, 2018.

BARRERA, M. C.; JAKOBS-SCHOENWANDT, D.; GÓMEZ, M. I.; BECKER, M.; PATEL, A. V.; RUPPEL, S. Salt stress and hydroxyectoine enhance phosphate solubilisation and plant colonisation capacity of *Kosakonia radicincitans*. **Journal of Advanced Research**, Egypt, v. 19, p. 91-97, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.012>

BEKHEET, S. A.; MATTER, M. A.; TAHA, H. S.; EL-ASHRY, A. A. In vitro Conservation of Jojoba (*Simmondsia chinensis*) shootlet cultures using osmotic stress and low temperature. **Middle East Journal of Agriculture Research**, Pakistan, v. 5, n. 4, p. 396-402, 2016.

BRASIL, Centro Nacional de conservação da flora. **Projeto Lista Vermelha**: lista vermelha. 2014. Brasília. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/listavermelha>>. Acesso: 17 dez. 2018.

CECÍLIO, A. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; CAMPAN, P. R. V.; FRANCISCO, F. L.; DUARTE, M. G. R.; MENDONÇA, L. A. M.; ALMEIDA, V. L. Antiviral activity of *Myracrodruon urundeuva* against rotavirus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 2, p.197-202, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.10.005>

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

FERREIRA, L. T.; SILVA, M. M. A.; MACÊDO, C. R.; WILLADINO, L. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar (RB 867515). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 46-52, 2016.

FLORES, R.; ULIANA, S. C. PIMENTEL, N.; GARLET, T. M. B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013. DOI: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v4n3.flores>

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; DE FARIA, R. T.; DE MACEDO LEMOS, E. G. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 583-592, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p583>

- GEORGE, E.F. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. - The technology. 2 ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p. UPTA, P.; JAIN, V.; PAREEK, A.; KUMAR, P.; SINGH, R.; AGARWAL, P.; SHARM, V. Evaluation of effect of alcoholic extract of heartwood of *Pterocarpus marsupium* on in vitro antioxidant, anti-glycation, sorbitol accumulation and inhibition of aldose reductase activity. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, Taipei, v. 7, n. 3, p. 307-314, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.11.001>
- GUPTA, P.; JAIN, V.; PAREEK, A.; KUMAR, P.; SINGH, R.; AGARWAL, P.; SHARM, V. Evaluation of effect of alcoholic extract of heartwood of *Pterocarpus marsupium* on in vitro antioxidant, anti-glycation, sorbitol accumulation and inhibition of aldose reductase activity. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, Taipei, v. 7, n. 3, p. 307-314, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.11.001>
- HAMAMA, L.; VOISINE, L.; PIERRE, S.; CESBRON, D.; OGÉ, L.; LECERF, M.; CAILLEUX, S.; BOSSELUT, J.; FOUCRIER, S.; FOUCHER, F.; BERRUYER, R.; SAKR, S.; HIBRAND-SAINT OYANT, L. Improvement of in vitro donor plant competence to increase de novo shoot organogenesis in rose genotypes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 252, p. 85-95, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.040>
- HOLOBIU, I. M.; CATANA, R. D.; MAXIMILIAN, C. R.; CRISTEA, V.; MITOI, M. E. Ex situ conservation using medium-term cultures in *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka (Caryophyllales: Caryophyllaceae) and genetic stability assessment using ISSR. **Acta Zoologica Bulgarica**, Bulgaria, v. 11, p. 155-162, 2018.
- IBM Corp. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp, 2013.
- JOLAYEMI, O. L.; OPABODE, J. T. Responses of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties to in vitro mannitol-induced drought stress. **Journal of Crop Improvement**, United States of America, v. 32, n. 4, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/15427528.2018.1471431>
- KRATKA, P. C.; CORREIA, C. R. M. A. Crescimento inicial de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* allemão) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, v. 39, n. 3, p. 551-559, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-67622015000300016>
- LÉDO, A. S.; MOURA, C. R. F.; MACHADO, C. A.; RAMOS, S. R. R.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, C. A. S. Mannitol for coconut ex situ conservation by minimum growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 2, p. 148-151, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000200010>
- LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial in vitro de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 3, p. 499-505, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150368>
- LOPES, C. A.; DIAS, G. M. G.; SILVEIRA, F. A.; RODRIGUES, F. A.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Propagação in vitro de pitaia vermelha. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 21-27, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v11i1a5355>

MUNOZ, M.; DIAZ, O.; REINUN, W.; WINKLER, A.; QUEVEDO, R. Slow growth *in vitro* culture for conservation of *Chilotanum potato* germplasm. Chilean journal of agricultural research, Chile, v. 79, p. 26-35, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000100026>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NASIRUDDIN, M.; ISLAM, A. K. M. R. *In vitro* slow-growth conservation for two genotypes of *Solanum tuberosum* L. **Bangladesh Journal Botany**, Bangladesh, v. 47, p. 369–380, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjb.v47i3.38654>

OLIVEIRA, F. A.; RORATO, V.C.; ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; RODRIGUES, A. B.; BARROS, A. L.; SANGALLI, A.; ARENA, A. C.; MOTA, J. S.; GRISOLIA, A. B.; OLIVEIRA, K. M. P. *In vitro* antifungal activity of *Myracrodruon urundeuva* Allemão against human vaginal *Candida species*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 2423–2432, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170254>

PALAORO, G. J.; SCHMILDT, O.; FERREIRA, J. P.; FIGUEIREDO, D. D. C.; SCHMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S. Crescimento *in vitro* de *Cattleya bowringiana* o'brien (Orchidaceae) em diferentes níveis de macronutrientes e sacarose. **Nucleus**, London, v. 15, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1764>

PATEL, T. K.; WILLIAMSON, J. D. Mannitol in Plants, Fungi, and Plant–Fungal Interactions. **Trends Plant Science**. Maryland Heights, v. 21, n. 6, p. 486-497, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.006>

PIRES, D. C. M. **Conservação *in vitro* por crescimento lento de mangabeira do Cerrado (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_059](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_059)

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, 1991.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000100010>

SALEH, M. Y.; SARHAN, M. S.; MOURAD, E. F.; HAMZA, M. A.; ABBAS, M. T.; OTHMAN, A. A.; YOUSSEF, H. H.; MORSI, A. T.; YOUSSEF, G. H.; EL-TAHAN, M.; AMER, W. A.; FAYEZ, M.; RUPPEL, S.; HEGAZI, N. A novel plant-based-sea water culture media for *in vitro* cultivation and *in situ* recovery of the halophyte

microbiome. **Journal of Advanced Research**, Egypt, v. 8, n. 6, p. 577-590, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.007>

SANTOS, M. C.; CARDOSO, B. T.; GOMES-COPELAND, K. K. P.; SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. Teor de prolina em brotações adventícias de mangabeira cultivadas *in vitro* sob condições de estresse osmótico. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 12, n. 12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2016.120202>

SANTOS, M. C.; LEDO, A. S.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v. 42, p. 735-741, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902011000300020>

SILVA, L. L. S.; ARAUJO, I. M. S.; COSTA, P. M. O.; OLIVEIRA, A. P. S.; OLIVEIRA, A. P.; SANTOS, A. D. C.; DUTRA, L. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; COELHO, L. C. B. B.; SOUZA-MOTTA, C. M.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of the use of *Myracrodruon urundeuva* heartwood extracts to protect *Moringa oleifera* seeds against *Nasutitermes corniger* attack and improve sanity. **South African Journal of Botany**, South Africa, p. 1-6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.013>

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

VIANA, G. S. C.; CALOU, I. B. F. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Properties from the Bioactive Constituents of *Myracrodruon urundeuva*, a Brazilian Medicinal Species. **Translational Neuroscience Research and Reviews**, United States of America, v. 2, n. 1, p. 10-17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.36959/817/521>

WATT, M. P.; THOKOANE, N. L.; MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 61, n. 2, p.161-164, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006447506869>

## CAPÍTULO 2

### DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE AROEIRA *Myracrodruon urundeuva* Allemão

#### RESUMO

A aroeira é uma espécie nativa considerada nobre devido as características da madeira e diversas propriedades medicinais. A micropropagação de espécies de destacado valor como a aroeira é vantajosa para atender a demanda crescente por produtos de origem natural e sustentável. As espécies florestais brasileiras têm como limitação a obtenção de plantas livres de microrganismos e dificuldades no estabelecimento inicial para produção de mudas em escala. Com isso, objetivou-se avaliar a sobrevivência, a contaminação, os possíveis efeitos tóxicos de produtos na assepsia e a influência de poliaminas no estabelecimento de aroeira. Dois experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia-MG, em delineamento inteiramente casualizado. Os segmentos nodais de aroeira foram obtidos de plantas produzidas a partir de sementes. No primeiro experimento, quatro tratamentos para desinfecção foram avaliados: hipoclorito de sódio a 2%, oxiclreto de cobre, ipconazole + thiram e fludioxinil + metalaxyl M a 1%, com dez repetições. Aos 30 dias após colocar os explantes nos frascos foram avaliados a sobrevivência, contaminação e fitotoxicidez. No segundo experimento foram testados três poliaminas (espermina, espermidina e putrescina) em duas concentrações (0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>) em esquema fatorial 3 x 2, com cinco repetições. Aos 60 dias após colocar os explantes nos frascos avaliou-se o número de folhas, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e a biomassa das plantas. Observou-se que a utilização de solução de hipoclorito de sódio a 2% é eficiente para desinfestação de segmentos nodais de aroeira por proporcionar redução da contaminação, maior taxa de sobrevivência e sem causar fitotoxicidez. A espermina é a poliamina que promove o crescimento da parte aérea e na concentração 0,1 mg L<sup>-1</sup> proporciona maior números de folhas e comprimento de raiz. Para maior biomassa da parte aérea da aroeira a espermidina se destaca frente a putrescina.

**Palavras-chave:** assepsia, contaminação, micropropagação, poliaminas.

#### ABSTRACT

### PEST DISINFESTATION AND ESTABLISHMENT *Myracrodruon urundeuva* Allemão

The aroeira is a native species considered noble due to the characteristics of the wood and several medicinal properties. The micropropagation of species of outstanding value such as aroeira is advantageous to meet the growing demand for products of natural and sustainable origin. The Brazilian forest species have the limitation of obtaining plants free of microorganisms and difficulties in the initial establishment for the production of seedlings in scale. Thus, the objective was to evaluate survival, contamination, the possible toxic effects of products in asepsis and the influence of polyamines in the aroeira establishment. Two experiments were carried out at the Biotechnology Laboratory of the Federal University of Uberlândia-MG, in a completely randomized design. The mastic nodal segments were obtained from plants produced from seeds. In the first experiment, four treatments for disinfection were evaluated: sodium hypochlorite at 2%, copper

oxychloride, ipconazole + thiram and fludioxinil + metalaxyl M at 1%, with ten repetitions. At 30 days after placing the explants in the flasks, survival, contamination and phytotoxicity were evaluated. In the second experiment, three polyamines (spermine, spermidine and putrescine) were tested in two concentrations (0,1 and 0,5 mg L<sup>-1</sup>) in a 3 x 2 factorial scheme, with five replications. At 60 days after placing the explants in the flasks, the number of leaves, length of the aerial part, length of the root and the biomass of the plants were evaluated. It was observed that the use of a 2% sodium hypochlorite solution is efficient for disinfesting nodal segments of aroeira as it reduces contamination, increases survival rate and does not cause phytotoxicity. Spermine is the polyamine that promotes the growth of the aerial part and in the concentration 0,1 mg L<sup>-1</sup> provides greater number of leaves and root length. For greater biomass of the aerial part of the aroeira, spermidine stands out against putrescine.

**Keywords:** asepsis, contamination, micropropagation, polyamines.

## 1 INTRODUÇÃO

A aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão), pertencente à família Anacardiaceae, é uma árvore nobre, com cerne fortemente resistente ao ataque de cupins e fungos fitopatogênicos (SILVA et al., 2019). A espécie é considerada pioneira, sendo recomendada e muito utilizada na recuperação de ecossistemas degradados e reflorestamento (CANUTO, et al., 2016; BERTONHA et al., 2016).

As folhas da aroeira são usadas para tratamento de feridas, vaginites, cervicites, hemorroidas, gripe, bronquite e gastrites (LOPES et al., 2018; SHEDOEVA et al.; 2019). Resultados com efeito analgésico, anti-inflamatório, antioxidante, antifúngico e antibacteriano de várias partes da árvore, também são de amplo conhecimento popular local e estão associados a compostos bioativos, como os polifenóis, taninos, flavonoides e alcaloides (CECÍLIO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; AGUIAR GALVÃO et al., 2018). Pesquisas recentes relacionaram os bioativos de aroeira a prevenção ou tratamento de distúrbios neurodegenerativos (VIANA; CALOU, 2019).

As descobertas de novos princípios ativos contidos em espécies nativas podem acirrar possíveis pressões de uso (LIMA et al., 2018). Segundo Newman e Cragg (2016), 49% dos medicamentos anticancerígenos aprovados são obtidos de produtos naturais ou derivados diretos. Nesse sentido, há uma tendência de expansão na demanda por recursos naturais.

Para ampliar as possibilidades e atender as necessidades do mercado por matéria prima natural, a obtenção de madeira e produtos farmacológicos poderia ser originada de árvores plantadas (RODRIGUEZ et al., 2017). No entanto, há carência de informações

sobre o estabelecimento de produção de mudas de espécies nativas (CRUZ et al, 2016; BRITO et al., 2018).

O desenvolvimento de técnicas de propagação para plantas nativas é importante para evitar o extrativismo insustentável e a extinção de espécies. Em cultivo *in vitro* é possível otimizar a produção de mudas saudáveis em larga escala, com sanidade e identidade genética garantidas (WINHELMANN et al., 2019; SOUZA; HOULLOU, 2019). No entanto, faz-se necessário ampliação dos estudos em métodos biotecnológicos, pois as espécies nativas ainda apresentam grandes desafios em cultivo *in vitro* (PRUDENTE et al., 2016).

O controle e a prevenção de contaminações por microrganismos apresentam elevado destaque no cultivo *in vitro*. Com isso, a assepsia configura etapa primordial para obtenção de plantas micro propagadas (SILVA et al., 2019). A combinação dos compostos ativos para assepsia deve ser estabelecida de acordo com a espécie e a sensibilidade do material a ser desinfestado para que não ocorra intoxicação dos tecidos. A superexposição do tecido aos agentes ativos pode danificar o explante, levando a morte celular (CARVALHO, 2012; SANTOS et al., 2019).

No cultivo *in vitro* para otimizar os processos metabólicos é comum a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura (SANTOS et al., 2019). As poliaminas são considerados reguladores do crescimento das plantas, atuam em muitos processos fisiológicos, como morfogênese, desenvolvimento de órgãos, respostas ao estresse, crescimento, senescência foliar, sinalização e proliferação celular. Nas plantas as principais são a diamina putrescina (Put), a triamina espermidina (Spd) e a tetramina espermina (Spm) (ABBASI et al., 2017; JAGU et al., 2017). Tais moléculas são importantes para a imunidade das plantas, bem como para a virulência de diversos fitopatógenos fúngicos (VILAS et al., 2018; LI et al., 2019).

O uso de produtos que promovam a desinfecção dos tecidos sem comprometer a viabilidade dos mesmos e a adição de reguladores vegetais ao meio de cultura podem otimizar o estabelecimento inicial e desenvolvimento de plantas de aroeira. Portanto, objetivou-se avaliar a sobrevivência, a contaminação e os possíveis efeitos tóxicos de produtos na assepsia e a influência de poliaminas sobre o estabelecimento de aroeira.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia localizado no Campus Umuarama em Uberlândia - MG. Procedimentos comuns aos dois experimentos são descritos a seguir.

Os segmentos nodais de aroeira foram obtidos de mudas produzidas a partir de sementes fornecidas pela Embrapa Semiárido de Petrolina-PE, semeadas no mês de novembro de 2018 em bandejas de isopor com 128 células com substrato Plantmax®. Foi semeada uma semente por célula (Figura 1A) e após 120 dias, as plantas obtidas foram seccionadas para a extração de segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento que foram utilizados como explantes na etapa de desinfecção *in vitro* (Figura 1B).

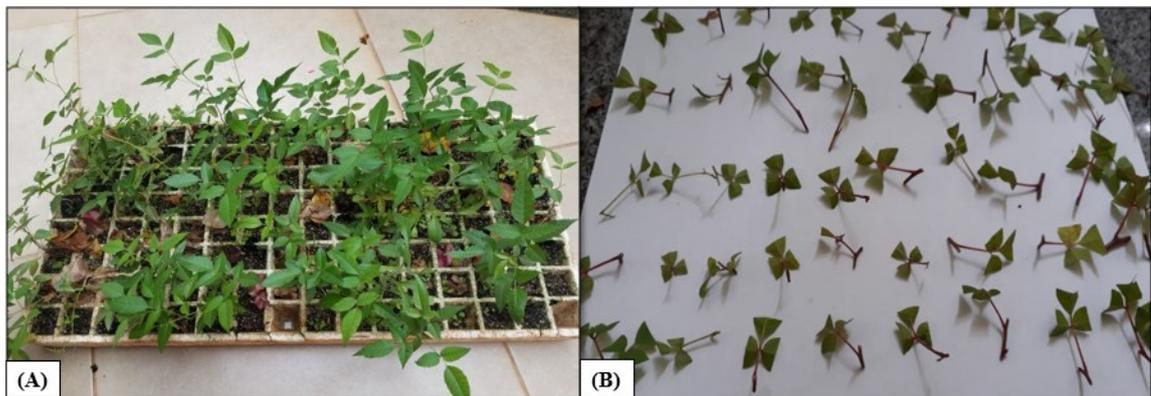


FIGURA 1. Plantas de aroeira obtidas da germinação das sementes (A). Preparação de segmentos nodais de aroeira (B). (Foto: Arquivo pessoal).

Os recipientes utilizados para colocar explantes foram tubos de ensaio com diâmetro externo de 25 mm e altura de 150 mm. Em cada tubo foi adicionado 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na concentração de 50%, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e pH ajustado em 5,7 ± 0,2. Após o preparo, os tubos foram levados para a esterilização em autoclave, em temperatura de 120°C e 1 kgf cm<sup>-2</sup> de pressão, por 20 minutos. Na sequência foram retirados da autoclave, armazenados em estante na sala de crescimento para resfriar em temperatura ambiente e solidificar o meio de cultura.

Após o preparo do meio de cultura, os explantes foram pesados e separados em frascos de vidro. Estes explantes foram lavados com detergente Tween 20® (3 ml L<sup>-1</sup>) diluído em água destilada, agitado por três minutos e enxaguadas três vezes com água destilada. Na sequência foram adicionados 20 mL de álcool etílico 70% (v/v) em cada

frasco com 50 segmentos nodais que foram agitadas por cinco minutos, seguido por três enxágues em água destilada.

Para colocação dos explantes em meio foram utilizados instrumentos de manipulação esterilizados em autoclave que foram constantemente flambados durante o processo. A câmara de fluxo e todos os recipientes passaram por um processo de assepsia com aplicação de álcool 70% (v/v) além de serem submetidos à radiação UV durante 15 minutos.

No momento de colocar os explantes no meio de cultura, os frascos contendo meio de cultura ficaram abertos para verificar a incidência de possíveis contaminantes dentro da câmara e/ou resultantes do manuseio do operador. Os frascos vazios foram acondicionados juntamente com os tratamentos na sala de crescimento e não foi observado nenhum tipo de contaminação durante e até mesmo após a avaliação do experimento.

Os frascos, contendo os explantes, foram identificados de acordo com os tratamentos, vedados com plástico filme para evitar possíveis contaminações e levados para uma sala de crescimento, onde foram dispostos aleatoriamente em uma prateleira de metal. A temperatura média desta sala foi de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas, sendo a intensidade luminosa de  $25 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (medida com luxímetro) fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

O primeiro experimento foi realizado no período de janeiro a março de 2019, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos de desinfecção (Tabela 1) e dez repetições sendo cada parcela constituída por um frasco com um explante cada.

TABELA 7. Tratamento com produtos químicos utilizados. Uberlândia-MG, 2019.

Produto comercial	Ingrediente ativo
Start 10%	hipoclorito de sódio
Status	oxicloreto de cobre
Rancona T	ipconazole + tiram
Maxim XL	fludioxonil + metalaxil

Os segmentos nodais foram embebidos pelo tempo de 5 minutos em soluções contendo os produtos testados aplicados na dose 1,0 % (v/v) e não foi realizado mais nenhum enxágue.

Aos 30 dias após colocar os explantes no meio de cultura ocorreu à avaliação da percentagem de explantes vivos para sobrevivência, percentagem de frascos com

presença ou ausência de contaminação (Figura 2 A) e a fitotoxicidez através de uma escala de 0 (ausência de sintomas) a 4 (fitotoxicidez severa) de acordo com a Figura 2 B.

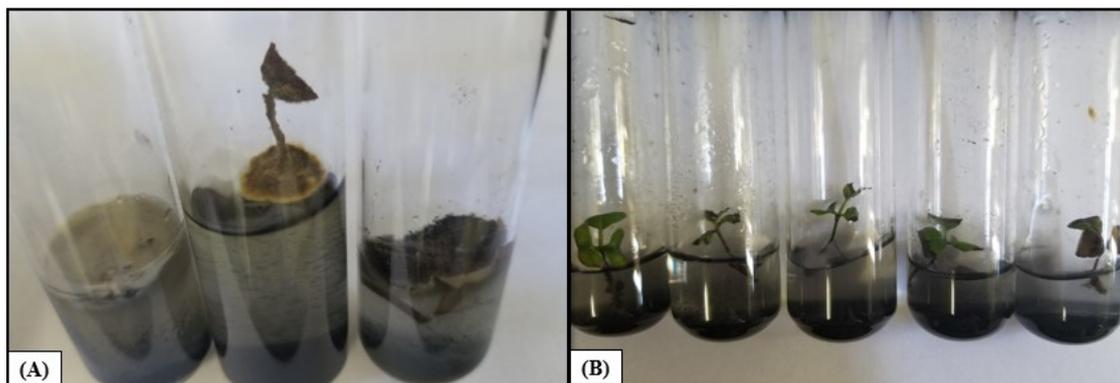


FIGURA 2. Frascos contaminados (A). Escala de fitotoxicidez de produtos químicos utilizados para desinfecção de segmentos nodais de aroeira (B). (Foto: Arquivo pessoal).

O segundo experimento foi conduzido no período de fevereiro a abril de 2019, em delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 3 x 2, sendo o primeiro fator reguladores vegetais e o segundo, concentrações dos mesmos, com cinco repetições e cada parcela constituída por dez frascos com um explante cada (Tabela 2).

TABELA 8. Reguladores vegetais e concentrações utilizados para o estabelecimento de aroeira. Uberlândia-MG, 2019.

Reguladores	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Espermina	0,1
	0,5
Espermidina	0,1
	0,5
Putrescina	0,1
	0,5

Aos 60 dias após colocar os explantes em meio de cultura foram avaliadas as características comprimento da parte aérea e radicular das plantas (cm) com uso de uma régua milimetrada, número de folhas através da contagem visual e biomassa (g) das plantas desenvolvidas com uso de uma balança analítica de precisão.

Os dados foram testados quanto às pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, a 1% de probabilidade, utilizando o software estatístico SPSS (IBM, 2013). Após os testes de pressuposições, as variáveis foram submetidas à análise de variância com o auxílio do

programa SISVAR (FERREIRA, 2014) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Desinfecção de explantes de aroeira

A taxa de sobrevivência dos explantes de aroeira não foi satisfatória apenas em desinfestação realizada com Oxicleto de cobre (28%), nos demais agentes ativos utilizados a sobrevivência foi superior a 80% (Tabela 9).

TABELA 9. Taxa de sobrevivência (%), contaminação (%) e fitotoxicidade de segmentos nodais de aroeira submetidos ao tratamento para desinfestação. Uberlândia-MG, 2019.

Tratamento	Sobrevivência	Contaminação	Fitotoxicidade
Hipoclorito de sódio	96,00 a	10,00 a	0,00 a
Oxicleto de cobre	28,00 b	42,00 a	2,23 bc
Ipconazole + tiram	93,54 a	38,00 a	2,74 c
Fludioxonil + metalaxil	80,00 a	82,00 b	1,33 b
Média	74,39	43,00	1,58
W: F <sub>Lev</sub>	0,754; <b>3,695</b>	<b>0,962;2,202</b>	<b>0,948;3,679</b>
CV (%)	35,74	41,22	42,6

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade; CV: coeficiente de variação.

Provavelmente os explantes tiveram exposição a uma dose acima da capacidade de assimilação, o que gerou estresse. A presença de cobre em níveis excessivos no ambiente afeta negativamente a germinação das sementes e o crescimento das plantas (JALAL et al., 2018), pois altera a absorção de nutrientes minerais (DE FREITAS et al., 2015) e reduz a fotossíntese (DRZEWIECKA et al., 2017; HIPPLER et al., 2018). O estresse pode ser reversível a princípio, mas podem se tornar permanentes explicando a menor sobrevivência dos explantes tratados com esse fungicida (LARCHER, 2006).

Oxicleto de cobre mostrou-se altamente tóxico às plantas de milho nas dosagens utilizadas por Pinto (2004) e Bomfeti et al. (2007). Fischer et al. (2017) avaliando eficiência de fungicidas observaram que o oxicleto de cobre foi o que menos inibiu o patógeno, sendo considerado ineficiente.

Os explantes apresentaram grau variado de contaminação em função dos tratamentos (Tabela 9). Os produtos hipoclorito de sódio, oxicleto de cobre e ipconazole

+ tiram não diferiram entre si e resultaram em menores percentagens de contaminação quando comparados ao fungicida fludioxonil + metalaxil que atingiu valor médio de 82% de explantes contaminados.

O crescimento de bactérias e fungos no meio nutritivo inviabiliza o estabelecimento da cultura *in vitro* e compromete a composição química do meio de cultura, tanto pelo consumo de nutrientes quanto pela liberação de compostos produzidos por esses micro-organismos (DE SOUZA et al., 2014).

Deve-se ressaltar que mesmo com a utilização de agentes químicos ainda assim pode ocorrer contaminação. A aplicação se justifica pela necessidade de controle, minimizando as perdas de explantes no cultivo *in vitro*. De acordo com Fernandes (2016) a eficácia na assepsia é influenciada por fatores como características da planta, produto utilizado, tempo de exposição e dose adequada.

Houve efeito significativo quanto a fitotoxicidade dos tratamentos aos segmentos nodais de aroeira (Tabela 9). O hipoclorito de sódio não provocou sintomas de fitotoxicidade às plantas enquanto o fungicida Ipconazole + tiram foi o mais fitotóxico. A fitotoxicidade refere-se à ação tóxica que uma substância provoca nas plantas, isto é, prejudica o desenvolvimento da planta. Embora o fungicida Ipconazole + tiram tenha demonstrado maiores valores de fitotoxicidade ele foi eficiente na redução da contaminação sem afetar negativamente a sobrevivência dos explantes (93,5%). O princípio ativo ipconazole, pertence ao grupo químico dos triazóis, caracterizado pela elevada fungitoxicidade, sendo a maioria sistêmicos, de rápida penetração, absorvidos e translocados pela planta de forma acropetal com atuação como protetores ou curativos.

A adição de substâncias fungicidas e bactericidas ao meio de cultura foi favorável ao controle de contaminação por patógenos na micropropagação de acácia-negra (ISHIBASHI et al., 2017). Porém vale ressaltar qual melhor custo/benefício da atividade e as alternativas disponíveis no mercado. Isso porque os fungicidas apresentam, em geral, alto custo, possíveis efeitos adversos na fitotoxicidade a espécie, efeitos à saúde e aspectos relacionados a poluição ambiental (KEKUDA et al., 2016).

O uso de hipoclorito de sódio também foi a assepsia mais eficiente para a germinação e desenvolvimento de embriões de pêssego (NASCIMENTO et al., 2018). É válido ressaltar, que a dosagem do hipoclorito de sódio é fator importante na desinfestação. Salazar-Mercado et al. (2019) indicaram que o hipoclorito de sódio é uma substância altamente citotóxica e em doses inadequadas podem promover anomalias cromossômicas, bloqueios nos ciclos celulares e inibir a síntese de DNA.

### 3.2 Reguladores vegetais no estabelecimento de aroeira

O número de folhas apresentou efeito significativo para a interação entre regulador vegetal e concentração utilizada. Na concentração 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  a espermina proporcionou maior quantidade de folhas quando comparada a putrescina que foi favorecida com aumento da concentração para 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  (Tabela 10).

TABELA 10. Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm) e biomassa da parte aérea (g) de aroeira (*M. urundeuva* All.) submetidos a reguladores vegetais. Uberlândia-MG, 2019.

Reguladores	NF			CR (cm)		
	0,1	0,5	Média	0,1	0,5	Média
Espermina	5,40 Aa	4,20 Aa	4,80	4,30 Aa	3,36 Aa	3,83
Espermidina	3,60 Aab	5,40 Aa	4,50	2,18 Ab	3,14 Aa	2,66
Putrescina	2,40 Bb	5,40A a	3,90	2,78 Ab	3,50 Aa	3,14
Média	3,80	5,00		3,09	3,33	
CV (%)		31,74			22,93	
	CPA (cm)			MFPA (g)		
	0,1	0,5	Média	0,1	0,5	Média
Espermina	2,68	3,40	3,04 a	0,110	0,116	0,11 ab
Espermidina	2,60	2,20	2,40 b	0,108	0,138	0,12 a
Putrescina	2,22	2,36	2,29 b	0,088	0,092	0,09 b
Média	2,50 A	2,65 A		0,10 A	0,21 A	
CV (%)		19,18			20,61	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade. CV: coeficiente de variação; NF: número de folhas; CPA: comprimento da parte aérea; CR: comprimento da raiz e MFPA: biomassa da parte aérea.

A menor dose de espermina pode ter estimulado a produção endógena deste regulador devido ao metabolismo das enzimas poliaminas sintetase e S-adenosilmetionina sintetase resultando num acúmulo que refletiu no maior número de folhas (TANG et al., 2004). As poliaminas têm sido utilizadas com sucesso no meio de cultura de células vegetais para induzir maior número de brotações em várias espécies de plantas (VASUDEVAN, et al., 2017). As ações nas plantas relacionam-se com atividades antioxidantes, estabilizadores de ácidos nucleicos e biomembranas e reguladores do pH citosólico para proteção contra fatores abióticos (LIU et al., 2018).

A espermina resultou em comprimento da parte aérea 21,05 e 24,67% maiores que as tratadas com espermidina e putrescina respectivamente (Tabela 10). Estes resultados são similares aos observados por Kumari e George (2011) em orquídeas do gênero *Dendrobium* com melhor crescimento de brotos obtidos com espermina.

Houve interação entre as concentrações utilizadas e as poliaminas sob o comprimento das raízes. Na maior concentração não foram verificadas diferenças entre os tratamentos, já na concentração 0,1 mg L<sup>-1</sup> a espermedina resultou em raízes maiores. (Tabela 10). A inibição do crescimento de raiz já foi descrita anteriormente em *Arabidopsis* por TASSONI et al. (2000) quando usaram concentrações acima de 0,8 mM de espermidina.

Como a interação entre regulador vegetal e concentração não foi significativa para a variável biomassa da parte aérea os fatores foram analisados isoladamente. A utilização de espermidina favoreceu a biomassa da parte aérea da aroeira e a espermina não diferiu das demais poliaminas (Tabela 10). Arun et al. (2016) também observaram respostas favoráveis na produção de brotos e alongamento da parte aérea de soja transgênica, destacando a ação estimuladora das poliaminas na divisão celular. Os autores afirmaram inclusive, que as plantas transformadas se regeneraram melhor na presença de poliaminas. Ajithan et al. (2019) também atribuíram maior taxa de plantas de ervilha transgênica regeneradas as poliaminas e com maior taxa de aclimatação mesmo em circunstâncias estressantes devido ao significativa aprimoramento de antioxidantes e pigmentos fotossintéticos.

Putrescina promove alterações no perfil proteômico de explantes, interfere positivamente em processos metabólicos, celulares e de desenvolvimento, na síntese de proteínas e na resposta a estímulo associado ao estresse oxidativo (ARAGÃO et al., 2017). Os autores atribuíram ao uso da poliamina uma melhoria no protocolo de micropropagação de *C. fissilis*. Vasudevan et al. (2017) verificaram maior número de raízes em brotos de *C. lanatus* em meio suplementado com putrescina (10 mg L<sup>-1</sup>), juntamente com AIB e isoleucina.

#### 4 CONCLUSÕES

A utilização de solução de hipoclorito de sódio a 2% é eficiente para desinfestação de segmentos nodais de aroeira por proporcionar redução da contaminação, maior taxa de sobrevivência sem causar fitotoxicidez.

O fungicida a base de ipconazole + thiram apesar de causar fitotoxicidade é uma alternativa para desinfestação de segmentos nodais de aroeira.

A espermina é a poliamina que promove o crescimento da parte aérea e na concentração 0,1 mgL<sup>-1</sup> proporciona maior números de folhas e comprimento de raiz.

Para maior biomassa da parte aérea da aroeira a espermidina é melhor que putrescina.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, N. A.; ALI, I.; HAFIZ, I. A.; KHAN, A. S. Application of polyamines in horticulture: A review. **International Journal of Biosciences**, Bangladesh, v. 10, n. 5, p. 319-342, 2017. DOI: <https://doi.org/10.12692/ijb/10.5.319-342>

AGUIAR GALVÃO, W. R.; BRAZ FILHO, R.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; CAMPOS, A. R.; MOREIRA, A. C. O. M.; SILVA, S. O.; MESQUITA FILHO, F. A.; SAA, R. S.; MELO JUNIOR, J. M. A.; GONÇALVES, N. G. G.; FONSECA, S. G. C.; BANDEIRA, M. A. M. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - a conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, Pretoria, v. 222, p. 177–189, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.024>

AJITHAN, C.; VASUDEVAN, V.; SATHISH, D.; SATHISH, S.; KRISHNAN, V.; MANICKAVASAGAM, M. The influential role of polyamines on the *in vitro* regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) and genetic fidelity assessment by SCoT and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Switzerland, v. 139, n. 3, p. 547-561, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01699-z>

ARAGÃO, V. P. M.; REIS, R. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Putrescine promotes changes in the endogenous polyamine levels and proteomic profiles to regulate organogenesis in *Cedrela fissilis* Vellozo (*Meliaceae*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Switzerland, v. 130, n. 3, p. 495–505, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1239-y>

ARUN, M.; CHINNATHAMBI, A.; SUBRAMANYAN, K.; KARTHIK, S.; SIVANANDHAN, G.; THEBORAL, J.; GANAPATHI, A. Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation in half-seeds of soybean. **3 Biotech**, Switzerland, v. 6, n. 2, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0448-0>

BERTONHA, L. J.; FREITAS, M. L. M.; CAMBUIM, J.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Seleção de progênies de *Myracrodruon urundeuva* baseada em caracteres fenológicos e de crescimento para reconstituição de áreas de Reserva Legal. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 44, n. 109, p. 95104, 2016. DOI: <https://doi.org/10.18671/scifor.v44n109.09>

BOMFETI, C. A.; MEIRELLES, W. F.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Avaliação de produtos químicos comerciais, *in vitro* e *in vivo*, no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananati*. **Summa Phytopathologia**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 63-67, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000100009>

BRITO, L. P. S.; BEZERRA, T. T.; NUNES, E. M. B.; CAVALCANTE, M. Z. B.; SIQUEIRA FILHO, J. A. Produção de mudas de *Schinopsis brasiliensis* Engler sob prévia lavagem do pó de coco e submetidas a doses crescentes de fertilizante de liberação controlada. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 1022-1034, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509833385>

CANUTO, D. S. O., SILVA, A. M., MORAES, M. L. T., RESENDE, M. D. L. Estabilidade e adaptabilidade em testes de progênies de *Myracrodruon urundeuva* sob quatro sistemas de plantio. **Cerne**, Lavras, v. 22, n. 2, p. 171-180, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/01047760201622021978>

CARVALHO, S. M. S. Cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *Bertholletia excelsa* H.B.K. 2012. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.

CECÍLIO, A. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; CAMPAN, P. R. V.; FRANCISCO, F. L.; DUARTE, M. G. R.; MENDONÇA, L. A. M.; ALMEIDA, V. L. Antiviral activity of *Myracrodruon urundeuva* against rotavirus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 197-202, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.10.005>

CRUZ, F. R. S.; ANDRADE, L. A.; FEITOSA, R. C. Produção de mudas de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) em diferentes substratos e tamanho de recipientes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 69-80, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509821092>

DE FREITAS, T. A.; FRANÇA, M. G. C.; DE ALMEIDA, A. A. F.; DE OLIVEIRA, S. J. R.; DE JESUS, R. M.; SOUZA, V. L.; MANGABEIRA, P. A. Morphology, ultrastructure and mineral uptake is affected by copper toxicity in young plants of *Inga subnuda* subs. *luschnathiana* (Benth.) TD Penn. **Environmental Science and Pollution Research**, Switzerland, v. 22, n. 20, p. 15479-15494, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4610-8>

DE OLIVEIRA PRUDENTE, D.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; GOULART, V. L. A.; DO NESCIAMENTO, A. A. C. Micropropagação de candeia, uma espécie nativa do cerrado brasileiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 3, p. 305-311, 2016. DOI: <https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n3p305-311>

DE SOUZA, A. V.; SANTOS, M. D. C.; de SOUZA, M. D.; LARANJEIRA, L. **Protocolos de assepsia para o estabelecimento *in vitro* de espécies medicinais nativas da Caatinga**. Petrolina: Embrapa Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2014.

DRZEWIECKA, K.; MLECZEK, M.; GASECKA, M.; MAGDZIAK, Z.; BUDKA, A.; CHADZINIKOLAU, T.; GOLINSKI, P. Copper and nickel co-treatment alters metal uptake and stress parameters of *Salix purpurea* × *viminalis*. **Journal of plant physiology**, Germany, v. 216, p. 125-134, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.020>

FERNANDES, D.A. Germinação E propagação *in vitro* de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão), Tese de doutorado, Cuiabá, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

FISCHER, I. H.; MORAES, M. F.; PALHARINI, M. C. A.; CRUZ, J. C. S.; FIRMINO, A. C. Ocorrência de antracnose em abacate, agressividade e sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. *Agropecuária Científica no Semiárido*, Patos-PB, v. 13, n. 2, p. 130-137, 2017.

HIPPLER, F. W. R.; DOVIS, V. L.; BOARETTO, R. M.; QUAGGIO, J. A.; AZEVEDO, R. A.; WILLIAMS, L. E.; MATTOS-Jr, D. Photosynthesis is differently regulated during and after copper-induced nutritional stress in citrus trees. **Physiologia plantarum**, Lund, v. 163, n. 3, p. 399-413, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppl.12746>

IBM Corp. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp, 2013.

ISHIBASHI, V.; KOGUTA, K. V.; JUNIOR, P. C. F.; HIGA, A. R. Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 15-21, 2017.

JAGU, E.; POMEL, S.; PETHE, S.; LOISEAU, P. M.; LABRUERE, R. Polyamine-based analogs and conjugates as antikinoplastid agents. **European journal of medicinal chemistry**, Switzerland, v. 139, p. 982-1015, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.014>

JALALI, K.; NOUAIRI, I.; KALLALA, N.; M'SEHLI, W. I. S. S. A. L.; ZRIBI, K.; MHADHBI, H. Germination, seedling growth, and antioxidant activity in four legume (Fabaceae) species under copper sulphate fungicide treatment. **Pakistan Journal Botany**, Pakistan, v. 50, p. 1599-1606, 2018.

KEKUDA, P. T. R.; AKARSH, S.; NAWAZ, N. A. S.; RANJITHA, M. C.; DARSHINI, S. M.; VIDYA, P. *In vitro* antifungal activity of some plants against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 5, n. 6, p. 331-337, 2016. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.037>

KUMARI, I. P.; GEORGE, T. S. *In vitro* clonal shoot morphogenesis of commercial Dendrobium orchid cultivars in polyamines supplemented medium. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 49, p. 118-120, 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**, São Carlos: Rima, 2006. 398 p.

LI, Y.; MA, Y.; ZHANG, T.; Bi, Y.; WANG, Y.; PRUSKY, D. Exogenous polyamines enhance resistance to *Alternaria alternata* by modulating redox homeostasis in apricot fruit. **Food chemistry**, Norwich, v. 301, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125303>

LIMA, J. R. F. **Diagnóstico e monitoramento do uso de espécies vegetais e animais do semiárido da Paraíba (Nordeste, Brasil): um estudo de caso no município de Cabaceiras**. *Revista Nordestina de Biologia*, João Pessoa, v. 26, p. 1-18. 2013.

LIU, T.; HUANG, B.; CHEN, L.; XIAN, Z.; SONG, S.; CHEN, R.; HAO, Y. Genome-wide identification, phylogenetic analysis, and expression profiling of polyamine synthesis gene family members in tomato. **Gene**, United States of America, v. 661, p. 1-10, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.084>

LOPES, J. C.; SANTOS, J. D. P.; CAVALCANTE, P. M.; CAVALCANTE, M. R.; SANTOS, F. A. V.; AGUIAR, J. J.; MATIAS, E. F. F.; CUNHA, F. A. B.; COUTINHO, H. D. M.; FIGUEREDO, F. G. Caracterização química e avaliação da atividade antifúngica e antioxidante do extrato etanólico de *Myracrodruon urundeuva* all. **Revista Interfaces: saúde, humanas e tecnologia**, Juazeiro do Norte, v. 6, n. 17, p. 111-118, 2018.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-97, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NASCIMENTO, D. C.; DINI, M.; CARPENEDO, S.; RASEIRA, M. C. B. Germination and Development of 'Precocinho' Peach Embryos: Asepsis and Use of PPMTM in Culture Medium. **Journal of Experimental Agriculture International**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 1-7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.9734/JEAI/2018/41065>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, Ohio, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

OLIVEIRA, F. A.; RORATO, V. C.; ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; RODRIGUES, A. B.; BARROS, A. L.; SANGALLI, A.; ARENA, A. C.; MOTA, J. S.; GRISOLIA, A. B.; OLIVEIRA, K. M. P. *In vitro* antifungal activity of *Myracrodruon urundeuva* Allemão against human vaginal *Candida species*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 2423–2432, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170254>

PINTO, N. F. J. A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 134-138, 2004. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v3n1p134-138>

RODRIGUEZ, S. C.; ALVARADO, J. C.; ESPÍRITO-SANTO, M. M.; NUNES, Y R. F. *Myracrodruon urundeuva* fr all. (aroeira tree) population Dynamics, diameter growth rate and its potential for sustainable management in successional tropical dry forests of Brazil. **Revista árvore**, Viçosa, v. 41, n. 3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-90882017000300010>

SALAZAR-MERCADO, S. A.; TORRES-LEÓN, C. A.; ROJAS-SUÁREZ, J. P. Cytotoxic evaluation of sodium hypochlorite, using *Pisum sativum* L as effective bioindicator. **Ecotoxicology and environmental safety**, United Kingdom, v. 173, p. 71-76, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.027>

SANTOS, J.; PINHEIRO, M. V. M.; FONTANA, D. C.; SCHMIDT, D.; PRETTO, M. M. Estabelecimento in vitro de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki'. **Ciencia Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 508-518, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509831305>

SHEDOEVA, A. L.; LEAVESLEY, D.; UPTON, Z.; FAN, C. Wound Healing and the Use of Medicinal Plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2684108>

SILVA, A. C. M.; COSTA, T. P. D.; COSTA, M. K. C.; SAI, E. F.; RODRIGUES, R. R. Assepsia de segmentos nodais de mini-rosa (*Rosa* sp.) para o estabelecimento *in vitro*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 7, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v7n1.silva>

SOUZA, L. M.; HOULLOU, L. M. Micropropagação de espécies arbóreas: Alternativa biotecnológica na recuperação de ambientes degradados. *In*: Seabra G, Marcelino M.M; POTUGUEZ, A.P; OLIVEIRA JUNIOR, A; NEU, C.; SEABRA, G.F.; OLIVEIRA, H. C. M.; ARAÚJO, L. F.; PEREIRA, M. I. C. **Terra, Mudanças Climáticas e Biodiversidade**. Editora Ituiutaba: Barvalento, v. 1, p. 837-847. 2019.

TANG, W.; NEWTON, R. J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 122, n. 3, p. 386-395, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00406.x>

TASSONI, A.; VAN BUUREN, M.; FRANCESCHETTI, M.; FORNALÈ, S.; BAGNI, N. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bari, v. 38, n. 5, p. 383-393, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00757-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00757-9)

VASUDEVAN, V.; SUBRAMANYAM, K.; ELAYARAJA, D.; KARTHIK, S.; VASUDEVAN, A.; MANICKAVASAGAM, M. Assessment of the efficacy of amino acids and polyamines on regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by SCoT and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Switzerland, v. 130, n. 3, p. 681-687, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1243-2>

VIANA, G. S. C.; CALOU, I. B. F. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Properties from the Bioactive Constituents of *Myracrodruon urundeuva*, a Brazilian Medicinal Species. **Translational Neuroscience Research and Reviews**, United States of America, v. 2, n. 1, p. 10-17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.36959/817/521>

VILAS, J. M.; ROMERO, F. M.; ROSSI, F. R.; MARINA, M.; MAIALE, S. J.; CALZADILLA, P. I.; GÁRRIZ, A. Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and *Pseudomonas syringae*. **Journal of plant physiology**, Germany, v. 231, p. 281-290, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.014>

WINHELMANN, M. C.; TEDESCO, M.; LUCCHESI, J. R.; FIOR, C. S.; SCHAFER, G. Propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima*. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 70, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970025>

## CAPÍTULO 3

### MULTIPLICAÇÃO, MORFOGÊNESE E ABSCISÃO FOLIAR DE *Schinopsis brasiliensis in vitro*

#### RESUMO

A baraúna apresenta exploração descontrolada e irresponsável, o que tornou a espécie ameaçada de extinção. A cultura de tecidos de plantas é uma alternativa para produção de mudas em grande escala e de forma eficiente, o que pode auxiliar a conservação de espécies nativas como a baraúna. Nesse sentido, objetivou-se avaliar reguladores vegetais para multiplicação e inibidores de etileno sobre o desenvolvimento e a abscisão foliar da baraúna. Três experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina – PE. Os segmentos nodais foram obtidos de plantas jovens não lignificadas. O delineamento dos três experimentos avaliados foi o inteiramente casualizado. No primeiro experimento avaliou-se zeatina (ZEA) nas concentrações 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0  $\mu\text{L}^{-1}$  combinadas as concentrações 0,1; 0,2; 0,4 e 0,5  $\mu\text{L}^{-1}$  de ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB). No segundo experimento, foi avaliado zeatina (ZEA) e 6-benzilamino purina (BAP) nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0  $\mu\text{L}^{-1}$  mais uma testemunha (dose zero), em fatorial 5x2+1. Para redução da abscisão foliar, avaliou-se em fatorial 4x2 as concentrações de 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  dos inibidores de etileno: nitrato de prata e cloreto de cobalto. Os resultados mostraram que a adição de 0,2  $\mu\text{L}^{-1}$  de ANA a 0,4  $\mu\text{L}^{-1}$  de ZEA promove maior número de brotos de baraúna. O AIA é a auxina mais adequada a ser associada a ZEA para maior comprimento de brotos e número de gemas. Nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  o cloreto de cobalto é mais eficiente que o nitrato de prata para a redução da abscisão foliar da baraúna. O nitrato de prata a partir da concentração de 20  $\mu\text{M}$  evita completamente a abscisão foliar enquanto o cloreto de cobalto tem máxima redução da abscisão na concentração 40  $\mu\text{M}$ .

**Palavras-chave:** auxinas, citocininas, etileno, cloreto de cobalto, nitrato de prata.

#### ABSTRACT

### MULTIPLICATION, MORPHOGENESIS AND FOLIAR ABSCISION OF *Schinopsis brasiliensis in vitro*

The barauna presents uncontrolled and irresponsible exploitation, which made the species threatened with extinction. Plant tissue culture is an alternative for large-scale and efficient seedling production, which can assist the conservation of native species such as barauna. In this sense, the objective was to evaluate plant growth regulators and ethylene inhibitors on the development and leaf abscission of barauna. Three experiments were carried out at the Biotechnology Laboratory of Embrapa Semiárido, Petrolina - PE. The nodal segments were obtained from non-lignified young plants. The design of the three evaluated experiments was completely randomized. In the first experiment, zeatin (ZEA) was evaluated at concentrations 0,2; 0,4; 0,8 and 1,0  $\mu\text{L}^{-1}$  combined at 0,1 concentrations; 0,2; 0,4 and 0,5  $\mu\text{L}^{-1}$  of 3-indolacetic acid (IAA), naphthalene acetic acid (NAA) and indolbutyric acid (IBA). In the second experiment, zeatin (ZEA) and 6-benzylamino purine (BAP) were evaluated at concentrations 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 and 1,0  $\mu\text{L}^{-1}$  plus a control (zero dose), in a 5 x 2 + 1 factorial. To reduce leaf abscission was evaluated in

factorial scheme 4 x 2, ethylene inhibitors silver nitrate and cobalt chloride in concentrations of 5, 10, 20 and 40  $\mu\text{M}$ . The results showed that the addition of 0,2  $\mu\text{L}^{-1}$  of NAA to 0.4  $\mu\text{L}^{-1}$  of ZEA promotes a greater number of barauna sprouts. IAA is the most suitable auxin to be associated with ZEA for longer sprouts length and number of buds. At concentrations of 5 and 10  $\mu\text{M}$ , cobalt chloride is more efficient than silver nitrate for reducing leaf abscission in barauna. Silver nitrate from a concentration of 20  $\mu\text{M}$  completely avoids leaf abscission while cobalt chloride has a maximum reduction in abscission at a concentration of 40  $\mu\text{M}$ .

**Keywords:** auxins, cytokinins, cobalt chloride, ethylene, silver nitrate.

## 1 INTRODUÇÃO

Baraúna é amplamente utilizado na medicina tradicional (folhas, casca, caule, entrecasca, resina e frutos) para fins anti-inflamatórios, analgésicos, hemostáticos, antissépticos e antimicrobianos. Estudos fitoquímicos mostraram a presença de polifenóis, flavonoides e taninos (FERNANDES et al., 2015; MEDEIROS et al., 2018). Dentre os usos, destacam-se a ação anticoagulante (GOMES; BANDEIRA, 2012), alívio de distúrbios gástricos (RIBEIRO et al., 2014) e progressão mais lenta de algumas doenças cancerígenas como o câncer colorretal (SANTOS et al., 2017; LUZ et al., 2018).

Atualmente a baraúna é considerada uma árvore nobre. Devido ao quase esgotamento das reservas de baraúna é proibido a coleta, transporte, armazenamento, manejo, beneficiamento e comercialização dessa espécie (BRASIL, 2014; BRITO et al., 2018). Somado a perda gradual da variabilidade genética, o estabelecimento de mecanismos para preservação e multiplicação de espécies nativas configura estratégia para manutenção de espécies de notável potencial econômico e ambiental (SANTOS et al., 2017) como a baraúna.

A técnica em cultura de tecidos pode ser utilizada para a conservação do germoplasma e multiplicação em larga escala de culturas com caracteres agrônômicos, tanto de produtividade como qualidade, com destaque aos metabólitos secundários de alto valor biológico (SHAHZAD et al., 2017). A micropropagação possibilita a propagação rápida e assexuada em um ambiente controlado (AL-KHAYRI; NAIK, 2017). Isso é possível devido a expressiva plasticidade das plantas e a elevada e contínua adaptação ao meio em que se desenvolve, em resposta a sinais exógenos e/ou endógenos (FEHÉR, 2015).

Na fase de multiplicação, considera-se o pressuposto de que o sucesso do cultivo *in vitro* depende de fatores associados à indução da morfogênese e da organogênese (regeneração de brotos e raízes) e se faz necessário que o meio nutritivo forneça substâncias essenciais ao crescimento da planta *in vitro* (MORAIS et al., 2014).

Os mecanismos moleculares que regem a programação e reprogramação de células vegetais e células com totipotência (IKEUCHI et al., 2016) e direcionam o desenvolvimento vegetal são ativadas através de sinalização de hormônios vegetais. Os níveis endógenos de hormônios regulam os processos de diferenciação de explantes, sendo a sensibilidade as concentrações de hormônio variáveis entre as espécies (GUO et al., 2017; KUMARI et al., 2018).

A baixa proporção de auxina/citocinina tende a induzir a regeneração da parte aérea, enquanto uma alta proporção de auxina/citocinina promove a regeneração das raízes. Ademais, a alta concentração de auxina pode promover embriogênese somática a partir de explantes (HORSTMAN et al., 2017, IWASE et al., 2018).

O desenvolvimento das plantas em ambiente fechado promove a formação e acúmulo do hormônio etileno, com concentração dependente da intensidade da luz, biossíntese de pigmentos dos explantes, concentração de CO<sub>2</sub>, umidade, temperatura do ar, condições do meio de cultura, etc. O etileno em grandes concentrações induz a abscisão foliar e afeta o crescimento, diferenciação e envelhecimento de plantas *in vitro* (HA et al., 2020).

É fundamental que as concentrações dos reguladores de crescimento das plantas estejam em equilíbrio, na proporção adequada entre auxina e citocinina para otimizar a propagação *in vitro* (PRUDENTE et al., 2019; EMARA et al., 2017). Destaca-se que o equilíbrio é entendido como as concentrações totais combinadas entre: hormônios endógenos e exógenos (MASTUTI et al., 2017).

O cultivo *in vitro* de espécies nativas apresenta grandes desafios, principalmente relacionados à adequação dos meios de cultura, fatores físicos e reguladores de crescimento (PRUDENTE et al., 2016). Na literatura existe escassez de trabalhos realizados com a baráúna avaliando a multiplicação *in vitro* e o efeito de hormônios exógenos, ou seja, reguladores vegetais adicionados ao meio de cultivo. Considerando a importância da espécie, o relevante potencial econômico e o elevado risco de extinção, objetivou-se induzir a multiplicação *in vitro* de Baráúna e avaliar o efeito de reguladores vegetais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Três experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina – PE com sementes provenientes do Laboratório de Sementes da mesma instituição.

Para obtenção de segmentos nodais no mês de agosto de 2014 as sementes foram colocadas em bandejas de isopor com 128 células com substrato comercial sendo utilizada uma semente por célula (Figura 1). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação onde receberam água diariamente por meio de regadores por 120 dias. As plantas receberam um pré-tratamento *in vivo* com três pulverizações consecutivas com fungicida sistêmico (tiofanato-metílico) e bactericida (gentamicina). No dia seguinte à última pulverização as plantas jovens e não lignificadas foram seccionadas para a extração de segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento sem folhas que foram utilizados como explantes para o experimento *in vitro*.

Os explantes foram levados ao laboratório, lavados em água corrente e só então se procedeu a desinfestação do material em capela de fluxo laminar. A desinfestação ocorreu por meio da imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 2% em agitação por 10 minutos, seguida de três lavagens com água destilada e autoclavada e na última lavagem a água foi acrescida de 1 g L<sup>-1</sup> de PVP (polivilpirrolidona).

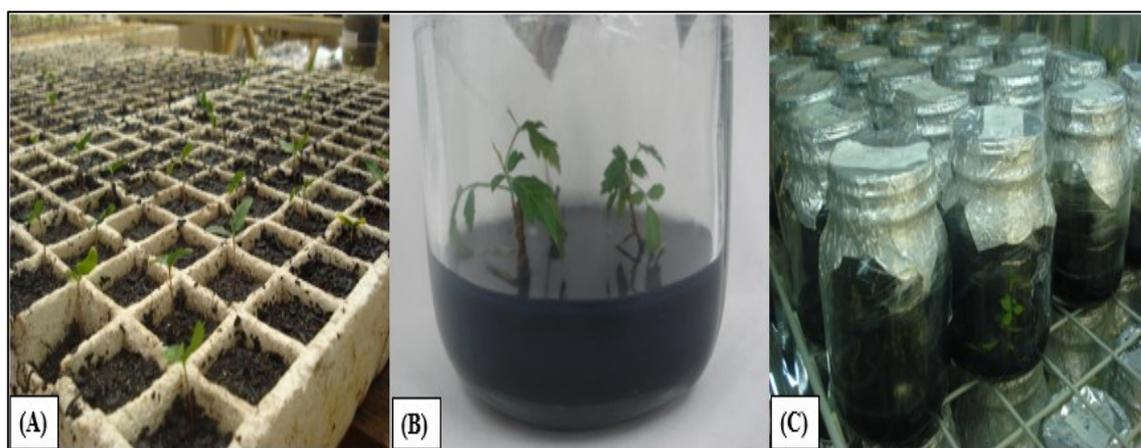


FIGURA 3. Plantas de baraúna obtidas da germinação das sementes (A). Plantas de baraúna estabelecidas *in vitro* no momento da avaliação (B). Frascos com explantes na câmara de crescimento. (Fotos: Arquivo pessoal).

Os recipientes utilizados para colocar os explantes foram frascos de vidro transparentes de 200 mL contendo 30 mL de meio WPM (Wood Plant Medium, 1980) adicionados dos tratamentos conforme Tabela 3 onde foram colocados quatro explantes.

O meio foi acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e carvão ativo a 2 g L<sup>-1</sup> e o pH foi mensurado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de claro, 8 horas de escuro e temperatura de 25 ± 2 ° C.

O primeiro experimento foi realizado entre os meses de janeiro e fevereiro de 2015 para avaliação de diferentes concentrações de zeatina associada a diferentes fontes de auxinas (AIA, ANA e AIB) em meio WPM – Woody Plant Medium-(LLOYD; MCCOWN, 1980) e um controle apenas com o meio conforme Tabela 11.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 13 tratamentos e 5 repetições. Cada parcela experimental consistiu em um frasco com quatro explantes cada.

TABELA 11. Tratamentos utilizados para estabelecimento *in vitro* de *Schinopsis brasiliensis*. Petrolina - PE, 2019.

Tratamento	Auxina	Concentração de Auxina (µM)	Concentração de Zeatina (µM)
T1	-	0,0	0,0
T2	AIA	0,1	0,2
T3	AIA	0,2	0,4
T4	AIA	0,4	0,8
T5	AIA	0,5	1,0
T6	ANA	0,1	0,2
T7	ANA	0,2	0,4
T8	ANA	0,4	0,8
T9	ANA	0,5	1,0
T10	AIB	0,1	0,2
T11	AIB	0,2	0,4
T12	AIB	0,4	0,8
T13	AIB	0,5	1,0

As avaliações foram realizadas após 30 dias da instalação do experimento e as variáveis analisadas foram número de brotos e o número de gemas, por meio de contagem visual e o comprimento de broto com a utilização de uma régua milimetrada.

O segundo experimento ocorreu entre os meses de janeiro e fevereiro de 2015 e foram avaliadas diferentes concentrações de zeatina, BAP e um controle apenas com o meio (Tabela 12), ou seja, sem regulador vegetal, todos com uso do meio WPM – Woody Plant Medium – (LLOYD; MCCOWN, 1980).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 5 x 2 + 1 sendo cinco doses, dois reguladores e um tratamento controle adicional

totalizando onze tratamentos com cinco repetições. Cada parcela experimental consistiu de um frasco com quatro explantes cada.

TABELA 12. Tratamentos utilizados para estabelecimento *in vitro* de *Schinopsis brasiliensis*. Petrolina - PE, 2019.

Tratamento	Regulador vegetal	Concentração (µM)
T1	-	0,0
T2	Zeatina	0,1
T3	Zeatina	0,2
T4	Zeatina	0,4
T5	Zeatina	0,8
T6	Zeatina	1,0
T7	BAP	0,1
T8	BAP	0,2
T9	BAP	0,4
T10	BAP	0,8
T11	BAP	1,0

As avaliações foram realizadas após 30 dias da instalação do experimento e as variáveis analisadas foram número de brotos e o número de gemas através de contagem visual e o comprimento de broto com a utilização de uma régua milimetrada.

O terceiro experimento foi realizado entre os meses de agosto a outubro de 2015 em fatorial 4 x 2, sendo quatro doses e dois inibidores de abscisão (Tabela 13) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições conforme Tabela 13.

TABELA 13. Tratamentos utilizados para redução da abscisão *in vitro* de *Schinopsis brasiliensis*. Petrolina - PE, 2019.

Tratamento	Inibidores de etileno	Concentração (µM)
T1	nitrate de prata	5
T2	nitrate de prata	10
T3	nitrate de prata	20
T4	nitrate de prata	40
T5	cloreto de cobalto	5
T6	cloreto de cobalto	10
T7	cloreto de cobalto	20
T8	cloreto de cobalto	40

Após o preparo, os frascos foram levados para a esterilização em autoclave em temperatura de 120 °C e 1 kgf cm<sup>-2</sup> de pressão por 20 minutos. Na sequência foram retirados da autoclave, mantidos por 24 horas em estante na sala de crescimento para resfriar em temperatura ambiente e solidificar o meio de cultura.

Para colocar os explantes em meio foram utilizados instrumentos de manipulação esterilizados em autoclave que foram constantemente flambados durante o processo. A câmara de fluxo e todos os recipientes passaram por um processo de assepsia com aplicação de álcool 70% (v/v) além de serem submetidos à radiação UV durante 15 minutos.

Os frascos foram então identificados de acordo com os tratamentos, vedados com plástico filme para evitar possíveis contaminações e levados para sala de crescimento, onde foram dispostos aleatoriamente em uma prateleira de metal. A temperatura média desta sala foi de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas, sendo a intensidade luminosa de  $25 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (medida com luxímetro) fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

As avaliações foram realizadas após 60 dias da instalação do experimento e as variáveis analisadas foram o comprimento dos brotos medidos com um paquímetro, o número de gemas e a senescência de explantes por meio da contagem visual.

Os dados foram testados quanto às pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, a 1% de probabilidade, utilizando o software estatístico SPSS (IBM, 2013). Após os testes de pressuposições, as variáveis foram submetidas à análise de variância com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

No primeiro experimento, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. No segundo do experimento, as médias qualitativas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e quantitativas por meio de curvas de regressão polinomial. Para comparação entre os tratamentos e a testemunha (tratamento adicional), realizou-se o teste de Dunnett no software estatístico Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2016). No terceiro experimento, as médias qualitativas comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e quantitativas por meio de regressão polinomial.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Auxinas adicionadas a zeatina em diferentes concentrações.**

A adição de AIA à ZEA independente da concentração favoreceu significativamente o comprimento dos brotos da baraúna, enquanto ANA apenas na

menor concentração  $0,1 \mu\text{L}^{-1}$  e AIB na maior concentração  $1,0 \mu\text{L}^{-1}$  diferiram da testemunha sem reguladores (Tabela 14).

A utilização de ANA e ZEA a partir das concentrações de  $0,2$  e  $0,4 \mu\text{L}^{-1}$  respectivamente, resultaram em maior número de brotos de baráúna. Diversos fatores podem influenciar o processo de indução organogênica, como a concentração, os tipos de reguladores vegetais, a idade do explante, o genótipo, as condições físicas do cultivo, a composição e consistência do meio de cultura (DOBRÁNSZKI e SILVA, 2010).

Kwon et al. (2017) observaram que o número de brotos e o comprimento brotos diminuiu notavelmente com o aumento das concentrações de ANA em explantes de *P. grandiflorum*. Os autores relataram também que altas concentrações de ANA refletem em inibição no alongamento das raízes.

As auxinas e citocininas são sinergicamente necessários para induzir a divisão celular e crescimento em culturas de tecidos vegetais (HEGDE et al, 2017). A ZEA nas mesmas concentrações foi utilizada em conjunto as auxinas AIA, AIB e ANA, pressupõem-se que a diferença no número de brotos é um efeito das auxinas na mistura dos reguladores (KWON et al., 2017).

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 provocando respostas variadas sobre os explantes.

O AIB pode usar sistemas de transporte independentes e deslocar para um local de destino específico como um precursor inativo, evitando respostas de auxinas durante o transporte e mantendo os níveis de AIA onde necessário. A eficácia do enraizamento em resposta a diferentes auxinas também é afetada pela quantidade de auxinas endógenas, a quantidade de auxina livre expostos a células e a afinidade dos receptores de auxina envolvidos na resposta de enraizamento (PARK et al., 2017).

Quanto ao número de gemas, maiores quantidades foram observadas nos tratamentos que receberam AIA adicionada à ZEA. A associação dos reguladores ANA a ZEA nas doses  $0,2$  e  $0,4 \mu\text{L}^{-1}$  e  $0,4$  e  $0,8 \mu\text{L}^{-1}$  respectivamente e AIB  $0,1 \mu\text{L}^{-1}$  com ZEA  $0,2 \mu\text{L}^{-1}$  resultaram em número de gemas estatisticamente iguais ao tratamento controle sem auxinas ou citocininas (Tabela 14).

TABELA 14. Comprimento de brotos, número de brotos e número de gemas de baraúna em função de diferentes auxinas adicionadas a zeatina em diferentes concentrações. Petrolina - PE, 2019.

Tratamento	Concentração Auxinas ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Concentração Zeatina ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Comprimento de brotos (cm)	Número de brotos	Número de gemas
Controle	0,0	0,0	0,39 b	1,0 b	2,95 b
AIA	0,1	0,2	0,65 a	1,0 b	4,05 a
	0,2	0,4	0,62 a	1,0 b	3,85 a
	0,4	0,8	0,58 a	1,0 b	3,30 a
	0,5	1,0	0,58 a	1,0 b	3,60 a
	0,1	0,2	0,58 a	1,0 b	3,62 a
ANA	0,2	0,4	0,36 b	2,0 a	2,90 b
	0,4	0,8	0,44 b	2,0 a	2,65 b
	0,5	1,0	0,41 b	2,0 a	3,50 a
	0,1	0,2	0,36 b	1,0 b	2,90 b
AIB	0,2	0,4	0,37 b	1,0 b	3,35 a
	0,4	0,8	0,45 b	1,0 b	3,45 a
	0,5	1,0	0,56 a	1,0 b	3,90 a
	W: $F_{Lev}$			<b>0,979;1,158</b>	0,659;0,0
CV (%)			26,91	0,0	16,13
Transformação			-	$\sqrt{x + 0,5}$	-

Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade; CV (%): coeficiente de variação.

Diferente dos resultados obtidos neste estudo Valeriano (2016) destacou que as concentrações isoladas ou combinadas dos citocininas e auxinas não apresentaram influência sob a multiplicação da baraúna, entretanto o autor utilizou doses maiores de AIB que as empregadas neste estudo com até  $9,84 \mu\text{mL}^{-1}$ .

De Souza et al. (2014) em trabalho testando reguladores para o estabelecimento *in vitro* de baraúna observaram que a citocinina foi mais efetiva que a auxina no desenvolvimento de brotos e gemas. Já Costa et al. (2015) concluíram que não foi observado efeito dos tratamentos no número de brotos e nem aumento no número de gemas de baraúna tratadas com BAP e ZEA.

### 3.2 Citocininas em diferentes concentrações na multiplicação de baraúna *in vitro*

O número de brotos não foi influenciado pela interação entre citocininas e as concentrações testadas, pelos fatores isolados ou pela ausência de regulador vegetal conforme Tabela 15.

O comprimento de brotos foi favorecido pela utilização de ZEA na concentração 0,1  $\mu\text{L}^{-1}$  comparado a não utilização de citocininas e ao BAP na mesma concentração. A avaliação do número de gemas não demonstrou efeito da interação entre os reguladores vegetais e as concentrações, porém quando os efeitos foram avaliados isoladamente, ZEA proporcionou maior quantidade de gemas que o BAP (Tabela 15).

TABELA 15. Comprimento de brotos, número de brotos e número de gemas e abscisão foliar de baraúna em função de diferentes citocininas adicionadas ao meio em diferentes concentrações. Petrolina - PE, 2019.

Concentração ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Comprimento de brotos (cm)		Número de brotos		Número de gemas		Abscisão (%)	
	ZEA	BAP	ZEA	BAP	ZEA	BAP	ZEA	BAP
0,0	0,395*		1,00		3,65		5,00*	
0,1	0,941* a	0,370 b	1,00	1,00	4,50	2,80	35,00*b	0,00 a
0,2	0,537 a	0,360 a	0,95	1,00	3,97	2,70	10,00 a	0,00 a
0,4	0,535 a	0,450 a	0,95	1,00	3,62	3,00	15,00 a	0,00 a
0,8	0,395 a	0,450 a	0,95	1,00	2,90	3,65	15,00 a	25,00 a
1,0	0,410 a	0,395 a	0,95	1,00	3,85	2,90	50,00*b	25,00 a
Média	0,563	0,405	0,96	1,00	3,77 a	3,00 b	25,00	10,00
W: $F_{Lev}$	<b>0,25</b>	<b>1,18</b>	<b>3,28</b>	4,70	<b>3,70</b>	3,00	<b>0,88</b>	<b>2,70</b>
CV (%)	30,62		19,27		29,86		82,4	
Transformação	-		$\sqrt{x + 0,5}$		$\sqrt{x + 0,5}$		-	

Médias seguidas por letras distintas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; \*: Diferente pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade; W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade; CV (%): coeficiente de variação.

As diferenças entre citocininas estão relacionadas as taxas de translocação para as regiões responsivas, captação diferencial, efeitos variados sobre processos metabólicos e capacidade de alterar o nível de citocininas endógenas (RATHORE et al., 2016). A eficiência da ZEA pode estar relacionada a capacidade dos tecidos vegetais metabolizarem os reguladores de crescimento naturais rapidamente e associação com outros componentes celulares do explante, que pode variar em função da citocinina utilizada.

Cappellett et al. (2016) mencionaram que a ZEA é uma das melhores citocininas para induzir a proliferação de mirtilo, possivelmente pode-se associar a eficiência da ZEA a associação e sinergismo com outros componentes e minerais presentes no meio de crescimento (ORTIZ-ROJAS et al., 2017). Singh et al. (2016) relacionaram a citocinina a razão por trás do aumento do número de brotações e, devido ao papel das citocininas,

ocorre o crescimento dos brotos axilares. Segundo os autores a citocinina age na regeneração da parte aérea estimulando a acumulação de auxina em locais meristemáticos onde as brotações são iniciadas.

Os resultados referentes a abscisão foliar comprovaram efeito significativo da interação entre tipo de citocininas e concentrações (Tabela 15). A adição de ZEA promoveu maior taxa de abscisão foliar nas concentrações 0,1 e 1,0  $\mu\text{L}^{-1}$ , comparado ao BAP nas mesmas concentrações e também a não aplicação de reguladores vegetais. Encina et al. (1994) em estudo sobre a morfogênese em explantes de *A. cherimola* Mill., também reportaram a formação de brotos anormais e abscisão foliar com a utilização de ZEA.

Na presença de ZEA o comprimento dos brotos apresentou comportamento quadrático com redução do crescimento em resposta ao aumento da concentração do regulador vegetal atingindo ponto mínimo na concentração 0,74  $\mu\text{L}^{-1}$  (Figura 4).

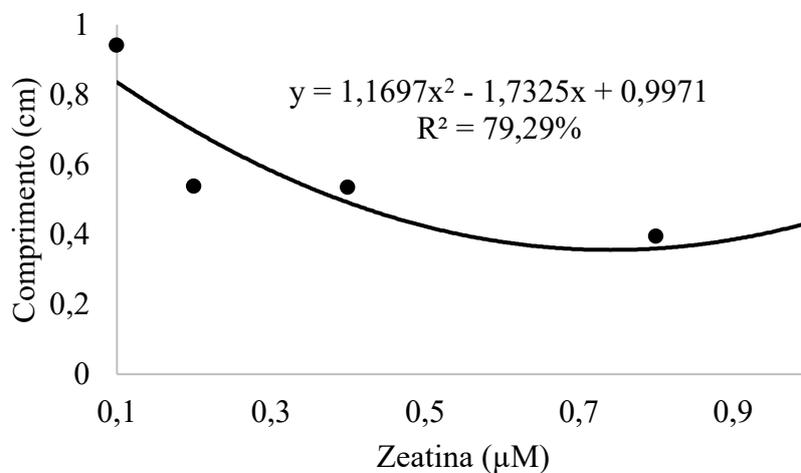


FIGURA 4. Comprimento de brotos de baraúna em função de diferentes concentrações de zeatina. Petrolina-PE, 2019.

O comportamento da abscisão foliar em função da concentração de ZEA obtido por meio de regressão apresentou ajuste quadrático com menor abscisão na concentração de 0,49  $\mu\text{L}^{-1}$  para uma abscisão de esperada de 5%, valor equivalente a não utilização de citocininas e a partir dessa concentração a abscisão aumentou até 50% (Figura 5).

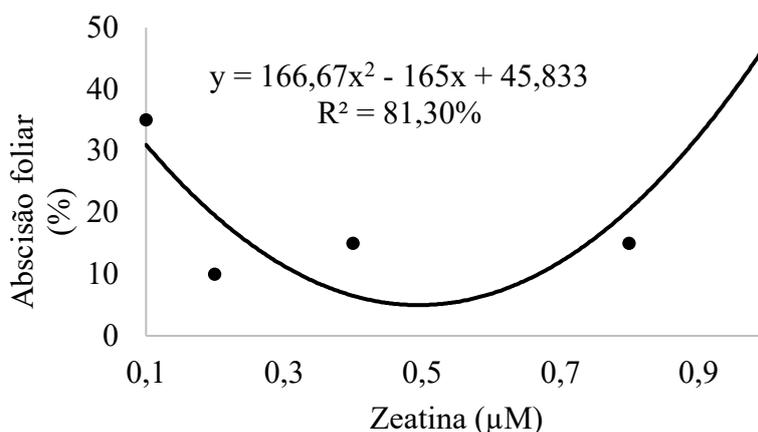


FIGURA 5. Abscisão foliar de baraúna em função de diferentes concentrações de zeatina. Petrolina-PE, 2019.

A capacidade para retardar a senescência foliar varia amplamente entre os diversos tipos de citocininas (OLIVEIRA et al., 2007). O BAP apresentou comportamento linear em resposta ao aumento da dose de para abscisão foliar conforme Figura 6.

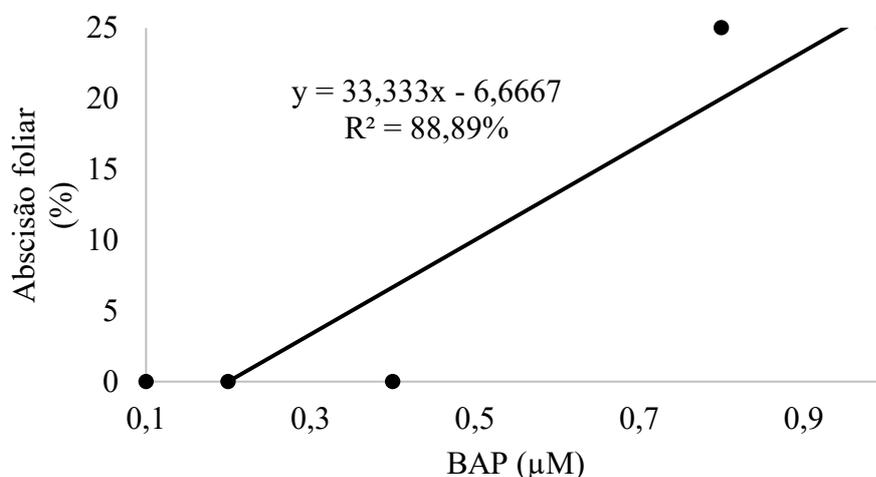


FIGURA 6. Abscisão foliar de baraúna em função de diferentes concentrações de BAP. Petrolina-PE, 2019.

O BAP está diretamente ligado a uma alta taxa de multiplicação de brotos e tem sido relacionado como eficiente na multiplicação de várias espécies (RODRIGUES et al., 2016; EMER et al., 2018; ENKHBILEG et al., 2019). El-Bagoury et al. (2018) e Freitas et al. (2016) indicaram como melhor desempenho para multiplicação de *Vangueria edulis* e *Annona emarginata*, respectivamente, a concentração de 1 ppm de BAP.

Cappelletti et al. (2016) em estudo com morango e mirtilo observaram que as concentrações de BAP (2,0 mg L<sup>-1</sup>) em combinação com ANA (1,0 mg L<sup>-1</sup>) influenciaram

significativamente a formação de brotações. Associação entre ANA e BAP (0,3 e 0,75 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) também foram apontados com êxito em *Lilium longiflorum* por Fauziah et al. (2019).

As citocininas agem na indução da quebra da dominância apical e proliferação de gemas axilares, apesar de o BAP ser um dos reguladores vegetais mais comumente utilizado e com o menor custo de aquisição (BAKHTIAR et al., 2016; DZIEDZIC; MCDONALD, 2016) esta citocinina nem sempre apresenta um efeito positivo para todas as espécies.

A alta concentração de citocinina promovida pela adição de doses elevadas de BAP podem ocasionar estresse nos explantes e isso pode ativar genes que alteram o balanço hormonal endógeno, especialmente os relacionados à síntese de citocininas, oxidases e desidrogenases (KOPEČNÝ et al., 2016).

### 3.3 Nitrato de prata e cloreto de cobalto na morfogênese e abscisão foliar de baraúna

As variáveis comprimento de brotos e número de gemas abscisão foliar não foram influenciadas pela interação inibidor x concentrações ou pelos fatores isolados (Tabela 16).

TABELA 16. Comprimento do broto (cm), número de gemas e abscisão foliar de plântulas de baraúna submetidos ao tratamento com inibidores de etileno. Petrolina-PE, 2019.

Concentração (µM)	Comprimento		Número de gemas		Abscisão foliar (%)	
	Nitrato de prata	Cloreto de cobalto	Nitrato de prata	Cloreto de cobalto	Nitrato de prata	Cloreto de cobalto
5	0,500 a	0,608 a	3,417 a	4,194 a	25,00 b	8,33 a
10	0,392 a	0,383 a	2,583 a	3,167 a	10,71 b	8,33 a
20	0,485 a	0,617 a	3,617 a	3,583 a	0,00 a	8,33 b
40	0,517 a	0,383 a	4,000 a	3,167 a	0,00 a	0,00 a
Média	0,473	0,498	3,404	3,528	8,929	6,250
W: F <sub>Lev</sub>	<b>0,978;3,410</b>		<b>0,968;1,343</b>		0,454;16,00	
CV (%)	39,73		30,66		11,14	
Transformação	-		-		$\sqrt{x + 0,5}$	

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; W e Flev.: Estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, valores em negrito indicam resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente, a 1% de probabilidade.

Diferente dos resultados observados Ferreira Nepomuceno *et al.* (2009), em trabalho com angico (*Anadenanthera colubrina*) verificaram que tanto o nitrato de prata

como o cloreto de cobalto contribuíram com acréscimos no número de gemas e no número de brotações. Já Rezende et. al. (2017) observaram que o nitrato de prata a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  reduziu o crescimento de plantas de mandioca (*Manihot esculenta*) *in vitro*.

O  $\text{AgNO}_3$  sustentou o crescimento *in vitro* e prevenção efetiva da queda das folhas de *M. oleífera* em comparação ao controle (RAVI et al., 2019) e suprimiu o alongamento excessivo do caule e aumentou a expansão foliar em *A. andraeanum* cv. Alabama e Dakota (CARDOSO, 2019).

Por meio dos dados referentes a abscisão foliar presentes na Tabela 16 observou-se que houve interação significativa entre os fatores concentração e inibidor de etileno. Nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  o cloreto de cobalto foi mais efetivo para reduzir a abscisão foliar, enquanto o aumento a concentração dos inibidores para 20  $\mu\text{M}$  favoreceu o nitrato de prata e quando utilizada a concentração de 40  $\mu\text{M}$  tantos nitratos de prata como cloreto de cobalto foram eficientes para evitar abscisão foliar das plantas de baraúna *in vitro*.

As plantas de baraúna responderam de forma quadrática às concentrações de nitrato de prata com mínima abscisão foliar calculada através da equação de regressão com a concentração de 29,31  $\mu\text{M}$  (Figura 7).

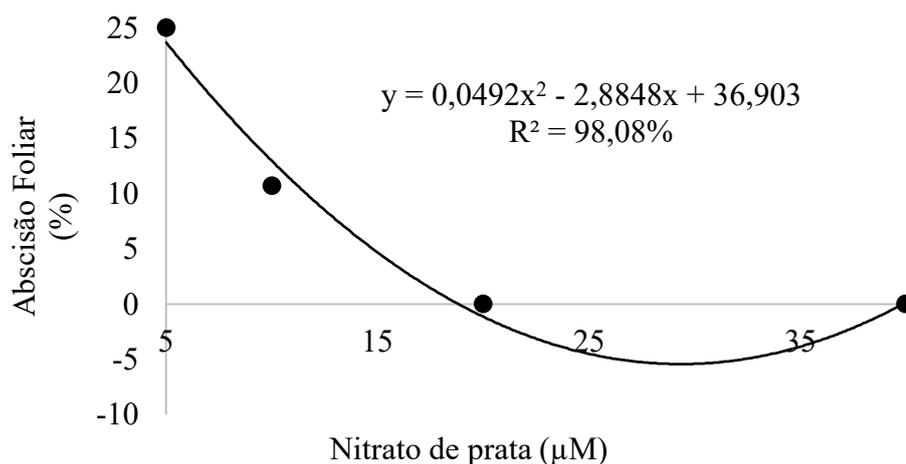


FIGURA 7. Abscisão foliar de plantas de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) em função de diferentes concentrações de nitrato de prata. Petrolina-PE, 2019.

Para o cloreto de cobalto a redução da abscisão ocorreu de maneira linear em resposta ao aumento das concentrações atingindo ausência de abscisão com a concentração de 40  $\mu\text{M}$  (Figura 8).

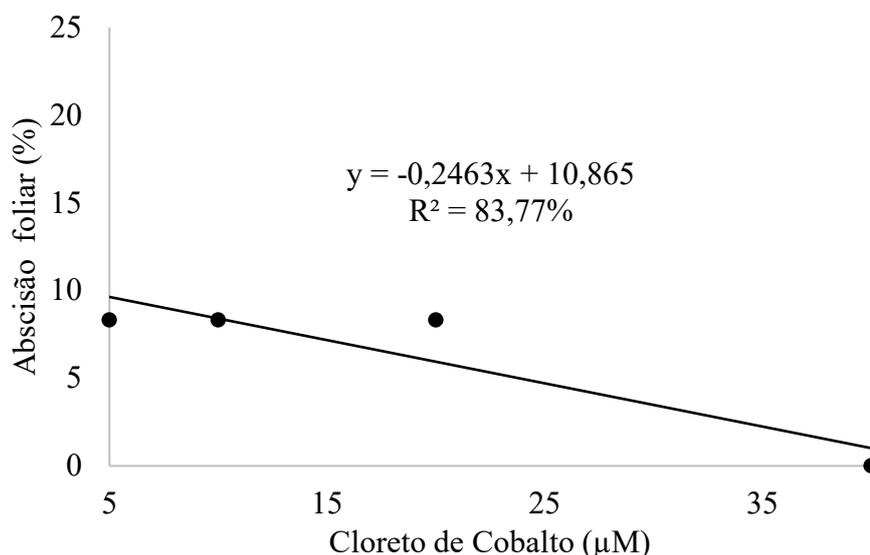


FIGURA 8. Abscisão foliar de plântulas de baraúna em função de diferentes concentrações de cloreto de cobalto. Petrolina-PE, 2019.

A adição de  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CoCl}_2$ , inibidores conhecidos do etileno, pode ter levado a uma menor acumulação de etileno na atmosfera dentro dos tubos de ensaio de cultura, o que estimulou a multiplicação de *Andrographis paniculata* (DAS; BANDYOPADHYAY, 2020). Tal efeito também foi levantado em produção de *Passiflora gibertii* (FARIA et al., 2017) e *Glycyrrhiza glabra* (TAHOORI et al., 2018).

Sarropoulou et al. (2016) observaram efeitos diretos de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  e  $\text{CoCl}_2$  na proliferação de brotações *in vitro* e no enraizamento de cerejeira. Kumar et al. (2016) atribuíram a eficiência na multiplicação de explantes de algodão ao  $\text{AgNO}_3$ , relacionando o incremento no crescimento vegetal ao aumento de biossíntese poliamina e inibição da ação do etileno.

A resposta ao etileno ocorre pela sua ligação a um receptor específico, responsável por enviar o sinal para sua ativação. A resposta do tecido vegetal ao etileno é acompanhada pela indução auto-catalítica do próprio hormônio, ou seja, a exposição do tecido ao etileno estimula a sua biossíntese, devido ao aumento das enzimas ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano sintase (ACCsintase) e ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase (ACCOxidase). Segundo Altvorst e Bovy (1995), um dos possíveis mecanismos que contribuem para a indução da biossíntese do etileno é a mudança na receptividade do tecido ou na sensibilidade ao etileno.

O íon cobalto atua inibindo síntese do regulador vegetal bloqueando a conversão do ACC em etileno, a qual é realizada pela ACC oxidase isso pode acontecer a partir de pequenas concentrações, enquanto o íon prata tem uma ação mais específica e compete

pelo receptor de etileno, por isso pequenas concentrações podem não ser suficientes para inibir a sinalização que levam a ação deste regulador vegetal que mesmo em quantidades mínimas pode ter efeitos prejudiciais (NOWAK et al., 1991).

Sarropoulou e Maloupa (2016) indicaram a dose de 2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  como o adequado a multiplicação de *Sideritis raeseri*. Panchal e Patel (2017) encontraram menor abscisão foliar e o maior número de folhas para *Annona squamosa* quando utilizado no meio de cultura 5  $\text{mg L}^{-1}$ , sendo 10  $\text{mg L}^{-1}$  fitotóxico e com reflexo negativo na produção foliar. Embora nitrato de prata e cloreto de cobalto tenham se diferenciado inicialmente na redução da abscisão foliar, esses mesmos compostos quando utilizados na maior concentração 40  $\mu\text{M}$  mostraram-se igualmente eficientes para o controle desse fenômeno neste experimento.

É importante destacar que a regeneração, crescimento e multiplicação in vitro é altamente dependente do genótipo, tipo de explante, crescimento de plantas sob concentrações de meio de cultura e os níveis de reguladores exógenos. Portanto, é fundamental verificar as condições ótimas para o crescimento da espécie desejada (HEGDE et al, 2017), e este trabalho direciona algumas concentrações para o cultivo de baraúna.

#### 4 CONCLUSÕES

A adição de 0,2  $\mu\text{L}^{-1}$  de ANA a 0,4  $\mu\text{L}^{-1}$  de ZEA promove maior número de brotos de baraúna.

O AIA é a auxina mais adequada a ser associada a ZEA para maior comprimento de brotos e número de gemas de baraúna.

O comprimento dos brotos e número de gemas não são influenciados pelo nitrato de prata e cloreto de cobalto nas concentrações testadas.

Nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  o cloreto de cobalto é mais eficiente que o nitrato de prata para a redução da abscisão foliar da baraúna.

O nitrato de prata a partir da concentração de 20  $\mu\text{M}$  evita completamente a abscisão foliar enquanto o cloreto de cobalto tem máxima redução da abscisão na concentração 40  $\mu\text{M}$ .

## REFERÊNCIAS

- AL-KHAYRI, J. M.; NAIK, P. M. Date palm micropropagation: Advances and applications. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, n. 4, p. 347-358, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-70542017414000217>
- ALTVORST, A. C. V.; BOVY, A. G. The role of ethylene in the senescence of carnation flower, a review. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 16, n. 1, p. 43-53, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00040506>
- BAKHTIAR, Z.; MIRJALILI, M. H.; SONBOLI, A. In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 16, n. 1, p. 48-54, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n1a8>
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 443, de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 3, 25 p. 2014.
- BRITO, L. P. S.; BEZERRA, T. T.; NUNES, E. M. B.; CAVALCANTE, M. Z. B.; SIQUEIRA FILHO, J. A. Produção de mudas de *Schinopsis brasiliensis* Engler sob prévia lavagem do pó de coco e submetidas a doses crescentes de fertilizante de liberação controlada. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 1022-1034, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5902/19805098333385>
- CAPPELLETTI, R.; SABBADINI, S.; MEZZETTI, B. The use of TDZ for the efficient in vitro regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 207, p. 117-124, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.016>
- CARDOSO, J. C. Silver nitrate enhances in vitro development and quality of shoots of *Anthurium andraeanum*. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 253, p. 358-363, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.054>
- COSTA, E. S. S.; DE SOUZA, M. D.; DE SOUZA, A. V. Efeito de diferentes concentrações de BAP e Zeatina na multiplicação *in vitro* de *Schinopsis brasiliensis* Engl. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 10., 2015, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015.
- DAS, D.; BANDYOPADHYAY, M. Novel approaches towards over-production of andrographolide in vitro seedling cultures of *Andrographis paniculata*. **South African Journal of Botany**, KwaZulu-Natal, v. 128, p. 77-86, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.015>
- DE FREITAS, R. T.; PAIVA, R.; CAMPOS, N. A.; SILVA, L. C.; SWENNEN, R. L.; PANIS, B. *In vitro* culture of *Annona emarginata*: A rootstock for commercial annonaceae species. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2016.

DE OLIVEIRA PRUDENTE, D.; DE SOUZA, L. B.; PAIVA, R.; DOMICIANO, D.; DE CARVALHO, P. A.; NERY, F. C. Goji berry (*Lycium barbarum* L.) *in vitro* multiplication improved by light-emitting diodes (LEDs) and 6-benzylaminopurine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, United States, v. 55, n. 3, p. 258-264, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09970-w>

DE OLIVEIRA PRUDENTE, D.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; GOULART, V. L. A.; DO NESCIAMENTO, A. A. C. Micropropagação de candeia, uma espécie nativa do cerrado brasileiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 3, p. 305-311, 2016. DOI: <https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n3p305-311>

DE PIETRO, J. de. **Fisiologia pós-colheita de rosas cortadas cv. Vega**. Dissertação (Mestrado), 2009 - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

DE SOUZA, M. D.; SANTOS, M. C.; DE SOUZA, D. D.; DE SOUZA, A. V.; DE SANTANA, J. R. F. **Estabelecimento *in vitro* de baraúna sob diferentes concentrações de BAP e AIA**. In: Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 9., Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2014.

DE SOUZA SANTOS, C. C.; MASULLO, M.; CERULLI, A.; MARI, A.; ESTEVAM, C. D. S.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochemistry**, Oxford, v. 140, p. 45-51, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.008>

DOBRÁNSZKI, J.; DA SILVA, J. A. T. Micropropagation of apple—a review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 462-488, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.008>

DOS REIS LUZ, L.; PORTO, D. D.; CASTRO, C. B.; SILVA, M. F. S.; DE GODOY ALVES FILHO, E.; CANUTO, K. M.; ZOCCOLO, G. J. Metabolomic profile of *Schinopsis brasiliensis* via UPLC-QTOF-MS for identification of biomarkers and evaluation of its cytotoxic potential. **Journal of Chromatography B**, United States, v. 1099, p. 97-109, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.019>

DZIEDZIC, J. A.; MCDONALD, A. G. Mass spectrometry data for *in vitro* protein profiles in early and late stages of Douglas-fir xylogenesis. **Data in brief**, United States, v. 7, p. 1048-1051, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.03.083>

EL-BAGOURY, H. M. A.; SARHAN, A. M. Z.; SAADAWY, F. M.; EBRAHIM, M. M. *In vitro* multiplication of *vangueria edulis* as affected by cytokinins and medium type. **Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants**, Egypt, v. 5, n. 1, p. 57-65, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21608/sjfop.2018.12818>

EMARA, H. A.; HAMZA, E. M.; FEKRY, W. A. *In vitro* propagation and microtuber formation of potato in relation to different concentrations of some growth regulators and sucrose. **Middle East Journal of Agriculture Research**, Faisalabad, v. 6, n. 4, p. 1029-1037, 2017.

- EMER, A. A.; WINHELMANN, M. C.; GRZEÇA, G. T.; FIOR, C. S.; SCHAFER, G. *In vitro* multiplication of *Codonanthe devosiana*. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 58-62, 2018. DOI: <https://doi.org/10.14295/oh.v24i1.1065>
- ENCINA, C. L.; BARCELÓ-MUNHOZ, A.; HERRERO-CASTAÑO, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1080/00221589.1994.11516544>
- ENKHBILEG, E.; FÁRI, M. G.; KURUCZ, E. *In vitro* effect of different cytokinin types (BAP, TDZ) on two different *Ocimum basilicum* cultivars explants. **International Journal of Horticultural Science**, Debrecen, v. 25, n. 3-4, p. 15-20., 2019. DOI: <https://doi.org/10.31421/IJHS/25/3-4/3930>
- FARIA, G. A.; FELIZARDO, L. M.; FERREIRA, A. F. A.; ROCHA, P. S.; SUZUKI, A. N.; SOUZA, A. D. S.; JUNGHANS, T. G.; COSTA, M. A. P. C.; PEIXOTO, A. P. A. B.; DE MORAIS, A. R.; LOPES, B. G.; DE OLIVEIRA, T. A. Concentrations of silver nitrate in the *in vitro* development and conservation of *Passiflora gibertii* NE. Brown. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, Cruz das Almas, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.812199>
- FAUZIAH, R. H.; KUSMIYATI, F.; ANWAR, S. *Lilium longiflorum* Plant Growth with a combination of Naphthylacetic Acid (NAA) and 6 Benzylaminopurine (BAP) *In Vitro*. **Journal of Tropical Crop Science and Technology**, Malang, v. 1, n. 2, p. 78-92, 2019. DOI: <https://doi.org/10.22219/jtcst.v1i2.10387>
- FEHER, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015. DOI: <https://doi.org/10.22219/jtcst.v1i2.10387>
- FERNANDES, F. H. A.; BATISTA, R. S. A.; MEDEIROS, F. D.; SANTOS, F. S.; MEDEIROS, A. C. D. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 25, p. 208–211, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.006>
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- GOMES, T. B.; BANDEIRA, F. P. S. F. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia. **Acta Botanica Brasilica**, Alta Floresta, v. 26, n. 4, p. 796–709, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000400009>
- GUO, B.; HE, W.; ZHAO, Y.; WU, Y.; FU, Y.; GUN, J.; WEI, Y. Changes in endogenous hormones and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> burst during shoot organogenesis in TDZ-treated *Saussurea involucre* explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Switzerland, v. 128, n. 1, p. 1-8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1069-3>

HA, N. T. M.; DO, C. M.; HOANG, T. T.; DAI NGO, N.; NHUT, D. T. The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Switzerland, p. 1-13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01796-4>

HEGDE, V.; PARTAP, P. S.; YADAV, R. C. In Vitro Regeneration of Capsicum (*Capsicum annuum* L.) from Cotyledon Explants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 6, n. 5, p. 225-237, 2017. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.026>

HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**, Switzerland, 4: 201–216. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/reg2.91>

IBM Corp. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp, 2013.

IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, London, v. 143, n. 9, p. 1442-1451, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.134668>

IWASE, A.; MITA, K.; FAVERO, D. S.; MITSUDA, N.; SASAKI, R.; KOBAYASHI, M.; SAKAKIBARA, H. WIND1 induces dynamic metabolomic reprogramming during regeneration in *Brassica napus*. **Developmental biology**, Amsterdam, v. 442, n. 1, p. 40-52, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.006>

KLERK, G. J.; TER BRUGGE, J.; MARINOVA, S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in *Malus* 'Jork 9'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Switzerland, v. 49, n. 1, p. 39-44, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1005850222973>

KOPEČNÝ, D.; KONČITÍKOVÁ, R.; POPELKA, H.; BRIOZZO, P.; VIGOUROUX, A.; KOPEČNÁ, M.; MORÉRA, S. Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. **The FEBS journal**, Cambridge, v. 283, n. 2, p. 361-377, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.13581>

KUMARI, A.; BASKARAN, P.; PLACKOVÁ, L.; OMÁMIKOVÁ, H.; NISLER, J.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J. Plant growth regulator interactions in physiological processes for controlling plant regeneration and in vitro development of *Tulbaghia simmleri*. **Journal of plant physiology**, Switzerland, v. 223, p. 65-71, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.01.005>

KWON, S. J.; ROY, S. K.; KIM, H. R.; MOON, Y. J.; YOON, K. H.; WOO, S. H.; KIM, H. H. Effects of medium compositions and plant growth regulators on in vitro organogenesis in cultured explants of *Platycodon grandiflorum* species. **Korean Journal of Crop Science**, Kangwon, v. 62, n. 3, p. 259-274, 2017.

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

MASTUTI, R.; MUNAWARTI, A.; FIRDIANA, E. R. The combination effect of auxin and cytokinin on in vitro callus formation of *Physalis angulata* L.–A medicinal plant. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, United States, p. 040007, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.5012721>

MEDEIROS, A. C. D., ALENCAR, L. C. B., FELISMINO, D.C. *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Medicinal and Aromatic Plants of South America**, Rio de Janeiro, p. 421–429, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0\\_38](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0_38)

MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 16, n. 2, p. 350-355, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_017](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_017)

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. D. S.; QUEIROZ, S. R. D. O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. D. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 3, 481-490, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000300010>

NOWAK, J.; GOSZCZYNSKA, M. D.; RUDNICKI, R. A. I. Storage of cut flowers and ornamental plants: present status and future prospects. **Postharvest News and Information**, United Kingdom, v. 2, n. 4, p. 255-260, 1991.

OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; SANTANA, J. D.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; SILVA, L. C. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 25-30, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000100008>

ORTIZ-ROJAS, L. Y.; SUÁREZ-BOTELLO, J. C.; CHAVES-BEDOYA, G. Respuesta en el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana* al extracto foliar de Moringa oleifera. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, Boyacá, v. 11, n. 1, p. 193-199, 2017. DOI: <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.6131>

PANCHAL, R. K.; PATEL, R. M. Effect of silver nitrate on leaf abscission in culture during establishment of explants of custard apple (*Annona squamosa* L.) cv. Balanagar. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, New Delhi, v. 10, n. 2, p. 263-266, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2017.00031.6>

PARK, S. H.; ELHITI, M.; WANG, H.; XU, A.; BROWN, D.; WANG, A. Adventitious root formation of *in vitro* peach shoots is regulated by auxin and ethylene. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 226, p. 250-260, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/i.scienta.2017.08.053>

PREM KUMAR, G.; SIVAKUMAR, S.; SIVA, G.; VIGNESWARAN, M.; SENTHIL KUMAR, T.; JAYABALAN, N. Silver nitrate promotes high-frequency multiple shoot regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by inhibiting ethylene production and phenolic secretion. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, United States, v. 52 N. 4, p. 408–418, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9782-5>

RATHORE, M. S.; MASTAN, S. G.; YADAV, P.; BHATT, V. D.; SHEKHAWAT, N. S.; CHIKARA, J. Shoot regeneration from leaf explants of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal and genetic stability evaluation of regenerates with RAPD and ISSR markers. **South African Journal of Botany**, KwaZulu-Natal, v. 102, p. 12-17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.003>

RAVI, R. D.; SIRIL, E. A.; NAIR, B. R. The effect of silver nitrate on micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. an important vegetable crop of tropics with substantial nutritional value. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Switzerland, v. 25, n. 5, p. 1311-1322, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00689-x>

REZENDE, M. E.; CARDOSO, L. D.; MATSUMOTO, K.; FLORES, P. S. Uso do nitrato de prata na conservação *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 8., 2017, Bonito. Anais...[SI]: SBFPO: ABCTP, 2017.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia. v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_059](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_059)

RODRIGUES, D. B.; NADAL, M. C.; CAMARGO, S. S.; DE ASSIS, A. M.; SCHUCH, M. W.; PEIL, R. M. N.; FARIA, R. T. Growth regulators and substrates for *Oncidium baueri* Lindl. micropropagation. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 2901-2910, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p2901>

SARROPOULOU, V.; DIMASSI-THERIOU, K.; THERIOS, I. Effect of the ethylene inhibitors silver nitrate, silver sulfate, and cobalt chloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherryrootstocks CAB-6P and Gisela 6. **Turkish Journal of Biology**, Pamukkale, v. 40, n. 3, p. 670-683, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3906/biy-1505-92>

SARROPOULOU, V.; MALOUPA, E. Effect of the NO donor “sodium nitroprusside”(SNP), the ethylene inhibitor “cobalt chloride”(CoCl<sub>2</sub>) and the antioxidant vitamin E “ $\alpha$ -tocopherol” on *in vitro* shoot proliferation of *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Switzerland, v. 128, n. 3, p. 619-629, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1139-6>

SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; PARVEEN, S.; SAEED, T.; SHAHEEN, A.; AKHTAR, R.; AHMAD, Z. Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. **Plant Biotechnology: Principles and Applications**, Singapore, p. 1–36, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5_1)

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, Academic Journals, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11522>

SINGH, C. K.; RAJ, S. R.; JAISWAL, P. S.; PATIL, V. R.; PUNWAR, B. S.; CHAVDA, J. C.; SUBHASH, N. Effect of plant growth regulators on in vitro plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis. **Agroforestry systems**, Switzerland, v. 90, n. 2, p. 281-288, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9853-3>

TAHOORI, F.; MAJD, A.; NEJADSATTARI, T.; OFOGHI, H.; IRANBAKHSI, A. Effects of silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) on growth and anatomical structure of vegetative organs of liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) under in 'vitro' condition. **Plant Omics**, Brisbane, vol 11, p. 153-160, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21475/poj.11.03.18.p1548>

VALERIANO, J. C. Micropropagação do Imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns) e da Baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) e uso dos fluorocromos CMA3/DAPI na caracterização citogenética do Imbiruçu. 2016.

VIDAL, F. R.; NOGUEIRA DINIZ, J. D.; PEREIRA DA SILVA, F. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000100010>